Downloaded from journal.gums.ac.ir at 0:54 IRST on Saturday November 17th 2018

غربالگری غیر تهاجمی مارکر تومور S249C ژن $FGFR_3$ به روش TETRA-ARMS-PCR در سلول‌های اپی‌تلیال ادراری در بدخیمی مثانه

سحر غفوری (MSC)[1]- *دکتر علی ناظمی (PhD)[1]- دکتر غلامرضا مختاری (MD)[2]

*نویسنده مسئول: گروه ژنتیک، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی تنکابن، تنکابن، ایران

پست الکترونیک: Alinazemy@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله:۹۶/۱۲/۱۳ تاریخ ارسال جهت اصلاح:۹۷/۰۲/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۵/۰۱

چکیده

مقدمه: تغییر ژنتیکی ژن $FGFR_3$ یکی از عوامل مؤثر در ابتلای به سرطان مثانه است. $FGFR_3$ گیرنده‌ی تیروزین‌کیناز دخیل در کنترل چرخه‌ی سلولی و رگ‌زایی است. بررسی‌های پیشین نشان می‌دهد که جهش‌های فعال‌کننده ژن $fgfr_3$ در بیش از ۵۰ درصد کارسینومای اولیه سلول اپی‌تلیال مثانه وجود دارد و از این روی می‌تواند به عنوان مارکر تومور در شناسایی زود هنگام سرطان مثانه کاربرد داشته باشد.

هدف: غربالگری غیرتهاجمی، شناسایی جهش S249C در ژن $FGFR_3$ به روش tetra primers Arms PCR و تعیین ارتباط بین حضور این جهش و مراحل اولیه‌ی سرطان مثانه در شمال کشور.

مواد و روش‌ها: در این مطالعهٔ تجربی سلول‌های اپی‌تلیال ادرار ۱۰۰ بیمار دچار تومور مثانه جدا شده و DNA آنها با استفاده از کیت تجاری بیرون آوری شد.پس از مطالعات بیوانفورماتیک، آغازگرهای با جفت بازهای اشتباه مناسب برای جهش S249C نمودارسازی و شناخته شد و پس از بهینه سازی واکنش، غربال‌گری بر جمعیت مورد مطالعه و آنالیز آماری داده‌ها با نرم‌افزار SPSS انجام شد.

نتایج: پرایمرهای ارمز طراحی شده می‌تواند به خوبی الل‌های طبیعی و جهش یافته تومور مارکر S249C را از یکدیگر جدا کند. از ۱۰۰ نمونه، در ۲۸ مورد جهش S249C شناسایی شد. آنالیز آماری داده‌ها نشان از معنی‌دار بودن جهش S249C دارد.($p<۰/۰۰۰۱$)

نتیجه‌گیری: با توجه به غیرتهاجمی بودن و حساسیت بالای روش مولکولی توسعه یافته در این تحقیق می‌توان از آن به عنوان روش غربالگری اولیه در شناسایی زود به هنگام سرطان مثانه استفاده کرد.

کلید واژه‌ها: تومورهای بیو مارکر/ ژن‌ها/ سرطان‌های مثانه/ سلول‌های اپی‌تلیوم

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره بیست و هفت، شماره ۱۰۷، صفحات: ۱۸-۱۰

مقدمه

سرطان مثانه یک بیماری شایع در جهان، هتروژن و با پیش‌آگهی دشوار است(۲-۱). همچنین دومین سرطان شایع دستگاه ادراری_ تناسلی و چهارمین سرطان در مردان و نهمین سرطان در زنان است(٤-۳). در کشور ما نیز بین تومورهای شایع در مردان رتبه‌ی چهارم را دارد(۵). بیش از ۹۸درصد موارد منشأ اپی‌لتیال دارد که از این میان، ۹۰درصد از نوع ترانزیشنال است(٦). تومورهای پاپیلاری رایج‌ترین شکل سرطان مثانه هستند(۷). این بیماری در تمامی نژادها وجود دارد و بروز آن با افزایش سن افزایش می‌یابد(۸). مهم‌ترین عامل خطر که تأثیر آن در تومور مثانه اثبات شده مصرف سیگار و رویارویی شغلی با کارسینوژن‌های اوریتلیال است و مصرف سیگار نیز ۲ تا ٤ برابر خطر ابتلای به تومور مثانه را افزایش می‌دهد(۱۳-۹).

تومورهای مثانه را می‌توان برپایه رفتارهای هیستوپاتولوژی و بالینی به دو گروه غیرمهاجم به عضله و مهاجم رده‌بندی کرد(١٤). بیش از ۷۰درصد همه موارد تومور مثانه و ۹۰درصد کارسینومای سلول ترانزیشنال(TCC) (Transitional Cell Carcinoma)غیرمهاجم به عضله هستند(١٦-١٥). هماچوری رایج‌ترین نشانه در بیش از ۸۵درصد بیماران دچار سرطان مثانه است(۱۷). تشخیص نخست تومورهای مثانه با سیستوسکوپی و رزکسیون از پیشابراه (TUR) بوده که حساسیتی معادل ۷۳درصد دارد(۱۸). از جراحی، شیمی درمانی و رادیوتراپی برای درمان استفاده می‌شود(۱۹). هم‌اکنون برداشتن تومور از راه پیشابراه (TURBT) درمان اصلی تومورهای سطحی(NMIBC) Non-muscle Invasive Bladder Cancer است(۱۳و١٤) ولی در دو سوم آنها عود دوباره وجود دارد(۲۰). از مهم‌ترین عواملی که مستعد بودن

