مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۶۲/هفته دوم بهمن ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۸/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۱۷

استفاده از نشانگر تک نوکلئوتیدی MT1XT20 برای تشخیص ناپایداری میکروستلایت در بیماران ایرانی مبتلا به سرطان کولون ارثی غیر پولیپی (HNPCC)

نجمه فراهانی[۱]، دکتر پروانه نیک‌پور[۲]، دکتر محمدحسن امامی[۳]، دکتر مرتضی هاشم‌زاده[۴]، مهرداد زینلیان[۵]، دکتر رسول صالحی[۶]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سرطان‌های بدخیم کولورکتال، چه در صورت تکی و چه در صورت خانوادگی، اگر با افزایش میزان ناپایداری در میکروستلایت همراه باشند، پیش‌آگهی بهتری دارند، راهکار متفاوتی برای جراحی در آن‌ها اتخاذ می‌شود و پاسخ متفاوتی نسبت به داروی شیمی‌درمانی 5FU (Fluorouracil) خواهند داد. بنا بر این، امروزه برای بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال ارثی و غیر ارثی، آزمایش سنجش وضعیت ناپایداری میکروستلایت انجام می‌شود. هدف این مطالعه، سنجش کارایی نشانگر تک نوکلئوتیدی MT1XT20 در جمعیت بیماران مبتلا به سرطان کولون ارثی غیر پولیپی (HNPCC یا Hereditary nonpolyposis colorectal cancer) کشور ایران بود. علاوه بر نشانگر پیش‌گفته، از دو روش بررسی وضعیت میکروستلایت با پنل ۵ نشانگری و استاندارد Promega و نیز آزمایش ایمنوهیستوشیمیایی استفاده شد.

روش‌ها: در این مطالعه، نشانگر تک نوکلئوتیدی MT1XT20 و کیت استاندارد Promega از طریق روش PCR (Polymerase chain reaction) بر روی ۲۰ خانواده‌ی مبتلا به HNPCC ایرانی مورد سنجش قرار گرفت و آزمایش ایمنوهیستوشیمیایی نیز برای بررسی وضعیت ۴ پروتئین مهم دخیل در مسیر ترمیم ناجور جفت شدگی مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: در روش سنجش ناپایداری میکروستلایت از طریق پنل Promega و نشانگر تک نوکلئوتیدی MT1XT20 به ترتیب ۸ (۴۰ درصد) و ۵ نمونه (۲۵ درصد) از ۲۰ نمونه وضعیت ناپایداری نشان دادند. در روش ایمنوهیستوشیمیایی نیز، ۷ نمونه از ۲۰ نمونه (۳۵ درصد) وضعیت کمبود پروتئین مسیر ترمیم ناجور جفت شدگی را نشان دادند. در میان نشانگرهای مورد استفاده در کیت Promega، نشانگر BAT26 ناپایدارترین نشانگر بود و در هر ۸ نمونه، Microsatellite instability-high (MSI-H) تشخیص داده شده توسط کیت Promega ناپایداری نشان داد. نشانگرهای NR21 و NR24 در ۷ نمونه (۸۷/۵ درصد) ناپایداری نشان دادند و نشانگرهای BAT25 و MONO27 به ترتیب با نشان دادن ناپایداری در ۶ (۷۵/۰ درصد) و ۵ نمونه (۶۲/۵ درصد)، پایدارترین نشانگرها بودند.

نتیجه‌گیری: MT1XT20 در جمعیت ایتالیایی، به عنوان نشانگر تک نوکلئوتیدی مورد اعتماد ارزیابی شده است، اما این مسأله در رابطه با جمعیت ایرانی صدق نمی‌کند. در عوض، BAT26 با نشان دادن ناپایداری در تمام نمونه‌های MSI-H ارزیابی شده توسط کیت Promega، می‌تواند به عنوان نشانگری موثق و قابل مقایسه با پنل ۵ نشانگری Promega در جمعیت ایرانی در نظر گرفته شود.

واژگان کلیدی: سرطان کولون ارثی غیر پولیپی، ناپایداری میکروستلایت، MT1XT20، تکرارهای شبه مونومورفیک

ارجاع: فراهانی نجمه، نیک‌پور پروانه، امامی محمدحسن، هاشم‌زاده مرتضی، زینلیان مهرداد، صالحی رسول. **استفاده از نشانگر تک نوکلئوتیدی MT1XT20 برای تشخیص ناپایداری میکروستلایت در بیماران ایرانی مبتلا به سرطان کولون ارثی غیر پولیپی (HNPCC).** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۶۲): ۲۱۳۰-۲۱۲۰

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استادیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دانشیار، مرکز تحقیقات گوارش پورسینای حکیم، مؤسسه پژوهشی پورسینای حکیم و دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- استاد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۵- دانشجوی دکتری، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۶- دانشیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر رسول صالحی
Email: r_salehi@med.mui.ac.ir

مقدمه

سندرم Lynch که به عنوان سرطان کولون ارثی غیر پولیپی (Hereditary nonpolyposis colorectal cancer یا HNPCC) نیز شناخته می‌شود، شایع‌ترین شکل ارثی سرطان کولون (۱) با توارث اتوزومی غالب است (۲). در این سرطان ارثی، یک یا چند جهش در رده‌ی زاینده و در ژن‌های دخیل در مسیر ترمیم ناجور جفت شدگی (Mismatch repair یا MMR) رخ می‌دهد. این ژن‌ها عبارت از MLH1، MSH2، MSH6، MSH3 و PMS2 می‌باشند (۳).

در سال ۱۹۹۳ مشخص شد که فقدان عملکرد ژن‌های دخیل در مسیر ترمیم ناجور جفت شدگی، منجر به پدیده‌ی ناپایداری میکروستلایت در تومورهای دارای این نقص می‌گردد (۵-۴). توالی‌های میکروستلایت در سراسر ژنوم پراکنده‌اند و متشکل از تکرارهای ۱-۶ جفت بازی هستند و پلی‌مورفیسم بسیار بالایی را نشان می‌دهند (۷-۶). در برخی از تومورها، نیم یا بیش از نیمی از میکروستلایت‌ها دچار ناپایداری می‌شوند که تحت عنوان ناپایداری بالای میکروستلایت (Microsatellite instability high یا MSI-H) شناخته می‌شود. می‌توان گفت که سنجش پایداری میکروستلایت (Microsatellite instability testing) روشی بسیار خوب و آسان برای بررسی فقدان پروتئین‌های سیستم MMR می‌باشد (۸).

در بیماران مبتلا به سندرم Lynch، احتمال رخداد مجدد تومورهای کولون وجود دارد (۹) و این بیماران، علاوه بر تومور کولون در معرض خطر برای ابتلا به سایر تومورها نظیر تومور اندومتر و با احتمال کمتر تومورهای تخمدان، معده، مثانه، پانکراس و مغز می‌باشند. علاوه بر این، خانواده‌ی این افراد، در معرض خطر ابتلا به سرطان‌های مشابه هستند (۱). سرطان‌های کولونی که وضعیت ناپایداری میکروستلایت را نشان می‌دهند، نسبت به سایر سرطان‌های کولون، پیش‌آگهی بهتری دارند؛ اما در صورت استفاده از شیمی درمانی یاری‌گر 5FU (5FU adjuvant chemotherapy) (Fluorouracil) این پیش‌آگهی کاهش می‌یابد (۱۱-۱۰). همچنین، در این بیماران، شیوه‌ی جراحی متفاوتی اتخاذ می‌شود (۱۲).

