

بررسی وضعیت میکروساتلایتی دو مارکر BAT-25 و BAT-26 با استفاده از دو تکنیک Real Time PCR و HPLC در سرطان کولورکتال

چکیده

دریافت: ۱۳۹۲/۰۶/۱۸ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۹/۱۶ آنلاین: ۱۳۹۲/۱۱/۱۲

زمینه و هدف: سرطان کولورکتال سومین و چهارمین شایع به ترتیب در آقایان و خانم‌ها می‌باشد. یکی از مسیرهای تومورزایی در سرطان کولورکتال، ناپایداری میکروساتلایتی (MSI) می‌باشد. با توجه به درصد بالای سرطان کولورکتال با ویژگی MSI⁺ در ایران نسبت به دیگر مناطق دنیا، غربالگری این نوع سرطان یک امر ضروری می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی و معرفی تکنیک مناسب با حساسیت و ویژگی بالا جهت غربالگری سرطان کولورکتال با ویژگی MSI⁺ می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه مقطعی، نمونه‌های سرم خون به منظور غربالگری غیرتهاجمی انتخاب و وضعیت میکروساتلایت آن‌ها با نمونه بافت تومور و نرمال مقایسه گردید. با استفاده از دو تکنیک Real Time PCR و HPLC (کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا) و هم‌چنین دو مارکر BAT-25 و BAT-26، وضعیت میکروساتلایتی نمونه‌ها تعیین شد. در این قسمت روش مطالعه بیان شده جهت تایید دقت روش Real Time PCR، نمونه‌هایی که به صورت MSI⁺ تشخیص داده شده بودند، با روش مرجع تعیین توالی نوکلئوتیدی نیز مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: بر اساس روش مرجع تعیین توالی، تکنیک Real Time PCR حساسیت و ویژگی ۱۰۰٪ در تشخیص تومورهای MSI⁺ داشت، در حالی که حساسیت و ویژگی HPLC به ترتیب ۸۳٪ و ۱۰۰٪ (با مارکر BAT-26) و ۵۰٪ و ۹۷٪ (با مارکر BAT-25) بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه نشان دادند که تکنیک Real Time PCR در تشخیص نمونه MSI⁺ دارای حساسیت و ویژگی برابر با روش مرجع تعیین توالی می‌باشد، در حالی که HPLC حساسیت و ویژگی کم‌تری دارد. هم‌چنین سرم خون نمونه خوبی جهت غربالگری تومورهای MSI⁺ نمی‌باشد.

کلمات کلیدی: سرطان کولورکتال، ناپایداری میکروساتلایتی، Real Time PCR، HPLC.

مرجان ریسمانچی^۱
پونه مکرّم^۲
مهوش علیزاده نایینی^۳
مهدی پرییان^۴، زهره هنردار^۱
سودابه کاووسی‌پور^۱، عباس علی‌پور^۷

۱- گروه بیوشیمی، ۲- کمیته تحقیقات
۳- مرکز تحقیقات گوارش و کبد، بیمارستان
نمازی، ۴- دانشکده علوم و فن‌آوری‌های نوین
۵- گروه داخلی
۶ و ۷- دانشکده علوم پزشکی شیراز،
شیراز، ایران.

۶- گروه تحقیق و توسعه، مجتمع تولیدی و
تحقیقاتی انستیتور پاستور، تهران، ایران.
۷- گروه آمار، دانشکده علوم پزشکی مازندران،
مازندران، ایران.

* نویسنده مسئول: شیراز، خیابان زند، دانشکده پزشکی،
بخش بیوشیمی و مرکز تحقیقات گوارش و کبد،
بیمارستان نمازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ایران.
تلفن: ۰۷۱۱-۲۳۰۳۰۲۹
E-mail: mokaram2@gmail.com

مقدمه

ناپایداری میکروساتلایتی (MSI) ^{۵-۷} Microsatellite Instability و فاکتورهای اپی‌ژنتیک می‌باشند. فاکتورهای اپی‌ژنتیک شامل متیلاسیون DNA، هیستون استیلاسیون/ داستیلاسیون و تغییر وضع کروماتین می‌باشند. این فاکتورها بدون ایجاد تغییر در توالی DNA بیان ژن را تغییر می‌دهند و از طریق تقسیم میتوز به سلول دختری منتقل می‌شوند.^{۸-۱۱} در این میان، ناپایداری میکروساتلایتی یا MSI یکی از مسیرهای اصلی تومورزایی در سرطان کولورکتال می‌باشد.

سرطان کولورکتال در جهان سومین و چهارمین سرطان شایع به ترتیب بین آقایان و خانم‌ها می‌باشد.^۱ در ایران این سرطان سومین سرطان شایع و هم‌چنین سومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان به شمار می‌آید.^۲ مسیرهای تومورزایی در سرطان کولورکتال شامل ناپایداری کروموزومی Chromosomal Instability (CIN)^۳،

سرطان کولورکتال MSI⁺ بود. در یک مطالعه، Dietmaier توانایی تکنیک Real Time PCR (پروب هیبریداسیون) در تشخیص نمونه‌های MSI⁺ را مورد بررسی قرار دادند که نتایج نشان داد این تکنیک توانایی شناسایی نمونه‌های MSI⁺ تا یک نوکلئوتید حذف در توالی میکروساتلایت را دارد.^{۲۲} در این مطالعه در ابتدا تکنیک HPLC به عنوان روش غربالگری مناسب انتخاب و نتایج آن با روش Real Time PCR (پروب هیبریداسیون)، به عنوان یک تکنیک با حساسیت و ویژگی بالا، مقایسه گردید. در نهایت جهت تایید نتایج Real Time PCR، نمونه‌های MSI⁺ با استفاده از تکنیک مرجع تعیین توالی بررسی و MSI⁺ بودن آن‌ها تایید شد. هم‌چنین جهت معرفی روش غربالگری غیرتهاجمی، وضعیت میکروساتلایت نمونه‌های سرم خون با نمونه‌های بافت تومور و نرمال فرد مقایسه شد تا در صورت یکسان بودن آن در فرد بیمار MSI⁺، بتوان از سرم خون جهت تشخیص افراد MSI⁺ استفاده کرد.