۱. گروه ژنتیک، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی تنکابن، تنکابن، ایران

۲. مرکز تحقیقات اورولوژی، بیمارستان رازی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، گیلان، ایران

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 0:54 IRST on Saturday November 17th 2018

جمعیت برای ابتلای به بیماری‌های مختلف مانند بدخیمی را رقم می‌زند، تفاوت‌های ژنتیکی افراد است. مطالعات تنوع‌های ژنتیکی، بسیاری از عوامل موثر در بروز سرطان را شناسایی و راهکارهایی را برای شناسایی و پیشگیری پیشنهاد می‌کند(۲۱). تغییرات ژنتیک و اپی‌ژنتیک در سرطان‌ها مانند تومور مثانه موجب بی‌نظمی در پیام‌رسانی و در نتیجه ایجاد و پیشرفت سرطان می‌شود(۲۲). تغییر مولکولی در ژن‌های مسیرهای پیام رسانی مرتبط با مسیر (فسفاتیدیل اینوزیتول ۳-کیناز) PI_3K نیز در سرطان نقش دارد که از میان آنها می‌توان به FGF/FGFR اشاره کرد که برخی از اعضای این مسیرها به عنوان هدف درمانی مطرح هستند. تغییراتی همچون جهش، پیرایش غیرمتعارف و تکثیر ژنی اعضای این مسیر در سرطان گزارش شده است(۲۵-۲۳). گیرنده‌ی فاکتور رشد فیبروبلاست ۳ [۳] ($FGFR_3$) یکی از مهم‌ترین مشخصه‌ها در سرطان مثانه است(۲۶). این پروتئین در انواع مختلفی از بیماری‌ها و سرطان‌ها و ناهنجاری‌های رشد غضروف شرکت دارد. این فاکتور گیرنده‌ی تیروزین کیناز دخیل در کنترل چرخه‌ی سلولی و رگزایی است(۲۰). DNA ژنومی $FGFR_3$، نزدیک kb ۱۶/۵ وسعت دارد. این ژن از ۱۹ اگزون و ۱۸ اینترون تشکیل شده است و روی کروموزوم شماره‌ی ٤ و در جایگاه۳P۱٦/ قرار دارد(۲۹). ۹۷درصد از جهش‌های شایع $FGFR_3$ در تومور مثانه در اگزون‌های ۷ (کدون‌های ۲٤۸ و ۲٤۹)، اگزون ۱۰ (کدون‌های ۳۷۲ و ۳۷۳ و ۳۷۵) و اگزون ۱۵ (کدون ٦٥۲) رخ می‌دهد که باعث دایمریزاسیون و فعالسازی مستقل از لیگاند می‌شود(۳۰). FGFR1,2 نقش مهمی در تکثیر سلولی و تمایز رشد جنینی ایفا می‌کنند. ایزوفروم‌های این ژن به $fgfR_3b$ در سلول‌های اپی‌تیلیال و $fgfR_3C$ هستند که در غضروف بیان می‌شوند. به دلیل حساسیت بالای این روش و با توجه به حضور سلول‌های توموری در ادرار، به نظر می‌رسد کاربرد این روش در مراکز بالینی بهتر باشد. همچنین، برای پیشگیری از تکرار سیستوسکوپی استفاده از روش PCR می‌تواند جایگزین بهتری باشدکه با توجه به مطالعه‌ی بر تومورهای اولیه می‌تواند در تشخیص زود هنگام و پیش آگهی موثر باشد(۳۳-۳۱).

با توجه به فعالیت پیاپی جهش‌های $FGFR_3$ در سرطان‌های مثانه و حضور آن در بیش از ۵۰درصد از کارسینومای اولیه‌ی سلول‌های یوریتلیال مثانه در درجه و مرحله‌ی پایین تومورهای پاپیلاری، پیشنهاد شد که این ژن در تومورهای اپی‌تلیال درگیر هستند. برپایه مطالعه‌ی دودورگا و همکاران در ۲۰۱۱ در ترکیه، ٥٦ فرد دچار تومور مثانه به روش RFLP بررسی شدند که از جهش‌های T375C،S249C،A248C و T372C ژن $FGFR_3$، جهش S249C در ۵۰درصد افراد مبتلا وجود داشت و همچنین بررسی‌ها نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین جهش‌های $FGFR_3$ با جنس و سن بیمار وجود ندارد(۲۷). در مطالعه کمپیر و همکاران جهش‌های دیگر ژن $FGFR_3$ به روش SNOPSHOT در ۲۵۷ نمونه بافت بیماران دچار تومور مثانه بررسی شد که جهش T375C در ۲۷ نمونه و جهشG370C در ۷ نمونه دیده شد(۳٤). گاست و همکاران در آمریکا جهش‌های ژن $FGFR_3$ را در ۱۵۳ نمونه بافت توموری به روش وسترن بلات و REAL TIME PCR بررسی کردند که در این مطالعه تومورهای درجه پایین و غیرمهاجم به عضله ٤ برابر بیش از تومورهای درجه بالا و مهاجم به عضله بود. جهش‌ها در اگزون ۷ و ۱۰ در ۲٦درصد نمونه‌ها و ٥٦درصد تومورهای درجه پایین وجود داشت(۱٤).