بنا بر این، بررسی وضعیت ناپایداری میکروستلایت، یک روش مستقل پیش‌بینی کننده است که منجر به مدیریت بهتر سندرم Lynch خواهد شد و در اغلب موارد، به عنوان بهترین و اولین روش برای شناسایی این بیماران به کار گرفته می‌شود (۱۲، ۱۰). از آزمایش ایمنوهیستوشیمیایی (Immuno histo chemistry یا IHC) نیز برای بررسی وضعیت بیان ژن‌های دخیل در مسیر ترمیم ناجور جفت شدگی و غربال‌گری بیماران مبتلا به سندرم Lynch استفاده می‌شود. با این حال، به دلیل وجود برخی محدودیت‌ها در انجام آزمایش ایمنوهیستوشیمیایی، از آزمایش MSI (Microsatellite instability) نیز در همراهی با آن استفاده می‌گردد (۱۴-۱۳).

در سال ۱۹۷۷ مؤسسه‌ی بین‌المللی سرطان (National cancer institute)، پنل پنج نشانگری Bethesda را برای بررسی وضعیت ناپایداری میکروستلایت ارایه نمود که متشکل از دو نشانگر تک نوکلئوتیدی و سه نشانگر دو نوکلئوتیدی بود (۱۵). در سال ۲۰۰۴ برای افزایش اعتبار پنل ارایه شده، پنلی متشکل از پنج نشانگر تک نوکلئوتیدی ارایه شد که پنل Promega نام گرفت (۱۶).

امروزه این پروتکل استاندارد، برای بررسی وضعیت بیماران مشکوک به سندرم Lynch که از طریق معیارهای آمستردام/Bethesda (Amsterdam and/or Bethesda criteria) انتخاب شده‌اند، به کار می‌رود (۱۸-۱۷). به هر حال، این روش به دلیل نیاز به بررسی هم‌زمان چند نشانگر هزینه‌بر و زمان‌بر است و انجام آن در تمام آزمایشگاه‌ها امکان پذیر نیست (۱۹). بنا بر این، تلاش‌هایی برای یافتن روشی ساده‌تر و کم‌هزینه‌تر با حساسیت و اختصاصیتی مشابه به پنل‌های چند نشانگری صورت گرفت و منجر به معرفی نشانگرهای تک نوکلئوتیدی مختلف در چندین مطالعه شد (۲۱-۲۰، ۱۰). از بین این نشانگرهای شبه مونو مورفیک، دو نشانگر BAT26 و BAT25 شناخته شده‌ترین نشانگرها هستند (۲۲، ۱۷).

در پژوهشی، چهار نشانگر تک نوکلئوتیدی PTHL3، SEC63، HPDMPK و U79260 معرفی شدند (۲۳). در مطالعه‌ای دیگر، نشانگر تک نوکلئوتیدی دیگری تحت عنوان CAT25 در منطقه‌ی ترجمه نشدنی ′3 ژن *CASP2* ارایه گردید (۲۴). نشانگر CAT25 در مقایسه با پنل استاندارد ارایه شده توسط مؤسسه‌ی بین‌المللی سرطان، حساسیت و اختصاصیت بالایی را نشان می‌داد (۲۵-۲۴).

Morandi و همکاران نشانگر تک نوکلئوتیدی MT1XT20 را در منطقه‌ی ترجمه نشدنی ′3 ژن MT1X ارایه کردند که در مقایسه با CAT25 و سایر نشانگرهای تک نوکلئوتیدی، از حساسیت و اختصاصیت بالاتری برخوردار بود (۲۶). هدف از این مطالعه، ارزیابی حساسیت و اختصاصیت نشانگر MT1XT20 در مقایسه با پنل Promega و آزمایش IHC در بیمارانی بود که از طریق معیار آمستردام II انتخاب شده بودند. در این مطالعه، بررسی وضعیت ناپایداری میکروستلایت از طریق پنل Promega به عنوان روش استاندارد طلایی (Gold standard method) اتخاذ شد.

روش‌ها

جمعیت مطالعه: از ۱۱۵۹ بیمار مبتلا به سرطان کورکتال از دو استان اصفهان و چهارمحال و بختیاری که در مرکز تحقیقات پورسینای حکیم اصفهان ثبت نام به عمل آورده بودند، درخواست شد تا به پرسش‌نامه‌ی مربوط پاسخ دهند. این پرسش‌نامه، حاوی سؤالاتی در

رابطه با سابقه‌ی خود فرد یا خانواده‌اش در ابتلا به سرطان کولون و سایر سرطان‌ها بود. از تمامی بیماران شرکت کننده در مصاحبه، رضایت‌نامه‌ی کتبی دریافت شد. اطلاعات ۴۰ بیمار از ۱۱۵۹ بیمار مورد مطالعه با معیارهای آمستردام II مطابقت داشت و در نهایت، ۲۰ بیماری که نمونه‌ی تومور و بافت طبیعی مجاور آن‌ها در دسترس بود، مورد بررسی‌های بعدی قرار گرفتند. این مطالعه توسط کمیته‌ی اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان مورد تأیید قرار گرفت.

استخراج DNA ژنومی: استخراج DNA از ۴۰ بافت تثبیت شده با فرمالین و پارافینه شده (Formalin fixed paraffin embedded) بر طبق پروتکل انجام شد (۲۷). در ابتدا به منظور پارافین‌زدایی، دو برش ۱۰ µm از هر بافت به همراه ۱ ml گزیلن داخل یک تیوب Eppendorf تمیز با حجم ۱/۵ µl به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. سپس، تیوب‌ها با شتاب ۱۳۰۰۰ rpm و برای مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. آن گاه، رهیدراسیون بافت به ترتیب با استفاده از اتانول ۱۰۰، ۹۰ و ۷۰ درصد انجام شد. پس از حذف الکل از بافت‌ها در کانسنتریتور SpeedVac و در دمای ۴۵ °C، ۶۰۰ µl از SDS (Sodium dodecyl sulfate) با غلظت ۱ درصد، ۳۰ µl از پروتئیناز k با غلظت ۲۰ mg/ml و ۲۰ دانه از Chelex20 به هر کدام از میکروتیوب‌ها اضافه شد و نمونه‌ها به مدت یک شب در دمای ۵۵ °C در حمام آب گرم انکوبه شدند تا هضم آنزیمی صورت گیرد. سپس، نمونه‌ها سانتریفیوژ شدند و سوپرناتانت آن‌ها در تیوب جدیدی گرداوری شد و با استفاده از روش فنل کلروفرم استخراج DNA به صورت دستی انجام گرفت.