روش بررسی

مطالعه حاضر از نوع مطالعه مقطعی می‌باشد که از فروردین ۱۳۸۹ تا تیر ماه ۱۳۹۱ به طول انجامید. نمونه‌گیری: با در نظر گرفتن میزان همبستگی ($r=0/5$) بین نتایج نمونه‌های بافت روده‌ای و سرم خون (در سطح $\alpha=0/05$)، حجم نمونه‌ها محاسبه گردید. نمونه‌های مورد مطالعه شامل ۴۴ بیمار (سرطان اسپورادیک یا HNPCC) و ۴۴ فرد نرمال (کنترل) بودند. از گروه بیمار تنها ۲۴ نفر هر سه نمونه بافت تومور، بافت نرمال و سرم خون را داشتند و دیگران تنها دارای دو نمونه بافت تومور و نرمال بودند. از گروه کنترل نیز تنها ۳۵ نفر هر دو نمونه بافت و سرم خون را داشتند و مانده‌ها تنها دارای نمونه بافت بودند. نمونه‌های خون بیماران قبل از عمل جراحی و نمونه‌های تومور به همراه قسمتی از بافت نرمال اطراف آن از ۴۴ بیمار سرطانی کولورکتال که در بیمارستان‌های شیراز تحت عمل جراحی یا اندوسکوپی قرار گرفتند، از مهر ماه سال ۱۳۸۹ جمع‌آوری شدند. هم‌چنین نمونه‌های نرمال از افرادی که تحت اندوسکوپی قرار گرفتند، جمع‌آوری شد. از نمونه‌های بافت و سرم جمع‌آوری شده، بلافاصله DNA استخراج شد. میانگین سن افراد در گروه بیمار و کنترل به ترتیب 39 ± 11 و

MSI به حالتی گفته می‌شود که طول میکروساتلایت DNA توموری (توالی نوکلئوتیدی تکراری موجود در DNA) با طول میکروساتلایت مشابه در DNA نرمال همان فرد، متفاوت باشد که به‌طور معمول در اکثر موارد کوتاه‌تر است.^{۲۳} MSI⁺ عامل ۹۰٪ از سندرم کولورکتال غیرپولیپوزیس Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (HNPCC) (یکی از سندرم‌های ارثی سرطان کولورکتال) و هم‌چنین عامل ۸ تا ۱۵٪ از سرطان اسپورادیک کولورکتال می‌باشد.^{۲۳} آنالیز وضعیت MSI و تشخیص افرادی که به صورت MSI⁺ هستند، دارای اهمیت است، به این علت که بیماران MSI⁺ پیش‌آگهی بهتری نسبت به بیماران Microsatellite Stable (MSS) دارند.^{۱۳} مطالعات نشان داده‌اند که بیماران MSI⁺ به شیمی درمانی 5-FU پاسخ متفاوتی نسبت به بیماران MSS می‌دهند.^{۱۳} هم‌چنین آنالیز وضعیت MSI منجر به شناخت موارد جدیدی از افراد HNPCC می‌شود که معیارهای کلینیکی قادر به شناخت این بیماران نبوده است.^۵ به این دلیل تاکنون تلاش‌های بسیار زیادی جهت ایجاد تست‌های غربالگری برای شناخت بیماران MSI⁺ انجام شده است.^{۱۴}

نتایج مطالعات مختلف نشان داده است که دو مارکر تکراری تک نوکلئوتیدی BAT-26 و BAT-25 دارای حساسیت و ویژگی بالایی جهت تشخیص نمونه‌های MSI⁺ هستند.^{۱۵} و با بررسی BAT-26 به تنهایی می‌توان تومورهای MSI⁺ را تشخیص داد.^{۱۶-۱۸} هم‌چنین بسیاری از محققان پیشنهاد کردند که جهش‌هایی که در بافت تومور وجود دارند (مانند تغییرات میکروساتلایتی) را می‌توان در DNA گردش خون تعیین کرد.^{۱۹-۲۱} استفاده از DNA گردش خون به‌عنوان تست تشخیصی سرطان بسیار مفید می‌باشد، به این علت که نمونه‌گیری یک روش غیرتهاجمی و آسان می‌باشد و هم‌چنین DNA در پلاسماهای ذخیره شده پایدار است.^{۱۹-۲۱}

مطالعه‌ای که در تهران انجام شد نشان داد، درصد تومورهای اسپورادیک MSI⁺ برابر ۱۹/۴٪ می‌باشد.^{۲۲} میزان آن در مطالعه Moghbeli^۲ ۲۶/۹٪ و در مطالعه Brim^{۲۳} ۲۶٪ گزارش شده است. با توجه به اهمیت غربالگری سرطان کولورکتال MSI⁺ و درصد بالای MSI⁺ در ایران نسبت به دیگر مناطق دنیا، غربالگری سرطان کولورکتال MSI⁺ یک امر ضروری می‌باشد. هدف از این مطالعه معرفی تکنیک مناسب با دقت و حساسیت بالا جهت غربالگری

۵۵±۱۳/۸ سال ($P < 0.0001$) بود.

استخراج DNA: با استفاده از روش فنل/ کلروفورم انجام شد.^{۲۵} بررسی وضعیت میکروساتلایت: بر پایه مطالعات گذشته، دو مارکر میکروساتلایت مونونوکلئوتیدی BAT-25 و BAT-26 که نسبت به مارکرهای میکروساتلایتی دو و یا سه نوکلئوتیدی تک‌شکلی هستند و در تشخیص MSI حساسیت و ویژگی بالایی دارند، انتخاب شدند.^{۱۷، ۱۶ و ۲۶} از دو تکنیک Real Time PCR (پروپ هیبریداسیون) و HPLC (کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا) استفاده شد. در نهایت جهت تایید نتایج Real Time PCR نمونه‌های MSI⁺ با استفاده از تکنیک مرجع تعیین توالی بررسی و وضعیت MSI⁺ بودن آن‌ها تایید شد.

تکنیک Real Time PCR: در این روش از LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) استفاده شد. پرایمرها و پروب‌های هیبریداسیون (Metabion GmbH, Germany) مورد استفاده بر گرفته از مقاله^{۲۲} می‌باشند.