با توجه به این که تاکنون مطالعه‌ای مبنی بر استفاده از این روش برای شناسایی جهش S249C ژن $FGFR_3$ به روش غیرتهاجمی در سلول‌های اپی‌تلیال ادرار در ایران انجام نشده است، این مطالعه با هدف بررسی ارتباط جهش S249C ژن $FGFR_3$ صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش ۱۰۰ فرد مبتلا به تومور مثانه بررسی شدند. نمونه‌های بیمارن از مراکز درمانی شمال کشور (بیمارستان رازی رشت، شهید بهشتی بابل و امام ساری) در طی ۸ ماه از بهمن ۹۵ تا شهریور ۹٦ گرد آوری شد. ابتلای به تومور مثانه در بیماران بنا به تشخیص پزشک اورولوژی بود و برپایه نتایج آسیب‌شناسی نمونه بیوپسی از بافت مثانه شناسایی شد. همه افراد در این پژوهش پیش از ورود به مطالعه، فرم رضایت

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 0:54 IRST on Saturday November 17th 2018

نامه‌ی تدوین شده را امضا کردند و همچنین داده‌های لازم در مورد سرشت پژوهش در اختیار آنها قرار داده شد. از افراد نمونه‌ی ادرار تهیه شد. نمونه‌ها با ۵۰۰۰ دور بر ثانیه(RPM) و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد، سپس، محلول رویی را دور ریخته و به رسوب آن ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰درصد اضافه شد و به فریز ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای آزمایش و مطالعات ژنتیکی منتقل شد. استخراج DNA از سلول‌های اپی‌تلیال ادراری با کیت شرکت PZP و براساس پروتکل مربوطه انجام شد. کیفیت باندهای حاصل از DNA استخراج شده توسط الکتروفورز آگارز ۱درصد بررسی و برای بررسی جهش S249C ژن $FGFR_3$ از روش ARMS-PCR با پنج آغازگر اختصاصی استفاده شد. آغازگرها با نرم‌افزار Oligo نسخه۷ (molecular Biology In Sights Inc, ca Scade co, USA) طراحی شدند. برای تشخیص محل دقیق پیوند این آغازگرها به ژن $FGFR_3$، توالی ژن در سایت NCBI تعیین و همچنین، ویژگی‌های آغازگرها و دمای ذوب آنها با برنامه‌ی BLAST ارزیابی شد. داده‌های آغازگرها درجدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱. مشخصات آغازگرها

پرایمر	توالی(5'→3')	طول (nt)	دمای ذوب(°C)	محتوای GC(%)
FN	GCG CGG CGG GGT GGC TCT	۱۸	۷۲ °C	۸۳/۳
RN	GGA TGG GCC GGT GCG GGG	۱۸	۷۲ °C	۸۳/۳
FM	TGG CAG CAT CCG GCA GAC GTA CAC	۲۴	۷۲ °C	۶۲/۵
RM_1	GGA TGG GCC GGT GCG GGC	۱۸	۷۲ °C	۸۳/۳
RM_2	GGA TGG GCC GGT GCG GGA	۱۸	۷۲ °C	۷۷/۸

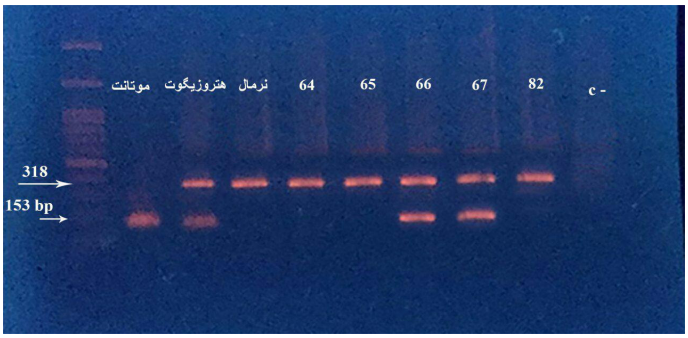
هر واکنش ۲۵uL شامل DNA ژنومی با غلظت ۲۵۰ نانوگرم، آغازگر با غلظت ۱۰ پیکومول (محصول شرکت Tag Copenhagen A/S دانمارک) بافر X ۱ (محصول شرکت AMPLICON دانمارک) به حجم رسانده شد. برنامه‌ی PCR شامل ۵ دقیقه واسرشت‌سازی نخستین در دمای ۹۵°C، ۴۰ چرخه با برنامه‌ی ۹۵°C (۴۰ ثانیه)، ۷۲°C (۳۰ ثانیه) و در پایان به مدت ۵ دقیقه در ۷۲°C در دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad) تنظیم شد. سپس فرآورده‌های PCR بر ژل آگارز ۲درصد حاوی ژل رد با ولتاژ ۷۰ الکتروفورز گردید و آشکارسازی باندها در دستگاه Gel Documetation انجام شد.