واکنش Multiplex polymerase chain reaction (Multiplex PCR) برای سیستم تشخیص ناپایداری میکروستلایت Promega: کیت ارزیابی ناپایداری میکروستلایت Promega از پنج نشانگر شبه مونو مورفیک (NR-21، BAT-26، BAT-25، NR-24 و MONO-27) به منظور تشخیص وضعیت میکروستلایت تشکیل شده است. این کیت همچنین حاوی دو نشانگر پنج نوکلئوتیدی (Penta C و Penta D) به عنوان آشکارساز نمونه می‌باشد تا از اشتباه شدن احتمالی نمونه‌ها جلوگیری به عمل آورد. مراحل Multiplex PCR بر طبق دستورالعمل شرکت Promega به انجام رسید. سپس، نمونه‌های تکثیر شده در مرحله‌ی قبل توسط دستگاه ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer مورد بررسی قرار گرفت و پیک‌های ایجاد شده با استفاده از نرم‌افزار GeneMapper 3.7 (پیشنهاد شده توسط شرکت سازنده) مورد تفسیر قرار گرفتند. هر گونه ناهمخوانی اندازه و شکل بین آلل طبیعی و آلل مبتلا به تومور، به عنوان ناپایداری میکروستلایت در نظر گرفته شد و نمونه‌هایی با بیش از دو نشانگر ناپایدار از پنج نشانگر، در گروه نمونه‌های MSI-H قرار گرفتند.

نمونه‌های دارای ناپایداری در یک یا دو نشانگر و نمونه‌های فاقد ناپایداری در نشانگرها نیز در گروه نمونه‌های MSI-L/MSS (MSI-low/MSI stable) قرار گرفتند.

ارزیابی وضعیت MSI با استفاده از نشانگر تک نوکلئوتیدی MT1XT20: نشانگر تک نوکلئوتیدی MT1XT20 از طریق واکنش PCR در نمونه‌های مبتلا به تومور و بافت سالم مجاور آن‌ها در حجم ۲۵ µl و بر طبق شرایط زیر تکثیر شد: مخلوط واکنش PCR حاوی ۱۰۰ ng از DNA، ۲/۵ lµ از بافر 10X، ۰/۴ mM از پرایمرهای 5′-CAGCTGTGCTCTCAGATGTAAA-3′ Forward و 5′-CCA AGTGCCATATACCCAGTGA-3′ Reverse)، ۰/۵ واحد آنزیم پلیمراز Taq، ۰/۲ mM از هر dNTP (Deoxynucleotide triphosphate) و ۱/۵ mM از $MgCl_2$ بود. سپس، تیوب‌ها در دستگاه PCR متعلق به شرکت آلمانی Eppendorf قرار گرفت و مراحل PCR انجام شد. دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ C° و به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت و با ۳۰ چرخه‌ی ۳۰ ثانیه‌ای در دمای ۹۵ C°، ۵۸ °C و ۷۲ °C دنبال شد. مرحله‌ی پایانی طویل‌سازی نیز در دمای ۷۲ °C و به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. انتهای ′۵ پرایمر Reverse، توسط رنگ فلورسنت Cy5 نشان‌دار شده بود. اندازه‌ی دقیق هر کدام از آلل‌ها توسط دستگاه Automated laser fluorescence express DNA sequencer (ALF express) و نرم‌افزار AlleleLinks (توصیه شده توسط شرکت سازنده‌ی دستگاه) و از طریق مقایسه با نشانگر اندازه‌ی (Size marker) استاندارد محاسبه گردید.

انجام آزمایش ایمنوهیستوشیمیایی: از هر کدام از نمونه‌های مبتلا به تومور و بافت طبیعی مجاور آن‌ها، حداقل ۴ اسلاید تهیه شد. ارزیابی بیان پروتئین‌های سیستم MMR شامل MSH2، MLH1، MSH6 و PMS2 بر روی برش‌هایی با ضخامت ۲-۱ µm انجام گرفت. پس از پارافین‌زدایی نمونه‌ها در گزیلن و رهیدراسیون آن‌ها با استفاده از اتانول ۱۰۰، ۹۰ و ۷۰ درصد، مرحله‌ی بازیابی آنتی‌ژن در اتاق فشار و در مایکروویو با استفاده از EDTA-Tris (Ethylenediaminetetraacetic acid) (pH = ۹) و به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. سپس، برش‌ها در dH_2O (Distilled water) شستشو شدند. نمونه‌ها به منظور خنثی‌سازی پروکسیدازهای اندوژن برای مدت حداقل ۵ دقیقه در هیدروژن پراکسیداز انکوبه شدند و سپس دو بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه در TBS (Tris-buffered saline) شسته شدند. برای جلوگیری از رنگ‌آمیزی غیر اختصاصی، هر برش به مدت ۵ دقیقه تحت تیمار با محلول بلوکه کننده‌ی پروتئین قرار گرفت. سپس، بلوک‌ها دو بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه در TBS شستشو شدند. در مرحله‌ی بعد، آنتی‌بادی‌های اولیه‌ی

رقیق شده شامل NCL-MSH2، NCL-L-MLH1، NCL-L-MSH6 و NCL-L-PMS2 (ساخت شرکت Leica Biosystems) به هر کدام از نمونه‌ها اضافه شد و در دمای ۴ °C به مدت یک شب انکوبه شدند.

آنتی‌بادی اولیه دو بار با استفاده از TBS شسته شد و حذف گردید. سپس، نمونه‌ها به مدت ۳۰ ثانیه، در معرض واکنش‌گر Post primary block قرار گرفتند و دو بار دیگر با استفاده از TBS شستشو شدند. اسلایدها به مدت ۳۰ ثانیه در پلیمر Novolink انکوبه شدند و باز برای دو بار تحت شستشو با TBS قرار گرفتند و سپس، محلول DAB (3,3'-diaminobenzidine) به آن‌ها اضافه شد. این فرایند، با مراحل رنگ‌آمیزی کنتراست، دهیدراسیون نهایی و پاک‌سازی اسلایدها دنبال شد. ارزیابی اسلایدها توسط پاتولوژیستی خبره انجام گرفت و نمونه‌ها بر حسب وجود یا فقدان رنگ‌آمیزی هسته‌ای پروتئین‌های MMR، در دو گروه دارای نقص MMR (MMR-deficient) و فاقد نقص MMR (MMR-proficient) طبقه‌بندی شدند.

ارزیابی آماری: حساسیت (Sensitivity)، اختصاصیت (Specificity) و ارزش پیش‌بینی مثبت (Positive predictive values) پارامترهای مطالعه شده، با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۹ (version 19, SPSS Inc., Chicago, IL) انجام گرفت.

یافته‌ها

نوع سرطان، محل سرطان، سن و جنسیت فرد مبتلا: در خانواده‌های MSI-H و MMR-deficient فراوان‌ترین سرطان‌های مشاهده شده عبارت از سرطان‌های کولون، معده، روده‌ی کوچک، هماتوپوئیتیک، پروستات و پستان (جدول ۱).

در این خانواده‌ها بیشتر تومورها در مناطق کولون صعودی (Ascending colon) و کولون نزولی (Descending colon) ایجاد شده بودند (جدول ۲). در خانواده‌های MSS و IHC-proficient سرطان هماتوپوئیتیک با فراوانی کمتری مشاهده شد و در عوض، سرطان ریه نیز مشاهده گردید (جدول ۳).

بیشترین منطقه‌ی درگیر در ایجاد تومور در این گروه، سیگموئید (Sigmoid) و رکتوم (Rectum) بود (جدول ۴). سن متوسط بیماران MSI-H در زمان تشخیص تومور، ۳۸/۸ سال (بازه‌ی سنی ۴۹-۳۱) بود و سن متوسط بیماران MSS/MSI-L، ۴۶/۵ سال (بازه‌ی سنی ۶۴-۲۴) بود. بیشتر تومورهای MSI-H از نوع آدنومای کم تمایز یافته (Poorly differentiated adenocarcinoma) تا متوسط تمایز یافته (Moderately differentiated adenocarcinoma) بودند (جدول ۵). فراوان‌ترین تومورهای MSI-L/MSS در طبقه‌ی کاملاً تمایز یافته قرار گرفتند.