مقادیر به کار رفته در هر واکنش Real Time PCR شامل: $0.4 \mu\text{mol/L}$ از هر پرایمر، $0.2 \mu\text{mol/L}$ از هر پروب، $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ از BSA (Roche FastStart Master Mix, Gibco Co, U.S.A.) $1 \times$ و 100 ng DNA در حجم نهایی $20 \mu\text{L}$ بود. در این روش از نقطه ذوب (Melting temperature) محصولات PCR و پروب هیبریداسیون مکمل آن‌ها جهت تعیین نمونه‌های MSI⁺ استفاده می‌شود. شرایط دما و زمان سیکل‌های Real Time PCR به صورت 90°C ثانیه ۹۵ و 50°C سیکل از صفر ثانیه 95°C (مرحله تک رشته‌ای شدن DNA)، 10°C ثانیه ۶۰ (اتصال پرایمر به DNA)، سه ثانیه 50°C (ثبت سیگنال فلورسانس)، 10°C ثانیه ۷۲ (طویل‌سازی DNA) می‌باشد. هم‌چنین شرایط نقطه ذوب DNA صفر ثانیه 95°C (مرحله تک رشته‌ای شدن DNA)، 30°C ثانیه ۳۵ (BAT-26)، 30°C ثانیه ۳۰ (BAT-25) (اتصال پروب به DNA) و در نهایت افزایش دما به دمای 95°C هم‌زمان با ثبت فلورسانس توسط فیلتر F2 (BAT-26) و F3 (BAT-25) می‌باشد.

تکنیک HPLC: در ابتدا از DNA نمونه‌ها PCR گذاشته و محصولات PCR به دستگاه HPLC تزریق شد. مقادیر مورد استفاده در هر واکنش PCR به صورت 100 ng از DNA ژنومیک، $1 \times \text{PCR}$ بافر، 3 mmol/L از MgCl_2 ، $0.2 \text{ pmol}/\mu\text{L}$ از هر پرایمر،

$20 \mu\text{mol/L}$ از هر dNTP در حجم نهایی $50 \mu\text{L}$ بود. هم‌چنین شرایط PCR به صورت 10°C دقیقه 95°C (مرحله تک‌رشته‌ای شدن DNA) و به دنبال آن 30°C سیکل از 30°C ثانیه 95°C (مرحله تک‌رشته‌ای شدن DNA)، 45°C ثانیه ۵۴ (BAT-25)، 56°C (BAT-26) (مرحله Annealing و یا اتصال پرایمرها به هدف) و 45°C ثانیه 72°C (طویل‌سازی DNA) بود.

در تکنیک HPLC از ستون تعویض آنیون (PRP-X600 Anion Exchange HPLC Columns, Hamilton Co., NV, USA) با ابعاد $250 \text{ mm} \times 4/6 \text{ mm}$ استفاده شد. سرعت حرکت فاز متحرک در ستون $1 \text{ ml}/\text{min}$ بود. دو بافر A (Tris/EDTA) و B (Tris/EDTA/NaCl) به عنوان فاز متحرک HPLC مورد استفاده قرار گرفتند. غلظت ترکیبات بافرها به صورت، 20 mM Tris-HCl، 1 mM EDTA و 1 M NaCl با PH برابر ۹ بود. جهت یکسان بودن شرایط HPLC، محصول PCR نمونه‌های هر فرد با هم مخلوط و سپس به دستگاه تزریق شدند. هم‌چنین گرادیان استفاده شده جهت جداسازی با مارکر BAT-26 و BAT-25 به ترتیب در جدول ۱ و ۲ آورده شده است.

تعیین توالی نوکلئوتیدی: در تایید نتایج تکنیک Real Time PCR، DNA نمونه‌هایی که با مارکر BAT-26، MSI⁺ تشخیص داده شده بودند، تعیین توالی گردید. جهت کلونینگ از کیت InsTA cloneTM (PCR product cloning kit, Fermentas, Germany) استفاده شد.

آنالیز آماری: با استفاده از اطلاعاتی که از فتوتیپ MSI در نمونه‌های بافت و سرم به دست آمد، همبستگی بین نتایج گزارش شده در نمونه‌ها با استفاده از همبستگی پیرسون و روش‌های غیر پارامتریک معادل اندازه‌گیری شد. هم‌چنین Cut off point نقاط ذوب Bat-25 و Bat-26 بر اساس روش Receiver Operating Characteristic (ROC) تعیین و سپس حساسیت و اختصاصیت محاسبه گردید.

یافته‌ها

از نقطه ذوب نمونه‌ها با مارکر BAT-25 پیک قابل تفسیری به دست نیامد. بنابراین نمونه‌ها با مارکر BAT-25، تنها با تکنیک HPLC مورد بررسی قرار گرفتند.

است (نمودار ۲a,b). این نیز نشان‌دهنده یکی بودن طول DNA در این دو نمونه می‌باشد. هم‌چنین در فرد سالم به علت یکسان بودن طول DNA بافت و سرم، هر دو DNA با هم از ستون خارج می‌شوند و به صورت یک پیک کروماتوگرام ظاهر می‌گردند (نمودار ۲c,d). مقایسه تکنیک مرجع تعیین توالی (Sequencing) با تکنیک Real Time PCR نشان داد که حذف هر یک عدد نوکلئوتید از توالی میکروساتالیتی معادل اختلاف دمای 4°C بین T_m دو بافت سرطانی و نرمال مجاور است.

در نتیجه در روش عملی اختلاف T_m برابر 4°C به عنوان نقطه Cut off تکنیک Real Time PCR با مارکر BAT-26 در نظر گرفته شد. از نظر آماری و بر اساس روش مرجع تعیین توالی نیز، نقطه Cut off تکنیک Real Time PCR، $3/84^{\circ}\text{C}$ تعیین گردید که با Cut off تعیین شده در روش عملی، مطابقت دارد. بر اساس هر دو Cut off تعیین شده، تکنیک پروب هیبریداسیون توانسته است هر شش نمونه MSI^+ را تشخیص دهد. در نتیجه این روش دارای حساسیت و اختصاصیت ۱۰۰٪ در تشخیص تومورهای MSI^+ می‌باشد. بر اساس تکنیک مرجع تعیین توالی برای روش HPLC با مارکر BAT-26 و BAT-25، به ترتیب Cut off برابر $0/3$ دقیقه و $0/2$ دقیقه تعیین شد. بر این اساس، تکنیک HPLC با مارکر BAT-26 و BAT-25 به ترتیب تنها توانایی تشخیص پنج و سه تا از شش نمونه MSI^+ را داشته و هم‌چنین این تکنیک با مارکر BAT-25 یکی از نمونه‌های MSS را به صورت MSI^+ تشخیص داده است. در نتیجه حساسیت HPLC با مارکرهای BAT-26 و BAT-25 به ترتیب برابر، 83% و 50% می‌باشد.