آنالیز آماری: آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار SPSS و فراوانی جهش سنجیده شد. برای بررسی معنی‌دار بودن جهش، آزمون chi-square به کار گرفته و $p<0/0001$ نشان دهنده‌ی معنی‌دار بودن جهش S249C در نظر گرفته شد. همچنین، از odd Ratio و ۹۵CIدرصد برای بررسی تاثیر جهش ژن $FGFR_3$ در بروز بیماری استفاده شد.

نتایج

پس از استخراج DNA ژنومی از سلول‌های اپی‌تلیال جدا شده از ادرار ۱۰۰ فرد مورد مطالعه، شناسایی جهش S249C ژن $FGFR_3$ به روش tetra Arms PCR انجام شد. گستره سنی بیماران ۸۰-۴۰ سالگی بود که ۸۹ نفر مرد و ۱۱ نفر زن بودند(جدول ۲). پس از واکاوی داده‌های حاصل از واکنش PCR نشان داده شد که ۲۸درصد بیماران جهش S249C را داشتند. نتایج در شکل(۱) آورده شده است.

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 0:54 IRST on Saturday November 17th 2018



شکل ۱. تصویر آگارز ۲٪ محصولات ARMS-PCR نمونه‌های ٦٤-٦٥-٦٦-٦٧-٨٢ جهش S249C

جدول ۲. مشخصات بالینی بیماران مبتلا به سرطان مثانه

متغیر		افراد بیمار
تعداد کلی		۱۰۰
محدوده‌ی سنی (سال)		۸۰-۴۰
جنس (تعداد)	مرد	۸۹
	زن	۱۱
سطح تومور (تعداد)	۱	۸۴
	۲	۱۰
	۳	۹
وضعیت تهاجم به عضله (تعداد)	مهاجم	۹
	غیرمهاجم	۱

نتایج نشان داد که بین افراد مورد مطالعه، بروز جهش S249C از نظر آماری معنی‌دار است (p<۰/۰۰۱) OR=۰/۲۷, ۹۵CI [۰/۱۸-۰/۳٦]. همانطور که نتایج آزمون کای دو پیرسون در جدول ۳ نشان می‌دهد،در گروه افراد دارای جهش در مقایسه با گروه سالم، بین درجه‌ی ۱ تومور (۲۵/۹درصد در برابر ۷٤/۱درصد) و درجه‌ی ۲ تومور (۵۰درصد در برابر ۵۰درصد) و درجه‌ی ۳ تومور (۱۱/۱درصددر برابر ۱۸۸/۹درصد) هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری از نظر آماری دیده نشد(p=۰/۱٤)

نتایج آزمون کای دو پیرسون نشان داد بین دو گروه افراد سرطانی بدون تهاجم به عضله و متهاجم به عضله‌ی بدون جهش (به ترتیب ۹۵/۹درصد و ٤/۱درصد) و افراد سرطانی بدون تهاجم به عضله و متهاجم به عضله‌ی دارای جهش (به ترتیب ۹٦/۳درصد و ۳/۷درصد) تفاوتی از نظر تهاجم به عضله برای جهش S249C وجود نداشت(p=۰/۹۳). بنابراین، بروز این جهش در تهاجم به عضله از نظر آماری معنی‌دار نبود.(جدول ٤).

جدول۳. مقایسه فراوانی سطح تومور بین افراد بدون جهش و جهش‌یافته در مارکر S249C

سطح تومور	گروه	
	سالم تعداد(درصد)	جهش‌دار تعداد(درصد)
۱	(۷۴/۱)۶۰	(۲۵/۹)۲۱
۲	(۵۰)۵	(۵۰)۵
۳	(۷۳)۷۳	(۲۷)۲۷

جدول ٤. بررسی ارتباط مارکر S249C و سطح تهاجم به عضله بین افراد بدون جهش و جهش‌یافته

بیماران	وضعیت تهاجم به عضله		سطح معنی‌داری
	غیرمهاجم تعداد(درصد)	مهاجم تعداد(درصد)	مقدار P
بیماران بدون جهش S249C	(۹۵/۹) ۷۰	(٤/۱) ۳	۰/۹۳
بیماران دارای جهش S249C	(۹٦/۳)۲٦	(۳/۷)۱	

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 0:54 IRST on Saturday November 17th 2018

نتایج آزمون کای دو پیرسون نشان داد بین دو گروه زنان سالم و دارای جهش (به ترتیب ۸۱/۸درصد و ۱۸/۲درصد) و مردان سالم و دارای جهش (به ترتیب ۷۱/۹درصد و ۲۸/۱درصد) تفاوتی از نظر دارا بودن جهش وجود نداشت (p=۰/٤۹). بنابراین، جنس در بروز این جهش از نظر آماری معنی‌دار نبود(جدول۵).