پنل Promega: برای بررسی وضعیت میکروستلایت به نمونه‌ی مبتلا به تومور و همچنین به نمونه‌ی طبیعی مجاور آن احتیاج است. ۵ نشانگر تک نوکلئوتیدی کیت Promega و دو نشانگر پنج نوکلئوتیدی آن به روش Multiplex PCR ارزیابی شدند (شکل ۱). در میان ۲۰ نمونه‌ی مبتلا به تومور، ۸ نمونه (۴۰ درصد) ناپایداری بالایی را در نشانگرها نشان دادند و در گروه MSI-H قرار گرفتند و ۱۲ نمونه‌ی دیگر (۶۰ درصد) وضعیت ناپایداری اندک و یا پایداری کامل در نشانگرها را نشان دادند و در گروه MSI-L/MSS قرار گرفتند. در بین این نشانگرهای شبه مونو مورفیک، BAT26 با نشان دادن ناپایداری در هر ۸ تومور MSI-H به عنوان ناپایدارترین نشانگر شناخته شد (۴۰ درصد). هر دو نشانگر NR21 و NR24 در ۷ نمونه (۳۵ درصد) ناپایداری نشان دادند و BAT25 و MONO27 به ترتیب در ۶ نمونه (۳۰ درصد) و ۵ نمونه (۲۵ درصد) ناپایداری نشان دادند.

نتایج واکاوی نشانگر MT1XT20: محصولات نشان‌دار شده با فلورسنت حاصل از واکنش PCR این نشانگر، با استفاده از دستگاه Automated fragment analyzer مورد ارزیابی قرار گرفتند. هر گونه تغییر در الگو با اندازه‌ی پیک‌های نمونه‌ی مبتلا به تومور نسبت به پیک‌های نمونه‌ی طبیعی مجاور آن، به عنوان ناپایداری میکروستلایت در نظر گرفته شد (شکل ۲). در این مطالعه، برای نشانگر MT1XT20، چهار نوع آلل با طول‌های bp ۱۹۰-۱۸۵ پیدا شد. در مقایسه با کیت Promega که به عنوان روش استاندارد طلایی در این آزمون تحت بررسی قرار گرفت، نشانگر MT1XT20، توانست ۵ نمونه از ۸ نمونه‌ی MS-H را به عنوان نمونه‌ی دارای ناپایداری میکروستلایت شناسایی کند و همه‌ی نمونه‌های MSS شناسایی شده توسط این کیت، با استفاده از این روش نیز وضعیتی مشابه نشان دادند.

نتایج آزمایش ایمنوهیستوشیمیایی: از میان ۲۰ خانواده که از طریق معیارهای آمستردام II انتخاب شدند، ۷ پروباند (۳۵ درصد) در حداقل یکی از پروتئین‌های مربوط به سیستم ترمیم ناجور جفت شدگی شان وضعیت عدم بیان نشان دادند و در گروه IHC-A یا IHC-absent طبقه‌بندی شدند. ۱۳ پروباند باقی مانده در هیچ یک از پروتئین‌های مسیر MMR نقصی نداشتند و در گروه IHC-P یا IHC-present group قرار گرفتند (شکل ۳). از میان ۷ نمونه‌ی IHC-A، ۴ نمونه (۷۵ درصد) برای هر دو پروتئین MLH1 و PMS2 وضعیت عدم رنگ پذیری نشان دادند و ۲ نمونه (۲۸/۵ درصد) نیز برای پروتئین‌های MSH2 و MSH6 چنین وضعیتی را نشان دادند. تنها ۱ نمونه از ۷ نمونه (۱۴ درصد) فقدان پروتئین MSH6 را نشان می‌داد.

محاسبه ی حساسیت، اختصاصیت و ارزش پیش‌بینی مثبت: در

مقایسه با کیت Promega به عنوان روش استاندارد طلایی، نشانگر تک نوکلئوتیدی MT1XT20 حساسیتی معادل ۶۲/۵ درصد و اختصاصیتی معادل ۱۰۰ درصد نشان داد و ارزش پیش‌بینی مثبت این نشانگر، ۱۰۰ درصد بود. میزان حساسیت، اختصاصیت و ارزش پیش‌بینی مثبت روش ایمنوهیستوشیمیایی نیز محاسبه شد و به ترتیب برابر ۷۵ درصد، ۹۱/۶۷ درصد و ۸۵/۷۱ درصد بود.

جدول ۱. فراوانی نوع تومور در خانواده‌های ایرانی در معرض خطر سندرم Lynch در گروه‌های MSI-H (Microsatellite instability high) و MMR-deficient (Mismatch repair-deficient)

نوع سرطان	خانواده‌های MMR-deficient	خانواده‌های MSI-H
	فراوانی (درصد)	فراوانی (درصد)
سرطان کولون	۲۷ (۶۴/۲)	۲۸ (۶۵/۵)
سرطان روده‌ی کوچک	۲ (۴/۷)	۳ (۷/۰)
سرطان خون	۳ (۷/۱)	۳ (۷/۰)
سرطان معده	۴ (۹/۵)	۲ (۴/۶)
سرطان سینه	۱ (۲/۳)	۲ (۴/۶)
سرطان پروستات	۲ (۴/۷)	۲ (۴/۶)
سرطان ریه	۱ (۲/۳)	۱ (۲/۳)
سایر سرطان‌ها	۲ (۴/۷)	۲ (۴/۶)
جمع کل	۴۲ (۱۰۰)	۴۳ (۱۰۰)

MMR-deficient: Mismatch repair-deficient; MSI-H: Microsatellite instability high

جدول ۲. فراوانی منطقه‌ی بروز تومور در خانواده‌های ایرانی در معرض خطر سندرم Lynch در گروه‌های MSI-H (Microsatellite instability high) و MMR-deficient (Mismatch repair-deficient)

منطقه‌ی ایجاد تومور	خانواده‌های MMR-deficient	خانواده‌های MSI-H
	فراوانی (درصد)	فراوانی (درصد)
سکوم	۱ (۱۴/۲)	۱ (۱۲/۵)
کولون صعودی	۲ (۲۸/۵)	۲ (۲۵/۰)
کولون عرضی	۱ (۱۴/۲)	۱ (۱۲/۵)
کولون نزولی	۲ (۲۸/۵)	۲ (۲۵/۰)
کولون سیگموئید	۱ (۱۴/۲)	۱ (۱۲/۵)
رکتوم	۰ (۰)	۱ (۱۲/۵)
نامشخص	۰ (۰)	۰ (۰)
جمع کل	۷ (۱۰۰)	۸ (۱۰۰)

MMR-deficient: Mismatch repair-deficient; MSI-H: Microsatellite instability high

جدول ۳. فراوانی نوع تومور در خانواده های ایرانی در معرض خطر سندرم Lynch در گروه‌های MSS/MSI-L (MSI stable/ Microsatellite instability low) و MMR-proficient (Mismatch repair-proficient)