جدول ۲: گرادیان فاز متحرک جهت جداسازی قطعات DNA توسط HPLC

زمان (دقیقه)	(BAT-25)	
	بافر A Tris/EDTA	بافر B Tris/EDTA/NaCl
۰	۳۵٪	۶۵٪
۵	۳۰٪	۷۰٪
۱۰	۲۷٪	۷۳٪
۱۵	۲۶٪	۷۴٪
۲۰	۲۵٪	۷۵٪
۲۳	۳۵٪	۶۵٪
۳۰	۳۵٪	۶۵٪

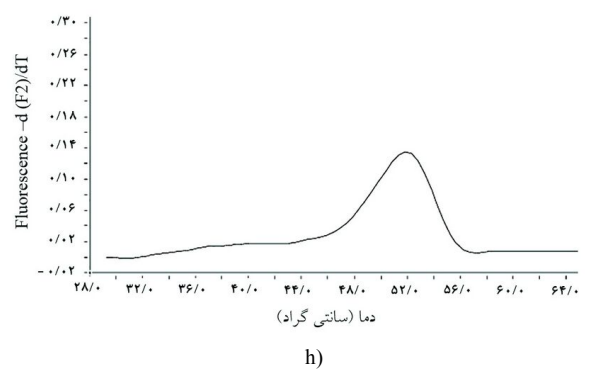
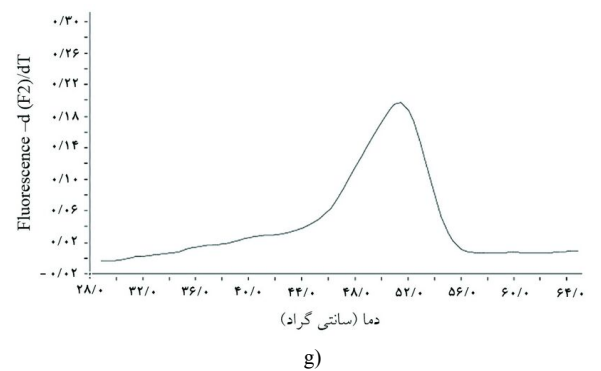
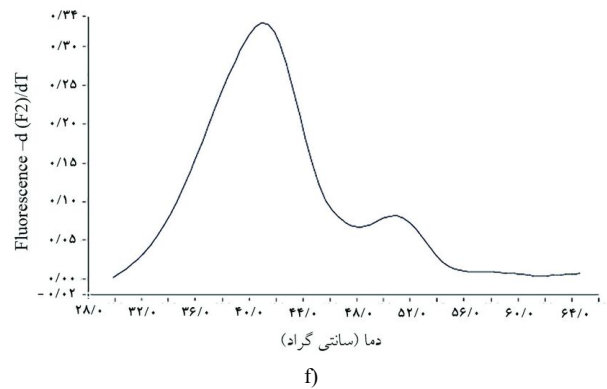
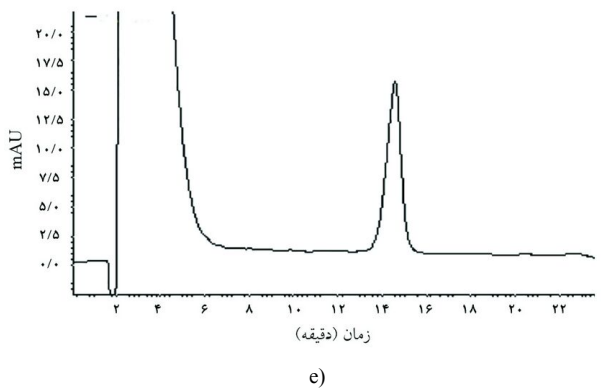
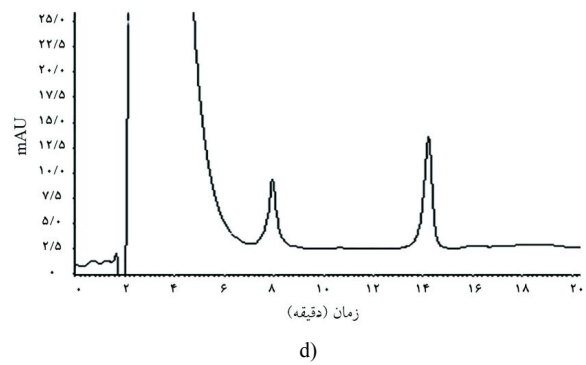
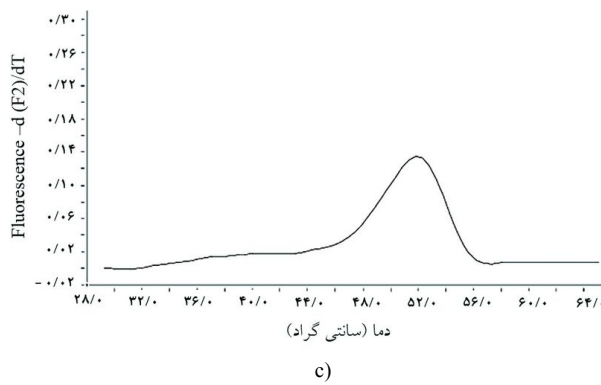
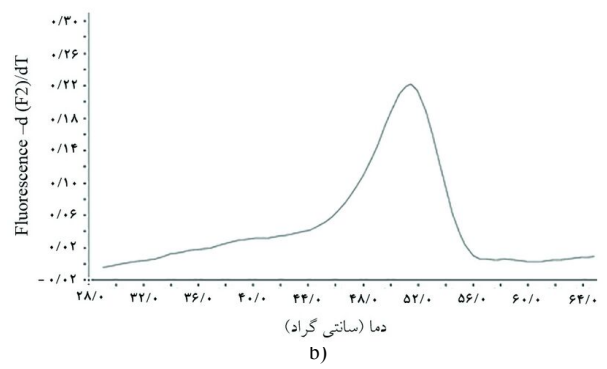
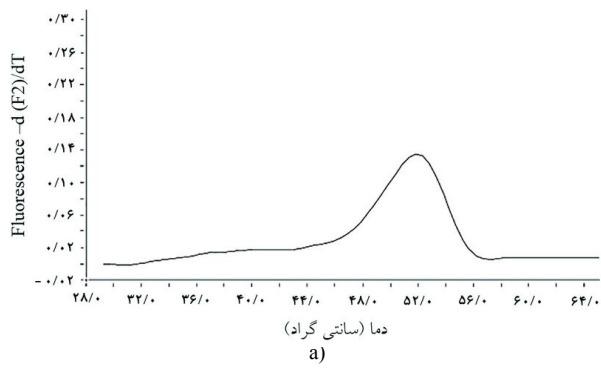
نتایج حاصل از Real Time PCR با مارکر BAT-26 و هم‌چنین HPLC با مارکرهای BAT-26 و BAT-25 در دو بیمار MSI^+ و MSS در نمودار ۱ نشان داده شده است. در بیماری که به صورت MSS می‌باشد، نقطه ذوب DNA در نمونه‌های بافت نرمال مجاور، بافت تومور و سرم (نمودار ۱a,b,c) یکی است و پیک نقطه ذوب هر سه نمونه بر هم منطبق می‌باشد. این نتایج نشان می‌دهند، طول میکروساتالیت DNA موجود در نمونه‌ها یکسان است، در نتیجه این بیمار از نظر میکروساتالیت پایدار می‌باشد. هم‌چنین در فرد بیماری که از نظر میکروساتالیت پایدار است، DNA مربوط به هر سه نمونه (بافت نرمال، بافت تومور و سرم خون) با هم از ستون HPLC خارج می‌شوند و به صورت یک پیک در نمودار کروماتوگرام نمایان می‌شوند (نمودار ۱d,e).