نتایج t-student مستقل نشان داد بین دو گروه افراد سالم و دارای جهش از نظر متغیر سن تفاوت معنی‌داری وجود ندارد؛ بدین مفهوم که میانگین متغیر سن در گروه افراد دارای جهش (٦٣/٣٣±٨/٨٦) به‌طور معنی‌دار کمتر یا بیشتر از میانگین متغیر سن در گروه افراد سالم (٦٥/٧٩±٩/٨٦) نبود (p=۰/۲٦). (جدول٦) نتایج آماری نشان دهنده‌ی ارتباط معنی‌دار بین جهش S249C ژن $FGFR_3$ با خطر ابتلای به تومور مثانه است.(p<۰/۰۰۰۱).

جدول ۵. بررسی ارتباط مارکر S249C و جنسیت بین افراد بدون جهش و جهش‌یافته

جنسیت	بیماران		سطح معنی‌داری
	بدون جهش تعداد(درصد)	دارای جهش تعداد(درصد)	مقدار P
زن	۹ (۸۱/۸)	۲ (۱۸/۲)	۰/۴۹
مرد	۶۴(۷۱/۹)	۲۵(۲۸/۱)	

جدول ٦. مقایسه میانگین سنی بین افراد بدون جهش و جهش‌یافته در مارکر S249C

بیماران	فراوانی	میانگین	انحراف معیار	سطح معنی‌داری (مقدار P)
بدون جهش	۷۳	۶۵/۷۹	۹/۸۶	۰/۲۶
دارای جهش	۲۷	۶۳/۳۳	۸/۸۶	

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه سرطان‌ها عامل بسیاری از مرگ و میرها در جهان هستند و به همین سبب در توجه عمومی قرار دارند پژوهشگران نشان دادند که عوامل ژنتیکی می‌توانند کارکرد مهم و چشمگیری در ایجاد و پیشرفت سرطان داشته باشد(۳۵). در ایران تومور مثانه یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها در جمعیت مردان است و میزان شیوع آن۲/۱۱ در هر ۱۰۰۰۰۰ مرد ایرانی است(۳٦). به طوری که تومور مثانه ۸درصد تمام بدخیمی‌ها در مردان و ۳درصد بدخیمی‌های زنان را به خود اختصاص داده است(۳۷). با توجه به اینکه در ایجاد سرطان ژن‌های زیادی دخیلند، یافتن ژن‌های کاندید درمان سرطان بسیار مهم است و با توجه به نقش ژن $FGFR_3$ در بروز انواع سرطان‌ها مانند تومور مثانه و اهمیت بررسی تنوع ژنتیکی، در این مطالعه به بررسی جهش S249C ژن $FGFR_3$ بر میزان خطر ابتلای به تومور مثانه در شمال کشور پرداخته شد. ارتباط معنی‌داری بین این جهش ژن $FGFR_3$ و خطر ابتلای به تومور مثانه وجود داشت (p<۰/۰۰۰۱) این تحقیق نخستین مطالعه‌ای است که تاکنون در راستای بررسی جهش S249C ژن $FGFR_3$ در تومور مثانه در کشور انجام شده البته مطالعاتی در زمینه بررسی جهش S249C ژن $FGFR_3$ بر خطر ابتلا به تومور مثانه انجام شده است(۲۷و٤٥).

در مطالعه دیگری توسط وارد و همکاران در سال ۲۰۱٦، ادرار ۱۲۰ بیمار دچار تومور مثانه‌ی اولیه و ۹۱ بیمار پس از TURBT به روش MultiplexPCR و NGS بررسی شد. واکاوی داده‌ها حضور جهش‌های $FGFR_3$ را در ۳۰درصد بیماران نشان داد(۳۸). روسانا و همکاران در سال ۲۰۱٦ ادرار ۲۵۵ فرد مبتلا به سرطان مثانه را بررسی کردند. جهش‌های $FGFR_3$ در ۹۵ نمونه (٤۱/٦٪) دیده

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 0:54 IRST on Saturday November 17th 2018