نوع سرطان	خانواده‌های MMR-proficient	خانواده‌های MSS/MSI-L
	فراوانی (درصد)	فراوانی (درصد)
سرطان کولون	۲۳ (۳۴/۳)	۲۲ (۳۳/۳)
سرطان روده‌ی کوچک	۴ (۵/۹)	۳ (۴/۵)
سرطان خون	۱ (۱/۴)	۱ (۱/۵)
سرطان معده	۸ (۱۱/۹)	۱۰ (۱۵/۱)
سرطان سینه	۶ (۸/۹)	۵ (۷/۵)
سرطان پروستات	۳ (۴/۴۷)	۳ (۴/۵)
سرطان ریه	۶ (۸/۹)	۶ (۹/۰)
سایر سرطان‌ها	۱۶ (۲۳/۸)	۱۶ (۲۴/۲)
جمع کل	۶۷ (۱۰۰)	۶۶ (۱۰۰)

MMR-deficient: Mismatch repair-proficient; MSS/MSI-L: MSI stable/ Microsatellite instability low

جدول ۴. فراوانی منطقه‌ی بروز تومور در خانواده‌های ایرانی در معرض خطر سندرم Lynch در گروه‌های MSS/MSI-L (MSI stable/ Microsatellite instability low) و MMR-proficient (Mismatch repair-proficient)

منطقه‌ی ایجاد تومور	خانواده‌های MMR-proficient	خانواده‌های MSS/MSI-L
	فراوانی (درصد)	فراوانی (درصد)
سکوم	۱ (۷/۶)	۱ (۸/۳)
کولون صعودی	۰ (۰)	۰ (۰)
کولون عرضی	۰ (۰)	۰ (۰)
کولون نزولی	۰ (۰)	۰ (۰)
کولون سیگوئید	۶ (۴۶/۱)	۶ (۵۰/۰)
رکتوم	۵ (۳۸/۴)	۴ (۳۳/۳)
نامشخص	۱ (۷/۶)	۱ (۸/۳)
جمع کل	۱۳ (۱۰۰)	۱۲ (۱۰۰)

MMR-deficient: Mismatch repair-proficient; MSS/MSI-L: MSI stable/ Microsatellite instability low

جدول ۵. فراوانی فنوتیپ تومور در خانواده‌های ایرانی مبتلا به سرطان کولون

درجه‌ی تومور	خانواده‌های MSI-L/MSS	خانواده‌های MSI-H
	فراوانی	فراوانی (درصد)
Well differentiated adenocarcinoma	۵ (۴۱/۶)	۲ (۲۵/۰)
Poorly differentiated adenocarcinoma	۳ (۲۵/۰)	۳ (۳۷/۵)
Moderately differentiated adenocarcinoma	۳ (۲۵/۰)	۳ (۳۷/۵)
نامشخص	۱ (۸/۳)	۰ (۰)
جمع کل	۱۲ (۱۰۰)	۸ (۱۰۰)

MSS/MSI-L: MSI stable/ Microsatellite instability low; MSI-H: Microsatellite instability high

بحث

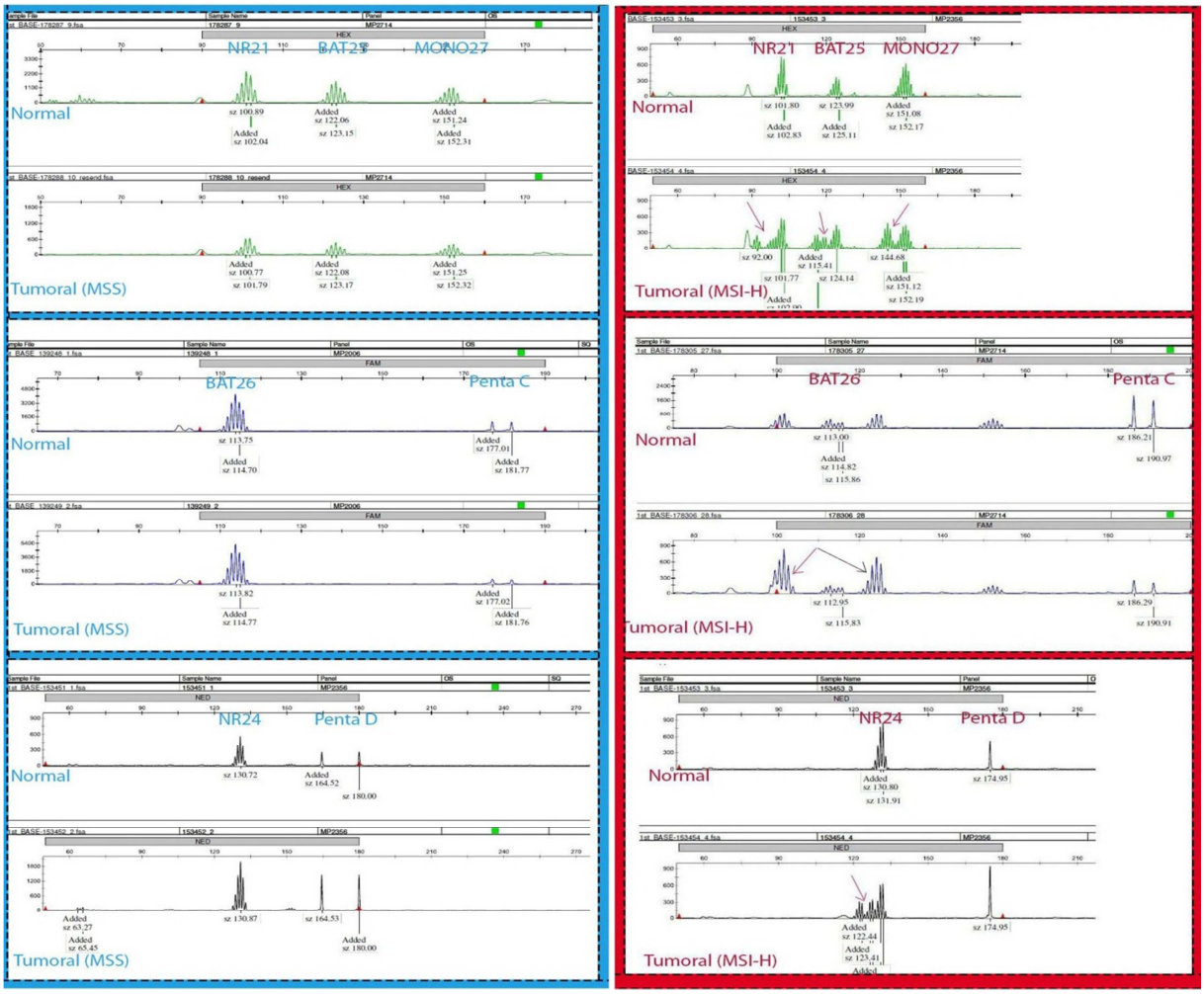
به طور سالیانه، ۷/۹–۶ نفر از هر ۱۰۰۰۰۰ نفر در کشور ایران به سرطان کولون مبتلا می‌گردند که حدود ۴/۹ درصد آن‌ها به عنوان فرد مبتلا به سندرم Lynch شناسایی می‌شوند (۲۸). در حدود ۹۰–۷۰ درصد بیماران مبتلا به سندرم Lynch، وضعیت ناپایداری میکروستلایت را نشان می‌دهند (۲۹). سندرم Lynch، نوعی از سندرم سرطان است و به دلیل جهش در ژن‌های دخیل در مسیر ترمیمی ناجور جفت شدگی رخ می‌دهد. مهم‌ترین این ژن‌ها عبارت از MLH1، MSH2، MSH6 و PMS2 هستند.