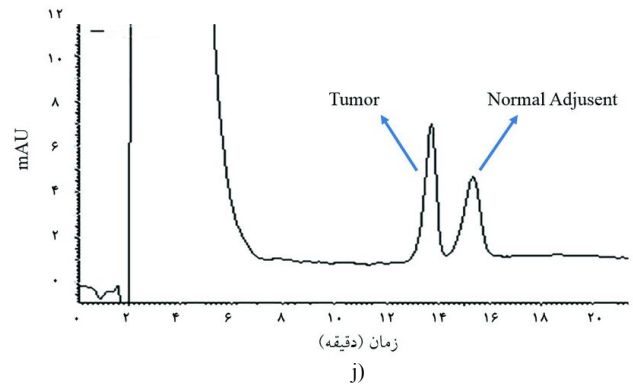
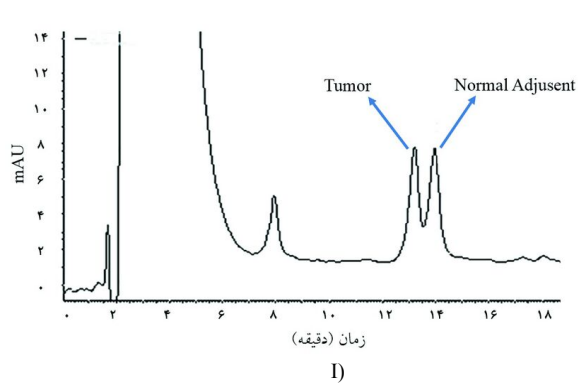
اما در یک فرد MSI^+ نقطه ذوب DNA در بافت تومور کم‌تر از بافت نرمال مجاور و سرم (نمودار ۳f,g,h) می‌باشد. این کاهش نشان‌دهنده کوتاه‌تر شدن میکروساتالیت در بافت تومور می‌باشد. در نتیجه این بیمار از نظر میکروساتالیت ناپایدار است. با توجه به این که نقطه ذوب DNA سرم و بافت نرمال مجاور یکی است، روش Real Time PCR توانایی تشخیص DNA توموری را در نمونه سرم نداشته است. نمایان شدن دو پیک در نمودار کروماتوگرام (نمودار ۳i,j) نیز نشان‌دهنده وجود DNA با دو سایز مختلف است. در نتیجه HPLC توانایی جداسازی DNA تومور را از DNA نرمال در یک فرد MSI^+ دارد.

نتایج Real Time PCR با مارکر BAT-26 و هم‌چنین HPLC با مارکرهای BAT-26 و BAT-25 یک فرد کنترل در نمودار ۲ نشان داده شده است. نقطه ذوب DNA بافت و سرم در فرد سالم یکی

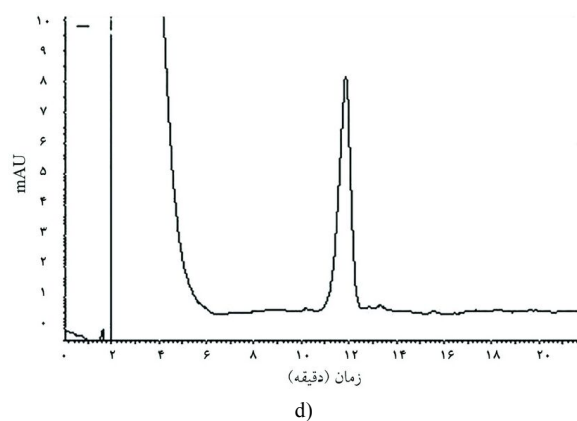
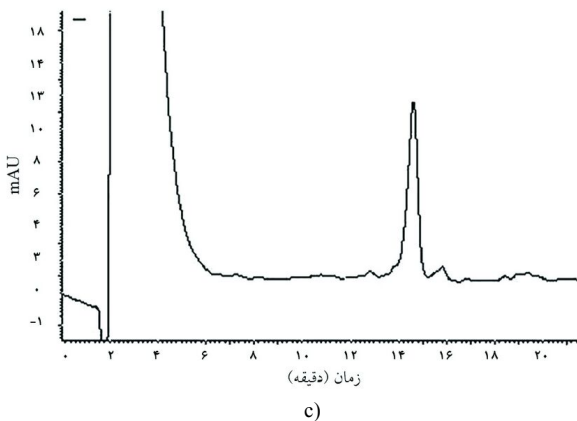
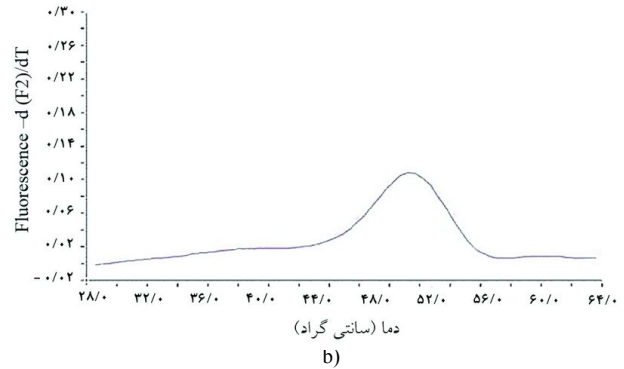
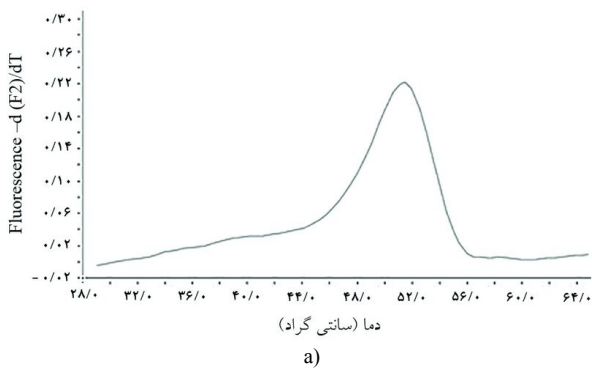
جدول ۱: گرادیان فاز متحرک جهت جداسازی قطعات DNA توسط HPLC