شد که شایع‌ترین جهش $FGFR_3$، S249C (٤٦٪) و پس از آن Y375C بود(۳۹). برپایه گزارش تاملینسون و همکاران، جهش‌های $FGFR_3$ در بیشتر بیماران سرطان یوریتلیال با تومورهای درجه و مرحله‌ی پایین وجود داشت. همچنین، در تحقیق ما، بیشتر جهش‌های $FGFR_3$ در بیماران با تومور مثانه در مرحله و درجه‌ی پایین یافت شد(٤۰). ون ریجن و همکاران در کانادا از بررسی ۱۳۲ نمونه‌ی بافت تومور مثانه‌ی اولیه PT1 به روش SNAP SHOT جهش S249C را فراوان‌ترین جهش ژن $FGFR_3$ شناسایی کردند(٤۱). در مطالعه‌ای دیگر میاکی و همکاران جهش‌های $FGFR^3$ را در ۱۲ مورد از ۱۳ بافت توموری(۹۲/۳٪) دارای جهش و ۷/۷درصد بدون جهش و ۱۱ مورد از ۱۳ مورد نمونه‌ی ادرار (۸٤/٦٪) و ۱۵/٤درصد بدون جهش در بیماران مبتلا به تومور مثانه‌ی سطحی گزارش دادند؛ در حالی که هیچ جهشی در بافت یا نمونه‌های ادرار بیماران مبتلا به تومور مثانه‌ی مهاجم به عضله یا کیست مزمن شناسایی نشد(٤۲). ترانزی و همکاران در لهستان ارتباط جهش‌های $FGFR_3$ با تومورهای مرحله و درجه‌ی پایین مثانه را گزارش دادند. آنها جهش‌های $FGFR_3$ را در ۱۸۵ نمونه بافت افراد مبتلا به تومور مثانه بررسی کردند. فراوان‌ترین جهش در مطالعه‌ی آنها S249C و پس از آن Y375C بود(٤۳). در حالی که در مطالعه‌ای، الیزابت و همکاران در آمریکا، جهش‌های $FGFR_3$ را در ۲درصد از تومورهای اولیه (٤/۱٦۱) و ۹درصد از متاستازها (۳/۳۳) گزارش دادند. فراوان‌ترین جهش‌های $FGFR_3$ در مطالعه‌ی آنها Y375C و پس از آن R248C بود. در حالی که در سایر مطالعات R248C به عنوان فراوان‌ترین و پس از آن Y375C گزارش شده بود(٤٤). دودورگا و همکاران در ترکیه جهش‌های $FGFR_3$ را در ٥٦ فرد مبتلا به تومور مثانه با درجه و مرحله‌های مختلف بررسی کردند. بیشترین جهش ژن $FGFR_3$ مربوط به S249C بود (۲۸ نفر از ٥٦ نفر) جهش‌های دیگر در این مطالعه کمتر دیده شدند که این یافته‌ها مشابه نتایج تحقیق ماست(۲۷). کارویی و همکاران جهش‌های $FGFR_3$ را به روش SSCP و Sequencing بررسی کردند ٤٥درصد تومورهای مثانه غیرمهاجم به عضله و ۱۸درصد مهاجم به عضله بود که نشان دهنده‌ی ارتباط جهش‌های $FGFR_3$ با تومورهای غیرمهاجم به عضله‌ی درجه‌ی پایین است(۳۰). این داده‌ها همپوش با یافته‌های کریتی و همکاران در ایتالیاست که حضور جهش‌های $FGFR_3$ را در ٤۱/٦درصد موارد غیرمهاجم به عضله (۲۳۰/۹۷) شناسایی کردند و جهش شایع در این مطالعه نیز S249C بود(٤٥). شاید تفاوت نتایج به دلیل تفاوت در اندازه‌ی جمعیت مورد مطالعه یا اختلاف در خزانه‌ی ژنتیکی جمعیت‌ها و اثر عوامل ژنتیکی و محیطی باشد. به طور کلی بر پایه‌ی نتایج این بررسی، ارتباط معنی‌داری بین جهش S249C ژن $FGFR_3$ با تومور مثانه وجود داشت. شاید این جهش به عنوان عامل خطر در جمعیت مورد بررسی مطرح باشد. با توجه به تأثیر ژن‌های متعدد در تومور مثانه، نیاز است مطالعات گسترده‌تر با در نظر گرفتن دیگر عوامل ژنتیکی و محیطی در جمعیت‌های بزرگ‌تر و گروه‌های نژادی مختلف انجام شود تا بتوان نتایج ریزبینانه‌تر و فراگیرتری بدست آورد.

سپاسداری و سپاسگزاری

این مقاله بخشی از پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد سحر غفوری، دانشجوی رشته‌ی ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن است. بدین وسیله نویسندگان از دانشگاه آزاد واحد تنکابن، آزمایشگاه ژنتیک و همچنین از همه بیماران شرکت کننده در این پژوهش سپاسگزاری می‌کنند. نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

1. Kaufman DS, Shipley WU, Feldman AS. Bladder cancer. Lancet. 2009; 374:239–249.

2. Grossman HB. Bladder cancer: neoadjuvant is new again. Lancet Oncol. 2011; 12:830–831.

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 0:54 IRST on Saturday November 17th 2018