در حال حاضر، استفاده‌ی همزمان از آنالیز ناپایداری میکروستلایت و آزمایش ایمنوهیستوشیمیایی، روشی موثق و با حساسیت بالا برای غربال‌گری بیماران مبتلا به سندرم Lynch می‌باشد. استفاده از روش ایمنوهیستوشیمیایی به تنهایی قادر به تشخیص بیماران مبتلا به Lynch با جهش‌های تغییر چارچوب، جایگاه پیرایش و بازآرایی‌های بزرگ ژنومی نمی‌باشد؛ چرا که در این نوع جهش‌ها، پروتئین تولید می‌شود، اما از کارایی کافی برخوردار نیست (۱۵، ۱۳). روش جایگزین یعنی آنالیز ناپایداری میکروستلایت، که امروزه به عنوان روشی لازم‌الاجرا شناخته می‌شود، این نقص موجود در روش ایمنوهیستوشیمیایی را بر طرف کرده است (۳۰).

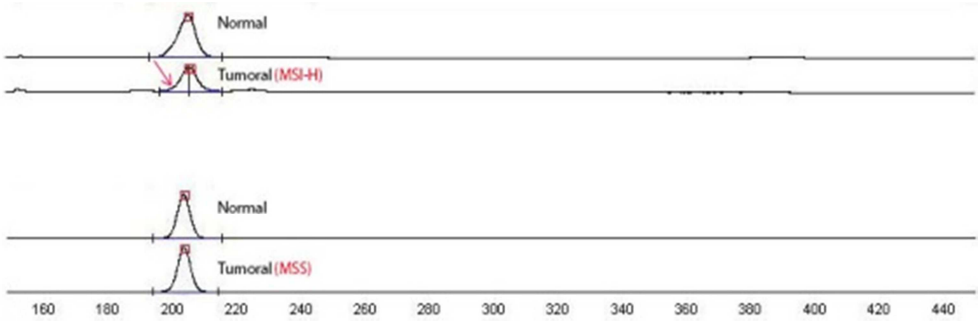
بر خلاف روش ایمنوهیستوشیمیایی که به تعداد زیادی برش از نمونه احتیاج دارد، روش ارزیابی MSI بر پایه‌ی PCR استوار است و بنا بر این، با مقادیر اندکی از نمونه نیز قابل انجام می‌باشد. از طرف دیگر، روش MSI، در مقایسه با روش ایمنوهیستوشیمیایی به عنوان روشی غیر مستقیم شناخته شده و نمی‌تواند تعیین کند که کدام پروتئین مسیر MMR دچار نقصان شده است (۳۱).

برای بررسی وضعیت MSI، پنل‌های چند نشانگری متعددی ارایه شده است (۲۰)، اما تلاش برای ارایه‌ی نشانگرهای تک نوکلئوتیدی جایگزین، با حساسیت و اختصاصیتی مشابه با این پنل‌ها ادامه دارد تا بتوان وضعیت MSI را در زمان کوتاه‌تر و هزینه‌ی کمتر مورد بررسی قرار داد (۳۳–۳۲، ۲۵، ۱۰). در برخی از مطالعات، نشانگر CAT25 حساسیت و اختصاصیت بالایی را در مقایسه با پنل‌های چند نشانگری نشان داد (۲۵–۲۴). استفاده از نشانگر CAT25 به تنهایی یا همراه با نشانگر BAT26 به عنوان پنلی ساده برای بررسی وضعیت MSI پیشنهاد شده است (۲۴، ۱۰). در مطالعه‌ای که بر روی بیماران مبتلا به سرطان کولون ایرانی صورت گرفت، میزان دقت پنج نشانگر مونو مورفیک NR-27، NR-21،

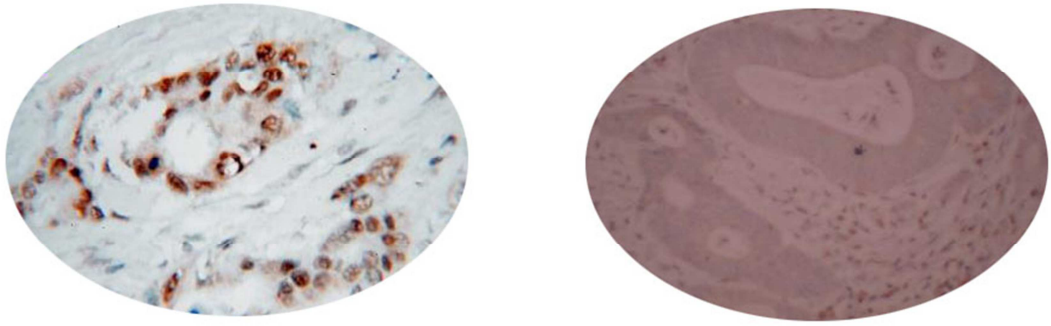
NR-24، BAT-25 و BAT-26 ارزیابی شد و از میان آن‌ها، دو نشانگر BAT25 و NR-21 به عنوان حساس‌ترین نشانگرها معرفی شدند (۳۴). این در حالی است که کارایی نشانگر BAT25 توسط سایر پژوهشگران مورد سؤال قرار گرفته است (۳۵) و در عوض، نشانگر BAT26 به عنوان معتبرترین نشانگر برای ارزیابی وضعیت MSI معرفی شده است (۳۶، ۲۱).



شکل ۱. الکتروفروگرام DNA سیستم ارزیابی ناپایداری میکروستلایت Promega (نرم افزار GeneMapper v3.7) وضعیت پایدار میکروستلایت را در بافت مبتلا به تومور و بافت طبیعی مجاور آن در سمت چپ و وضعیت ناپایدار میکروستلایت را در بافت مبتلا به تومور و بافت طبیعی مجاور آن در سمت راست نشان می‌دهد.



شکل ۲. نمونه‌ای از تغییر وضعیت آللی MT1XT20 در یک نمونه‌ی MSI-H (Microsatellite instability high)



شکل ۳. رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمیایی بافت MMR-deficient (Mismatch repair-deficient) (در سمت راست) و بافت MMR-proficient (Mismatch repair-proficient) (در سمت چپ) که با استفاده از آنتی‌بادی MSH2 صورت گرفته است (تحت لنز ۴۰ × میکروسکوپ)

در سال‌های اخیر، Morandi و همکاران، وضعیت MSI را در ۳۴۰ بیمار مبتلا به سرطان کولون از طریق سه واکنش Multiplex PCR و با استفاده از ۱۶ نشانگر بررسی کردند. این نشانگرهای شبه مونومورفیک عبارت از BAT25، BAT26، TGFBR2، MybT22، BAT40، MT1XT20، NR21، NR24، CAT25، D2S123، D5S346، D17S250، D18S58، CSF1PO، D7S820 و D18S51 بودند. از میان این نشانگرها، MT1XT20 حساسیت بالایی را (۹۷/۳ درصد) در مقایسه با نشانگرهای BAT26 (۹۷/۵ درصد) و CAT25 (۹۷/۱ درصد) نشان داد (۲۶). با توجه به وجود نتایج متناقض برخی از مطالعات در رابطه با نشانگر BAT26، در این مطالعه هر دو روش معتبر فعلی غربال‌گری بیماران مبتلا به سندرم Lynch یعنی MSI (شامل نشانگرهای BAT26، NR24، NR21، BAT25 و MONO 27) و ایمنوهیستوشیمی به همراه روش تک نوکلئوتیدی MT1XT20 مورد سنجش قرار گرفت. با به کارگیری پنل پنج نشانگری Promega، ۸ بیمار (۴۰ درصد) از ۲۰ بیمار مبتلا به سرطان کولون که اطلاعات آن‌ها با معیارهای آمستردام II مطابقت داشت، به عنوان MSI-H شناسایی شدند. این در حالی است که با استفاده از روش ارزیابی تک نوکلئوتیدی، تنها ۵ بیمار وضعیت ناپایداری در توالی میکروستلایت را نشان دادند (۲۵ درصد). عدم تطابق نتایج سنجش وضعیت میکروستلایت با استفاده از نشانگر تک نوکلئوتیدی MT1XT20 در مطالعه ی جمعیت ایتالیایی و مطالعه ی حاضر، بر تفاوت‌های ژنتیکی جمعیت ایرانی و ایتالیایی دلالت دارد.