زمان (دقیقه)	(BAT-26)	
	بافر A Tris/EDTA	بافر B Tris/EDTA/NaCl
۰	۴۰٪	۶۰٪
۲۰	۲۰٪	۸۰٪
۲۳	۴۰٪	۶۰٪
۳۰	۴۰٪	۶۰٪





نمودار ۱: نمودارهای نقطه ذوب و کروماتوگرام بافت و سرم خون دو بیمار MSI و MSS (نمودارهای a و b: نقطه ذوب به ترتیب بافت تومور، بافت نرمال مجاور و سرم خون، d و e: کروماتوگرامهای HPLC به ترتیب BAT-26 و BAT-25 یک فرد بیمار MSS، نمودارهای f، g و h: نقطه ذوب به ترتیب بافت تومور، بافت نرمال مجاور و سرم خون، i و j: کروماتوگرامهای HPLC به ترتیب BAT-26 و BAT-25 یک فرد بیمار MSI می‌باشند).



نمودار ۲: نمودارهای نقطه ذوب و کروماتوگرام بافت و سرم خون یک فرد کنترل (نمودارهای a و b: نقطه ذوب به ترتیب بافت نرمال و سرم خون، d و e: کروماتوگرامهای HPLC به ترتیب BAT-26 و BAT-25 یک فرد کنترل می‌باشند).

هیبریداسیون هر شش نمونه MSI^+ را تشخیص داده است. در نتیجه این روش دارای حساسیت و ویژگی ۱۰۰٪ در تشخیص تومورهای MSI^+ می‌باشد. این نتیجه تاییدی بر مطالعه انجام شده توسط Dietmaier می‌باشد که دقت بالای این روش را نشان می‌دهد.^{۲۴}

در هیچ‌یک از نمونه‌های سرطان کولورکتال MSI^+ ، Tm سرم خون با بافت سرطانی مشابه نبود. به بیان دیگر، در هیچ‌یک از نمونه‌های سرم خون افراد سرطانی MSI^+ ، DNA توموری شناسایی نشد. در نتیجه نمونه سرم، نمونه مناسبی جهت تشخیص افراد MSI^+ نمی‌باشد. بر طبق مطالعات صورت گرفته، مقدار DNA نرمال از جمله DNA لئوسیتی موجود در خون بیش‌تر از DNA توموری می‌باشد، در نتیجه این مقدار زیاد DNA باعث پوشانده شدن DNA توموری و عدم تشخیص آن می‌شود^{۲۸، ۲۷، ۲۹} و همچنین روش Real Time PCR حساسیت کافی را جهت شناسایی این مقدار کم DNA توموری ندارد در صورتی که در مطالعات فوق با استفاده از روش فلوسیتومتری BEAMing، DNA توموری تشخیص داده شده است.^{۲۸}

روش HPLC برای مارکر BAT-26 روشی با ویژگی بالا و به نسبت حساس در تشخیص تومورهای MSI^+ می‌باشد. این تکنیک با Cut off برابر با ۰/۳ دقیقه توانایی تشخیص پنج نمونه از شش مورد MSI^+ را دارد. حساسیت و ویژگی این روش به ترتیب ۸۳٪ و ۱۰۰٪ تعیین گردید. در حالی که تکنیک HPLC برای مارکر BAT-25 با Cut off برابر ۰/۲ دقیقه توانایی تشخیص سه نمونه از شش مورد MSI^+ را دارد. حساسیت و ویژگی این روش به ترتیب برابر ۵۰٪ و ۹۷٪ تعیین گردید. بر این اساس مارکر BAT-25 با تکنیک HPLC از حساسیت مناسبی جهت تشخیص نمونه MSI^+ برخوردار نمی‌باشد.

از نظر آماری در گروه بیمار، بین (RT) سرم و بافت سرطانی به دست آمده با روش HPLC همبستگی معناداری وجود نداشت ($r=0/27$ و $P=0/23$)، در حالی که بین RT سرم و بافت نرمال مجاور همبستگی معناداری مشاهده شد ($r=1$ و $P<0/0001$). بنابراین نتایج به دست آمده نمونه سرم خون نمونه مناسبی جهت غربالگری تومورهای MSI^+ با استفاده از این تکنیک نیز نمی‌باشد.

نتایج مطالعه حاضر، با مطالعات قبل مبنی بر این که BAT-26 به عنوان یک مارکر مناسب در شناسایی تومورهای MSI^+ می‌باشد و حساسیت و ویژگی آن نسبت به BAT-25 در تشخیص تومورهای

همچنین اختصاصیت تعیین شده به ترتیب برابر ۱۰۰٪ و ۹۷٪ تعیین شد. به طور مقایسه‌ای در هیچ‌یک از نمونه‌های سرطان کولورکتال MSI^+ ، Tm سرم خون به Tm بافت سرطانی مشابه نبود. به بیان دیگر، با استفاده از تکنیک Real Time PCR، در هیچ‌یک از نمونه‌های سرم خون افراد سرطانی MSI^+ ، DNA توموری شناسایی نشد. همچنین از نظر آماری در گروه بیمار، بین RT سرم و Retention Time (RT) بافت سرطانی به دست آمده از روش HPLC همبستگی معناداری وجود نداشت ($r=0/27$ و $P=0/23$). در نتیجه نمونه سرم خون، نمونه مناسبی جهت غربالگری تومورهای MSI^+ با استفاده از این تکنیک نیز نمی‌باشد.