3. Devita N, Heliman S, Rosenberg S. cancer principles & practice ofoncologyPhiladelphia, J.B Lippincott Co. 1997.
4. Walsh P, Retic A,Vaughan E, Wein A. Campbell's Urology. Philadelphia, WB. Saunders Co. 1998:2329.
5. Sadjadi A, Nouraie M, Mohagheghi MA, Mousavi-Jarrahi A,Malekezadeh R, Parkin DM. Cancer occurrence in Iran in 2002, an international perspective. *Asian Pac J Cancer Prev*2005;6 (3):359-63
6. National Cancer Institute [webpage on the Internet]. *SEER Stat Fact Sheets: Bladder Cancer*. 2016. Available from: http://seer.cancer.gov/statfacts/html/urinb.html. Accessed February 4, 2016.
7. Sun M, Trinh QD. Diagnosis and staging of bladder cancer. Hematol Oncol Clin North Am. 2015; 29:205–218.
8. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA: a cancer J Clin 2011;61(2):69-90.
9. Fioriti D, Pietropaolo V, Degenen AM. Urothelial bladder carcinoma and viral infections: differentassociation withhuman papillumavirus and polyoma viruses .Int J Immuno Pathol Phormacol 2003;10:2838.
10. Karagas MR, Parks F, Kelsey KT. Gender, smoking, glutathione –S- transferase variants and bladder cancerincidence. Cancer Lett 2005;219:63-9.
11. Colombel M, Soloway M, Akaza H, Böhle A Palou J, Buckley R, et al. Epidemiology, Staging, Grading, and Risk Stratification of Bladder Cancer. Eur Urol Supplements 2008 10//;7(10):618-26.
12. Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, et al. Bladder cancer: epidemiology, staging andgrading, and diagnosis. Urology2005;66(6 Suppl 1):4-34.
13. Pelucchi C, Bosetti C, Negri E, Malvezzi M, La Vecchia C. Mechanisms of disease: The epidemiology of bladdercancer. Nat Clin Pract Urol 2006;3(6):327-40.
14. Gust K.M, McConkey D.J, Awrey S et al. Black. Fibroblast Growth Factor Receptor 3 is a Rational Therapeutic Target in Bladder Cancer. Mol Cancer Ther.2013; 12(7): 1245–1254
15. Milojevic B, Dzamic Z, Kajmakovic B, Milenkovic Petronic D, Sipetic Grujicic S. Urothelial carcinoma: Recurrence and risk factors. J BUON. 2015; 20:391–398.
16. Gierth M, Burger M. Bladder cancer: Progress in defining progression in NMIBC. Nat Rev Urol. 2013; 10:684–685.
17. Jacobs BL, Lee CT, Montie JE. Bladder cancerin 2010: how far have we come? CA Cancer JClin 2010; 60(4): 244-72.
18. Tanagho EA, McAninch WJ. Smith's General Urology. 6th ed. The McGraw-Hill: San Fran cisco-California; 2010.
19. Cheung G, Sahai A, Billia M, Dasgupta P, KhanMS. Recent advances in the diagnosis andtreatment of bladder cancer. BMC medicine2013;11(1):13.
20. Shah JB, McKiernan JM. Novel therapeutics in the treatment of bladder cancer. Curr Opin Urol 2004;14: 287-93.
21. Erichsen H C, Chanock S J. Snps in Cancer Research and Treatment. Br J Cancer 2004;90:747-751.
22. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat RevCancer* 2004;4(2): 143-53.
23. di Martino E, Tomlinson DC, Knowles MA. A decade of FGF receptor research in bladder cancer: past, present, and future challenges. *Adv Urol* 2012;2012:429213.
24. Lim S, Koh MJ, Jeong HJ, Cho NH, Choi YD, Cho do Y, et al. Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Overexpression Is Associated with Poor Survival in Patients with Resected Muscle Invasive Urothelial Carcinoma. *Yonsei Med J* 2016;57(4):831-9.
25. Choi CH, Chung JU, Kim JH, Kim BG, Hewitt SM. Expression of fibroblast growth factor receptor family members is associated with prognosis in early stage cervical cancer patients. *J Transl Med* 2016;14(1):124-35.
26. Iyer G, Milowsky M.I. Fibroblast growth factor receptor-3 in urothelial tumorigenesis. Urol. Oncol. 2011; DOI: 10.1016/ j.urolonc.2011.12.001.
27. Dodurga Y, Tataroglu C, Kesen Z, Satiroglu-Tufan N.L. Incidence of fibroblast growth factor receptor 3 gene ($FGFR_3$) A248C, S249C, G372C, and T375C mutations in bladder cancer. Genet. 2011; 10 (1): 86-95
28. Foldynova-Trantirkova S, Wilcox W.R, Krejci P. Sixteen years and counting: the current understanding of fibroblast growth factor receptor 3 ($FGFR_3$) signaling in skeletal dysplasias. Hum. Mutat. 2012; 33, 29–41.
29. Zhou L, Yao L.T, Liang Z.Y et al. Nuclear translocation of fibroblast growth factor receptor 3 and its significance in pancreatic cancer. Int J Clin Exp Pathol. 2015; 8(11):14640-14648
30. Karoui M, Hofmann-Radvanyi H, Zimmermann U et al. No evidence of somatic $FGFR_3$ mutation in various types of carcinoma. Oncogene. 2001; 20, 5059±5061
31. van Rhijn BW, Lurkin I, Chopin DK, Kirkels WJ, Thiery JP, van der Kwast TH, et al. Combined microsatellite and $FGFR_3$ mutation analysis enables a highly sensitive detection of urothelial cell carcinoma in voided urine. Clin Cancer Res 2003;9:257–63.
32. Wiener HG, Mian C, Haitel A, Pycha A, Schatzl G, Marberger M. Can urine bound diagnostic tests replace cystoscopy in the management of bladder cancer? J Urol 1998;159:1876–80.
33. Rieger-Christ KM, Mourtzinos A, Lee PJ, Zagha RM, Cain J, Silverman M، et al. Identification of fibroblast growth factor receptor 3 mutations in urine sediment DNA samples complements cytology in bladder tumor detection. Cancer 2003;98:737–44.
34. Kompier LC, Van Der Aa MN, Lurkin I et al. The development of multiple bladder tumour recurrences in relation to the $FGFR_3$ mutation status of the primary tumour. J. Pathol. 2009; 218: 104-112.
35. Wang J, He Q, Han C, et al. p53-facilitated miR-199a-3p regulates somatic cell reprogramming. Stem

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 0:54 IRST on Saturday November 17th 2018