علاوه بر این، با استفاده از روش سنجش ایمونوهیستوشیمیایی، ۷ نمونه (۳۵ درصد) وضعیت فقدان پروتئین‌های MMR را نشان دادند. ۴ نمونه از این ۷ نمونه دچار نقص در هر دو پروتئین MLH1/PMS2 بودند و ۲ نمونه نیز دارای نقص در پروتئین‌های MSH2/MSH6 بودند. تنها یک نمونه از این ۷ نمونه، وضعیت عدم بیان را تنها در یک پروتئین سیستم MMR (MSH6) نشان داد که می‌توان کم بودن تعداد بیماران دارای نقص در MSH6 را با پدیده‌ی Functional redundancy پروتئین‌های MSH6 و MSH3 توجیه کرد (۲). در مجموع و با توجه به نتایج به دست آمده از هر سه روش سنجش بیماران مشکوک به HNPCC، به نظر می‌رسد استفاده از کیت پنج نشانگری Promega، بایستی در اولویت قرار گیرد؛ چرا که از دقت عملکرد بالاتری نسبت به دو روش IHC و سنجش تک نشانگری برخوردار است.

همچنین، در این مطالعه از میان نشانگرهای تک نوکلئوتیدی موجود در پنل Promega، نشانگر BAT26 به عنوان ناپایدارترین نشانگر شناخته شد؛ چرا که، در ۱۰۰ درصد بیماران MSI-H وضعیت ناپایداری را نشان داد. این در حالی است که نشانگر MONO27 با نشان دادن وضعیت ناپایداری در ۵ نمونه از ۸ نمونه‌ی MSI-H، به عنوان پایدارترین نشانگر شناخته شد. نتایج متناقضی در مطالعات مشابه ایرانی به دست آمده است: یک گروه از پژوهشگران ایرانی با مطالعه بر روی ۸۰ نمونه از بیماران مبتلا به سرطان کولون اسپورادیک، نشانگرهای NR-21 و NR-24 را با ۴۵ درصد ناپایداری به عنوان ناپایدارترین نشانگرها معرفی کردند (۳۷) و گروه دیگر با مطالعه بر روی بیماران مبتلا به سندرم Lynch و سرطان کولون اسپورادیک، نشانگر NR-21 را به عنوان ناپایدارترین نشانگر در هر دو گروه بیماران، به ترتیب با ناپایداری در ۲۵/۶ درصد و ۵۳ درصد معرفی کردند (۳۸). دلیل تفاوت در نتایج به دست آمده در هر کدام از نشانگرهای پنل Promga، می‌تواند توضیح دهنده‌ی این مسأله باشد که تمام میکروستلایت‌های ژنوم، طی پدیده‌ی نقص در سیستم ترمیم ناجور جفت شدگی، به یک اندازه دستخوش تغییر نمی شوند. با این حال، بالا بودن دقت و اعتبار نشانگر BAT26 در مطالعات قبلی و در ژنوم جمعیت های مختلف جهان به اثبات رسیده بود (۲۱, ۳۶) و در این مطالعه نیز به اثبات رسید. بنا بر این، می‌توان به این نتیجه

رسید که BAT26 نشانگری بسیار قابل اعتماد برای تشخیص وضعیت MSI است و می‌تواند چه به صورت تکی و چه به صورت جزیی از پنل‌های تشخیصی، برای روشن ساختن وضعیت MSI بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال به کار رود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد نجمه فراهانی به شماره‌ی ؟؟؟ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد و هزینه‌های اجرای آن توسط دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تامین گردیده است.

References

1. Lynch HT, Boland CR, Gong G, Shaw TG, Lynch PM, Fodde R, et al. Phenotypic and genotypic heterogeneity in the Lynch syndrome: diagnostic, surveillance and management implications. Eur J Hum Genet 2006; 14(4): 390-402.
2. Zeinalian M, Emami MH, Salehi R, Naimi A, Kazemi M, Hashemzadeh-Chaleshtori M. Molecular analysis of Iranian colorectal cancer patients at risk for Lynch syndrome: a new molecular, clinicopathological feature. J Gastrointest Cancer 2015; 46(2): 118-25.
3. Boland CR. The mystery of mismatch repair deficiency: lynch or lynch-like? Gastroenterology 2013; 144(5): 868-70.
4. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. Nature 1993; 363(6429): 558-61.
5. Thibodeau SN, French AJ, Roche PC, Cunningham JM, Tester DJ, Lindor NM, et al. Altered expression of hMSH2 and hMLH1 in tumors with microsatellite instability and genetic alterations in mismatch repair genes. Cancer Res 1996; 56(21): 4836-40.
6. Chaksangchaichot P, Punyarit P, Petmitr S. Novel hMSH2, hMSH6 and hMLH1 gene mutations and microsatellite instability in sporadic colorectal cancer. J Cancer Res Clin Oncol 2007; 133(1): 65-70.
7. Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Res 1989; 17(16): 6463-71.
8. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. N Engl J Med 2003; 348(10): 919-32.
9. Fukutomi Y, Moriwaki H, Nagase S, Tajika M, Naito T, Miwa Y, et al. Metachronous colon tumors: risk factors and rationale for the surveillance colonoscopy after initial polypectomy. J Cancer Res Clin Oncol 2002; 128(10): 569-74.
10. Deschoolmeester V, Baay M, Wuyts W, Van Marck E, Van Damme N, Vermeulen P, et al. Detection of microsatellite instability in colorectal cancer using an alternative multiplex assay of quasi-monomorphic mononucleotide markers. J Mol Diagn 2008; 10(2): 154-9.
11. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. N Engl J Med 2003; 349(3): 247-57.
12. Rodriguez-Bigas MA, Moeslein G. Surgical treatment of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome). Fam Cancer 2013; 12(2): 295-300.
13. Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. J Mol Diagn 2008; 10(4): 293-300.
14. Ward R, Meldrum C, Williams R, Mokany E, Scott R, Turner J, et al. Impact of microsatellite testing and mismatch repair protein expression on the clinical interpretation of genetic testing in hereditary non-polyposis colorectal cancer. J Cancer Res Clin Oncol 2002; 128(8): 403-11.
15. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. Cancer Res 1998; 58(22): 5248-57.
16. Bacher JW, Flanagan LA, Smalley RL, Nassif NA, Burgart LJ, Halberg RB, et al. Development of a fluorescent multiplex assay for detection of MSI-High tumors. Dis Markers 2004; 20(4-5): 237-50.
17. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Ruschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. J Natl Cancer Inst 2004; 96(4): 261-8.
18. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. Gastroenterology 1999; 116(6): 1453-6.
19. Patil DT, Bronner MP, Portier BP, Fraser CR, Plesec TP, Liu X. A five-marker panel in a multiplex PCR accurately detects microsatellite instability-high colorectal tumors without control DNA. Diagn Mol Pathol 2012; 21(3): 127-33.
20. Buhard O, Cattaneo F, Wong YF, Yim SF, Friedman E, Flejou JF, et al. Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors. J Clin Oncol 2006; 24(2): 241-51.
21. Xicola RM, Llor X, Pons E, Castells A, Alenda C, Pinol V, et al. Performance of different microsatellite marker panels for detection of mismatch repair-deficient colorectal tumors. J Natl Cancer Inst 2007; 99(3): 244-52.
22. de la Chapelle A. Microsatellite instability phenotype of tumors: genotyping or immunohistochemistry? The jury is still out. J Clin Oncol 2002; 20(4): 897-9.
23. Woerner SM, Gebert J, Yuan YP, Sutter C, Ridder R,