بحث

سرطان کولورکتال سومین سرطان شایع و هم‌چنین سومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در ایران به شمار می‌آید.^۲ مطالعات انجام شده نشان می‌دهند، که توزیع سرطان کولورکتال در ایران بیش‌تر در سنین جوان است و نیمی از بیماران سرطان کولورکتال در ایران دارای سن زیر ۵۰ سال می‌باشند.^{۱، ۲۶}

در مطالعه حاضر، میانگین سنی افراد در گروه سرطان کولورکتال ۳۹±۱۱/۸۴ سال بود که به مطالعات انجام شده نزدیک می‌باشد. در این مطالعه درصد تومورهای اسپورادیک MSI^+ برابر ۱۳/۶٪ می‌باشد. علت این تفاوت با نتایج مطالعات گذشته محدودیت در تعداد نمونه مطالعه حاضر می‌باشد.

بنابر مطالعه‌ای که توسط Dietmaier انجام گرفت^{۲۴}، تکنیک Real Time PCR با پروب هیبریداسیون توانایی تشخیص موتاسیون حذفی به تعداد یک نوکلئوتید را دارد. در نتیجه در مطالعه حاضر این تکنیک در ابتدا به عنوان روش دقیق و مرجع در تشخیص تومورهای MSI^+ در نظر گرفته شد. سپس وضعیت میکروساتلایت نمونه‌ها با استفاده از این روش Real Time PCR و روش HPLC در مورد دو مارکر BAT-25 و BAT-26 بررسی و مقایسه گردید. جهت تایید دقت روش پروب هیبریداسیون، نمونه‌هایی که با مارکر BAT-26 توسط این تکنیک به صورت MSI^+ تشخیص داده شده بودند با روش مرجع تعیین توالی نیز مورد بررسی قرار گرفتند. مقایسه تکنیک مرجع تعیین توالی با تکنیک Real Time PCR نشان داد که تکنیک پروب

تحقیق‌های بعدی مرتبط استفاده کرد.

سیاسگزار: این مقاله حاصل از پایان‌نامه با عنوان "تعیین وضعیت دو مارکمیکروساتالایت در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال با استفاده از تکنیک HPLC و مقایسه نتایج با تکنیک حساس Real Time PCR" در مقطع کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی در سال ۱۳۹۱ با کد ۵۵۳۲ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی شیراز اجرا شده است.

MSI⁺ بالاتر است همراهی می‌باشد.^{۱۷، ۱۸، ۲۹} در مطالعه حاضر حذف یک نوکلئوتید از توالی میکروساتالایتی توسط مارکر BAT-26 با استفاده از تکنیک Real Time PCR قابل شناسایی بود و حساسیت و ویژگی BAT-26 در روش HPLC نیز بیش‌تر از BAT-25 می‌باشد. ما پیشنهاد می‌کنیم به منظور مطالعه سرم خون به عنوان نمونه مناسب جهت تشخیص تومورهای MSI⁺، می‌توان از روش‌هایی با حساسیت بالاتر از روش Real Time PCR مانند روش فلوسیتومتری^{۲۸} در

References

- Malekzadeh R, Bishehsari F, Mahdavinia M, Ansari R. Epidemiology and molecular genetics of colorectal cancer in Iran: a review. *Arch Iran Med* 2009;12(2):161-9.
- Moghbeli M, Moaven O, Dadkhah E, Farzadnia M, Roshan NM, Asadzadeh-Aghdaee H, et al. High frequency of microsatellite instability in sporadic colorectal cancer patients in Iran. *Genet Mol Res* 2011;10(4):3520-9.
- Cardoso J, Boer J, Morreau H, Fodde R. Expression and genomic profiling of colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta* 2007;1775(1):103-37.
- Pineda M, González S, Lázaro C, Blanco I, Capellá G. Detection of genetic alterations in hereditary colorectal cancer screening. *Mutat Res* 2010;693(1-2):19-31.
- 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.
- Sengupta N, Gill KA, MacFie TS, Lai CS, Suraweera N, McDonald S, et al. Management of colorectal cancer: a role for genetics in prevention and treatment? *Pathol Res Pract* 2008;204(7):469-77.
- Colussi D, Brandi G, Bazzoli F, Ricciardiello L. Molecular pathways involved in colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention. *Int J Mol Sci* 2013;14(8):16365-85.
- Choong MK, Tsafnat G. Genetic and epigenetic biomarkers of colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012;10(1):9-15.
- Hawkins N, Norrie M, Cheong K, Mokany E, Ku SL, Meagher A, et al. CpG island methylation in sporadic colorectal cancers and its relationship to microsatellite instability. *Gastroenterology* 2002;122(5):1376-87.
- Kim MS, Lee J, Sidransky D. DNA methylation markers in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2010;29(1):181-206.
- Miyakura Y, Sugano K, Akasu T, Yoshida T, Maekawa M, Saitoh S, et al. Extensive but hemiallelic methylation of the hMLH1 promoter region in early-onset sporadic colon cancers with microsatellite instability. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004;2(2):147-56.
- Cho YK, Kim HC, Kim SH, Park JH, Yun HR, Cho YB, et al. Location-related differences in sporadic microsatellite unstable colorectal cancer. *Dig Liver Dis* 2010;42(9):611-5.
- 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.
- Kim IJ, Shin Y, Kang HC, Park JH, Ku JL, Park HW, et al. Robust microsatellite instability (MSI) analysis by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). *J Hum Genet* 2003;48(10):525-30.
- Pyatt R, Chadwick RB, Johnson CK, Adebamowo C, de la Chapelle A, Prior TW. Polymorphic variation at the BAT-25 and BAT-26 loci in individuals of African origin. *Am J Pathol* 1999; 155(2):349-53.
- Samowitz WS, Slattery ML, Potter JD, Leppert MF. BAT-26 and BAT-40 instability in colorectal adenomas and carcinomas and germline polymorphisms. *Am J Pathol* 1999;154(6):1637-41.
- Cravo M, Lage P, Albuquerque C, Chaves P, Claro I, Gomes T, et al. BAT-26 identifies sporadic colorectal cancers with mutator phenotype: a correlative study with clinico-pathological features and mutations in mismatch repair genes. *J Pathol* 1999;188(3):252-7.
- Pan KF, Liu W, Lu YY, Zhang L, Li ZP, Lu WL, et al. High throughput detection of microsatellite instability by denaturing high-performance liquid chromatography. *Hum Mutat* 2003;22(5):388-94.
- Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, Stroun M. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev* 1999;18(1):65-73.
- Boni L, Cassinotti E, Canziani M, Dionigi G, Rovera F, Dionigi R. Free circulating DNA as possible tumour marker in colorectal cancer. *Surg Oncol* 2007;16 Suppl 1:S29-31.
- van der Vaart M, Pretorius PJ. Circulating DNA. Its origin and fluctuation. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1137:18-26.
- Bishehsari F, Mahdavinia M, Malekzadeh R, Verginelli F, Catalano T, Sotoudeh M, et al. Patterns of K-ras mutation in colorectal carcinomas from Iran and Italy (a Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale study): influence of microsatellite instability status and country of origin. *Ann Oncol* 2006;17 Suppl 7:vi91-6.
- Brim H, Mokarram P, Naghibalhossaini F, Saberi-Firoozi M, Al-Mandhari M, Al-Mawalay K, et al. Impact of BRAF, MLH1 on the incidence of microsatellite instability high colorectal cancer in population based study. *Mol Cancer* 2008;7:68.
- Dietmaier W, Hofstädter F. Detection of microsatellite instability by real time PCR and hybridization probe melting point analysis. *Lab Invest* 2001;81(10):1453-6.
- Naghibalhossaini F, Mokarram P, Khalili I, Vasei M, Hosseini SV, Ashktorab H, et al. MTHFR C677T and A1298C variant genotypes and the risk of microsatellite instability among Iranian colorectal cancer patients. *Cancer Genet Cytogenet* 2010;197(2):142-51.
- Pourhoseingholi MA, Zali MR. Colorectal cancer screening: Time for action in Iran. *World J Gastrointest Oncol* 2012;4(4):82-3.

27. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(45):16368-73.
28. Diehl F, Schmidt K, Durkee KH, Moore KJ, Goodman SN, Shuber AP, et al. Analysis of mutations in DNA isolated from plasma and stool of colorectal cancer patients. *Gastroenterology* 2008;135(2):489-98.
29. Cossio SL, Coura Rdos S, Bortolini MC, Giugliani R, Ashton-Prolla P, Prolla JC. Polymorphic variation of mononucleotide microsatellites in healthy humans and its implication for microsatellite instability screening. *Arq Gastroenterol* 2007;44(1):64-7.

Microsatellite instability detection using BAT-25 and BAT-26 by Real Time PCR and HPLC in colorectal cancer

Marjan Rismanchi M.Sc.^{1,2}
Pooneh Mokarram Ph.D.^{1,3,4*}
Mahvash Alizadeh Naeni
M.D.^{3,5}
Mahdi Paryan Ph.D.⁶
Zohreh Honardar B.Sc.¹
Soudabeh Kavousipour M.Sc.¹
Abbas Alipour M.D., Ph.D.⁷

1- Department of Biochemistry,
School of Medicine, Shiraz University
of Medical Sciences, Shiraz,
Iran.

2- Research Committee, Shiraz
University of Medical Sciences, Shi-
raz, Iran.

3- Gastroenterohepatology Re-
search Center, Nemazee Hospital,
School of Medicine, Shiraz Univer-
sity of Medical Sciences, Shiraz,
Iran.

4- Advanced Biomedical Sciences,
Shiraz University of Medical Sci-
ences, Shiraz, Iran.

5- Department of Internal Medicine,
School of Medicine, Shiraz Univer-
sity of Medical Sciences, Tehran,
Iran.

6- Research and Development De-
partment, Production and Research
Complex Pasteur Institute, Tehran,
Iran.

7- Department of Epidemiology,
Medical Faculty, Mazandaran Uni-
versity of Medical Sciences, Ma-
zandaran, Iran.

* Corresponding author: Department of
Biochemistry, Gastroenterohepatology
Research Center, Nemazee Hospital,
School of Medicine, Shiraz University of
Medical Sciences, Zand St., Shiraz, Iran.
Tel: +98- 711-2303029
E-mail: mokaram2@gmail.com

Abstract

Received: 09 Sep. 2013 Accepted: 07 Dec. 2013 Available online: 01 Feb. 2014

Background: Colorectal Cancer (CRC) is the third common cancer in the world. One of the pathways in colorectal tumor genesis is Microsatellite Instability (MSI⁺). MSI is detected in about 15% of all colorectal cancers. Colorectal tumors with MSI have distinctive features compared with Microsatellite Stable (MSS) tumors. Due to the high percentage of MSI⁺ in patients with CRC in Iran, screening of this type of CRC is imperative. In current study, two markers (BAT-26 and BAT-25) were used to determine an appropriate screening technique with high sensitivity and specificity to diagnose MSI status in patients with CRC.

Methods: Allelic variation in two markers (BAT-26 and BAT-25) was analyzed in tissues and sera of 44 normal volunteers and tumor and matched normal mucosal tissues as well as sera of 44 patients with sporadic colorectal cancer by Real Time PCR (Hybridization probe) and High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) techniques. The sensitivity and specificity of Real Time PCR and HPLC compared with sequencing as gold standard. The data were statistically analyzed using Student's t-test and χ^2 or fisher exact test, where applicable with (P<0.05). Receiver-operating-characteristic (ROC) curves were used to evaluate the sensitivity and specificity.

Results: The sensitivity and specificity of BAT-26 with Real Time PCR method (Hybridization probe) were 100% in comparison with gold standard method. Whereas the sensitivity and specificity of BAT-26 and BAT-25 with HPLC were 83%, 100% and 50%, 97%, respectively. Neither HPLC nor Real time PCR could detect circulating DNA with MSI property in sera.

Conclusion: The sensitivity and specificity of real time PCR in MSI detection is the same as sequencing method and more than HPLC. BAT-26 marker is more sensitive than BAT-25 and MSI detection with Real time PCR could be considered as an accurate method to diagnose MSI in CRC tissues not sera.

Keywords: chromatography, colorectal neoplasm, high pressure liquid microsatellite instability, real-time polymerase chain reaction.