Cells. 2012;30(7):1405–1413.
36. Mohammad-Beigi A, Rezaeeianzadeh A, Tabbatabaei HR.Application of life table in survival analysis of patients withbladder cancer. *Zahedan J Res Med* Sci (ZJRMS) 2011;13(3):25-9.
37. Shadi Kolahdoozan, Alireza Sadjadi, Amir Reza Radmard .Hooman Khademi- Five Common Cancers in Iran. Arch Iran Med 2010; 13 (2): 143 – 146[Text in Persian].
38. Ward D.G, Baxter L, Gordon N.S et al. Multiplex PCR and Next Generation Sequencing for the Non-Invasive Detection of Bladder Cancer. PLoSONE. 2016;11
(2):e0149756.doi:10.1371/journal.pone.0149756.
39. Critelli R, Fasanelli F, Oderda M, Polidoro S, Assumma MB, Viberti C, Preto M, Gontero P, Cucchiarale G, Lurkin I, Zwarthoff EC, Vineis P, Sacerdote C, Matullo G, Naccarati A
Detection of multiple mutations in urinary exfoliated cells from male bladder cancer patients at diagnosis and during follow-up.Oncotarget. 2016 Sep 7. doi: 10.18632/oncotarget.11883.
40. Tomlinson DC, Baldo O, Harnden P and Knowles MA. $FGFR_3$ protein expression and its relationship to mutation status and prognostic variables in bladder cancer. J. Pathol.2007; 213: 91-98.
41. Van Rhijn B.W, Van Der Kwast T.H, Liu L et al. The $FGFR_3$ mutation is related to favorable pT1 bladder cancer. J Urol. 2012; 187, 310-4.
42. Miyake M, Sugano K, Kawashima K et al. Sensitive detection of $FGFR_3$ mutations in bladder cancer and urine sediments by peptide nucleic acid-mediated real-time PCR clamping. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007; 362: 865-871.
43. Traczyk-Borszynska M, Borkowska E, Jablonowski Z. Genetic diversity of urinary bladder cancer and the risk of recurrence based on mutation analysis. Neoplasma. 2016;63(6):952-960.
44. Guancial E.A, Werner L, Bellmunt J, Bamias A et al. $FGFR_3$ expression in primary and metastatic urothelial carcinoma of the bladder. Cancer Medicine. 2014; 3(4): 835–844
45. Critelli R, Fasanelli F, Oderda M et al. Detection of multiple mutations in urinary exfoliated cells from male bladder cancer patients at diagnosis and during follow-up.Oncotarget.2016; Sep 7. doi: 10.18632/oncotarget.11883.

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 0:54 IRST on Saturday November 17th 2018

Detection of $FGFR_3$ Gene S249C Mutation in Urinary Epithelial Cell by Tetra-Arms-Pcr Method in Patients With Bladder Tumors

Ghafouri S (MSC)[1]- *Nazemi A (PhD)[1]- Mokhtari Gh R (MD)[2]

***Corresponding Address:** Department of Genetics, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon,I.R.Iran University, Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran.

Email: Alinazemy@yahoo.com

Received: 04/Mar/2018 Revised: 06/May/2018 Accepted: 23/Jul/2018

Abstract

Introduction: Genetic variation of $FGFR_3$ gene is one of the factors affecting the bladder tumor. $FGFR_3$ is a tyrosine kinase receptor, involved in controlling the cellular and angiogenesis cycle. This protein affects a variety of diseases and cancers and cartilage growth abnormalities. Regarding the high activity of $fgfr_3$ mutations in more than 50% of primary tumors of bladder urethral cells, it was suggested in this stage that the gene is involved in tumor-forming epithelial cells.

Objective: the aim of this study was to detect S249C mutation in $FGFR_3$ gene through tetra primers arms PCR and to determine the association between the presence of this mutation and the early stages of bladder cancer in the north of the country.

Materials and Methods: in this study, after separation of epithelial cell in the urine of 100 patients with bladder tumor, their DNA was extracted using a commercial kit. After bioinformatics studies, primers with appropriate pair of mutants were designed and synthesized for the S249C mutation. After optimization of the reaction, screening was performed on the population and the data were analyzed using SPSS software.

Results: Our results showed that primers designed to differentiate well between normal alleles and mutants in the epithelial cell of 28 patients with bladder tumor ,S249C mutations were identified $p<0.0001$. Statistical analysis of the data indicates the significance of this mutation.

Conclusion: The mutation of S249C $FGFR_3$ gene was identified in 28% of the population studied and is considered a potential risk, although more and more studies are needed to confirm the results.

Conflict of interest: non declared

Key words: Biomarkers, Tumor\ Epithelial Cells\ Genes\ Urinary Bladder Neoplasms

_____Journal of Guilan University of Medical Sciences, No: 107, Pages: 10-18

Please cite this article as: Ghafouri S, Nazemi A, Mokhtari Gh R. Detection of $FGFR_3$ Gene S249C Mutation in Urinary Epithelial Cell by Tetra-Arms-Pcr Method in Patients With Bladder Tumors. J of Guilan University of Med Sci 2018; 27(107):10-18. [Text in Persian]

1. Department of Genetics, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon,I.R.Iran.
2. Urology Reaserch Center, Razi Hospital, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.