Bork P, et al. Systematic identification of genes with coding microsatellites mutated in DNA mismatch repair-deficient cancer cells. Int J Cancer 2001; 93(1): 12-9.
24. Findeisen P, Kloor M, Merx S, Sutter C, Woerner SM, Dostmann N, et al. T25 repeat in the 3' untranslated region of the CASP2 gene: a sensitive and specific marker for microsatellite instability in colorectal cancer. Cancer Res 2005; 65(18): 8072-8.
25. Bianchi F, Galizia E, Catalani R, Belvederesi L, Ferretti C, Corradini F, et al. CAT25 is a mononucleotide marker to identify HNPCC patients. J Mol Diagn 2009; 11(3): 248-52.
26. Morandi L, de Biase D, Visani M, Monzoni A, Tosi A, Brulatti M, et al. T([20]) repeat in the 3'-untranslated region of the MT1X gene: a marker with high sensitivity and specificity to detect microsatellite instability in colorectal cancer. Int J Colorectal Dis 2012; 27(5): 647-56.
27. Pikor LA, Enfield KS, Cameron H, Lam WL. DNA extraction from paraffin embedded material for genetic and epigenetic analyses. J Vis Exp 2011; (49).
28. Nemati A, Rahmatabadi ZK, Fatemi A, Emami MH. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer and familial colorectal cancer in Central part of Iran, Isfahan. J Res Med Sci 2012; 17(1): 67-73.
29. Fishel R. Signaling mismatch repair in cancer. Nat Med 1999; 5(11): 1239-41.
30. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. Gastroenterology 2010; 138(6): 2073-87.
31. Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, Goldberg RM, Cunningham JM, Sargent DJ, et al. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. J Clin Oncol 2002; 20(4): 1043-8.
32. Bouzourene H, Taminelli L, Chaubert P, Monnerat C, Seelentag W, Sandmeier D, et al. A cost-effective algorithm for hereditary nonpolyposis colorectal cancer detection. Am J Clin Pathol 2006; 125(6): 823-31.
33. Brennetot C, Buhard O, Jourdan F, Flejou JF, Duval A, Hamelin R. Mononucleotide repeats BAT-26 and BAT-25 accurately detect MSI-H tumors and predict tumor content: implications for population screening. Int J Cancer 2005; 113(3): 446-50.
34. Haghighi MM, Javadi GR, Parivar K, Milanizadeh S, Zali N, Fatemi SR, et al. Frequent MSI mononucleotide markers for diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Asian Pac J Cancer Prev 2010; 11(4): 1033-5.
35. Ichikawa A, Sugano K, Fujita S. DNA variants of BAT-25 in Japanese, a locus frequently used for analysis of microsatellite instability. Jpn J Clin Oncol 2001; 31(7): 346-8.
36. Esemuede I, Forslund A, Khan SA, Qin LX, Gimbel MI, Nash GM, et al. Improved testing for microsatellite instability in colorectal cancer using a simplified 3-marker assay. Ann Surg Oncol 2010; 17(12): 3370-8.
37. Esmailnia G, Montazer-Haghighi M, Javadi Gh, Parivar K, Zali M. Microsatellite instability markers status in colorectal cancer. Zahedan J Res Med Sci 2014; 16(2): 25-8.
38. Shemirani AI, Haghighi MM, Zadeh SM, Fatemi SR, Taleghani MY, Zali N, et al. Simplified MSI marker panel for diagnosis of colorectal cancer. Asian Pac J Cancer Prev 2011; 12(8): 2101-4.

Journal of Isfahan Medical School

Vol. 33, No. 362, 2nd Week, Februaty 2016

Received: 07.11.2015

Accepted: 07.01.2016

MT1XT20 Single Quasi-Monomorphic Mononucleotide Marker for Detection of Microsatellite Instability in Iranian Patients with Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC)

Najmeh Farahani[1], Parvaneh Nikpour PhD[2], Mohammad Hassan Emami MD[3], Morteza Hashemzadeh PhD[4], Mehrdad Zeinalian MSc[5], Rasoul Salehi PhD[6]

Original Article

Abstract

Background: Colorectal malignancies with high microsatellite instability (MSI-H), either hereditary or sporadic, demonstrate better prognosis, altered response to fluorouracil (5FU) chemotherapy and altered operative approach. It is now recommended to perform MSI testing for all new cases of colorectal cancers regardless of being categorized as hereditary or sporadic. This study aimed to evaluate MT1XT20 mononucleotide marker in Iranian patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). The samples were further characterized using Promega five-marker MSI testing panel and immunohistochemical (IHC) technique.

Methods: MT1XT20 mononucleotide marker and commercially available kit (Promega, USA) incorporating five quasi-monomorphic markers were studied in 20 cases of HNPCC using polymerase chain reaction (PCR) technique. IHC was performed to evaluate the status of all four important mismatch repair (MMR) proteins, too.

Findings: Eight (40%), seven (35%) and five (25%) cases showed MSI using Promega kit, IHC and MT1XT20, respectively. Among the markers included in Promega kit, BAT26 marker with instability in all 8 samples (100%) was the most instable marker. NR24 and NR21 markers showed instability in 7 cases (87.5%); BAT25 and MONO 27 markers were instable in 6 (75.0%) and 5 (62.5%) specimens, respectively.

Conclusion: Although MT1XT20 is considered as a valid single marker in Italian population, it seems this is not hold true about the Iranian patients. Instead, BAT26 among the markers included in Promega MSI testing was shown instability in all 8 samples of MSI-H colorectal cancer (CRC). Therefore, it may be concluded that BAT26 alone is as efficient as the cohort of five markers in Iranian patients.

Keywords: Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC), Microsatellite instability (MSI), MT1XT20, Quasi-monomorphic repeats

Citation: Farahani N, Nikpour P, Emami MH, Hashemzadeh M, Zeinalian M, Salehi R. **MT1XT20 Single Quasi-Monomorphic Mononucleotide Marker for Detection of Microsatellite Instability in Iranian Patients with Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC).** J Isfahan Med Sch 2016; 33(362): 2120-30

1- MSc Student, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Associate Professor, Poursina Hakim Gastrointestinal Research Center, Poursina Hakim Research Institution AND Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Professor, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
5- PhD Student, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
6- Associate Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Rasoul Salehi PhD, Email: r_salehi@med.mui.ac.ir