# شناسایی جهش‌های اگزون ۶، ۱۳ و ۲۰ ژن BRCA1 در بیماران مبتلا به سرطان پستان در استان خراسان جنوبی

غزاله خلیلی تنها[۱]، دکتر احمدرضا سبزاری[۲]، دکتر میترا مودی[۳]، دکتر محسن ناصری[۴*]

۱. کارشناس ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران.
۲. استادیار گروه رادیولوژی و انکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران.
۳. دانشیار گروه بهداشت عمومی، مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی مؤثر بر سلامت، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران.
۴. استادیار گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران.

**تاریخ دریافت:** ۱۳۹۶/۱۱/۱۰ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۷/۰۲/۱۰

## خلاصه

**مقدمه:** سرطان پستان، شایع‌ترین بدخیمی در زنان و به‌عنوان اولین علت مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در زنان شناخته می‌شود. این بیماری به شدت ناهمگن بوده و تحت تأثیر عوامل ژنتیکی و محیطی به‌وجود می‌آید. جهش در دو ژن بسیار پرنفوذ BRCA1 و BRCA2 که نقش مهمی در ترمیم **DNA** دارند، علت اصلی ۳۰-۲۰٪ سرطان‌های پستان ارثی شناخته شده است. مطالعه حاضر با هدف بررسی فراوانی جهش‌های ژن BRCA1 در افراد مبتلا به سرطان پستان در جمعیت خراسان جنوبی انجام شد.

**روش‌کار:** این مطالعه توصیفی بین سال‌های ۹۶-۱۳۹۴ بر روی ۸۸ بیمار مبتلا به سرطان پستان شهر بیرجند انجام شد. از افراد نمونه خون جمع‌آوری شد. قطعات مورد نظر ژن BRCA1 با استفاده از DNA استخراج شده از بیماران و تکنیک PCR تکثیر گردید. برای مشخص کردن جهش‌های اگزون ۶، ۱۳ و ۲۰ از تکنیک PCR-SSCP، رنگ‌آمیزی نیترات نقره و توالی‌یابی مستقیم DNA استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۲) انجام گرفت.

**یافته‌ها:** بررسی اگزون ۶ و ۲۰ در بیماران هیچ جهشی را نشان نداد. در بررسی اگزون ۱۳ یک پلی‌مورفیسم مشاهده شد. این واریانت c.4308T>C در ۲۸ نمونه تشخیص داده شد که ۴ نفر (۱۴/۲٪) آنها مبتلا به سرطان پستان ارثی بودند. فراوانی جهش در افراد مبتلا به سرطان پستان وراثتی ۳۶/۳٪ و در افراد مبتلا به سرطان پستان غیر وراثتی ۳۱/۱٪ در جمعیت مورد مطالعه بود.

**نتیجه‌گیری:** در این مطالعه میزان بروز جهش در دو اگزون ۶ و ۲۰ از ژن BRCA1 صفر و یک جهش از نوع پلی‌مورفیسم rs1060915 در اگزون ۱۳ از ژن BRCA1 با فراوانی ۳۱/۸٪ مشاهده شد.

**کلمات کلیدی:** پلی‌مورفیسم، تکنیک SSCP، جهش DNA، ژن BRCA1، سرطان پستان

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** دکتر محسن ناصری؛ مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران. **تلفن:** ۰۵۶-۳۲۳۹۵۴۵۰؛ **پست الکترونیک:** nasei_m2003@yahoo.com

## مقدمه

سرطان پستان، شایع‌ترین نئوپلاسمی در زنان و اولین علت مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در میان زنان جهان می‌باشد. این بیماری در برگیرنده ۵۰٪ از سرطان‌های زنان و بیش از ۴۰ هزار مرگ‌ومیر در سال است (۱). روند رو به رشد این بیماری در ایران نیز گزارش شده است؛ به‌طوری‌که میزان بروز سرطان پستان از ۳/۹۲ در ۱۰۰ هزار زن در سال ۲۰۰۳ به ۵/۱۶ در ۱۰۰ هزار در سال ۲۰۱۰ رسیده است و میزان مرگ‌ومیر ناشی از بیماری از ۱/۴ در ۱۰۰ هزار زن در سال ۱۹۹۵ به ۳/۵۲ در ۱۰۰ هزار نفر در سال ۲۰۰۴ افزایش یافته است (۲). سرطان پستان یک بیماری به شدت ناهمگن است که تحت تأثیر عوامل ژنتیکی و محیطی به وجود می‌آید. حدود ۱۰-۵٪ از سرطان‌های پستان از نوع فامیلی و وراثتی می‌باشد (۳). بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که جهش در دو ژن ( Breast Cancer susceptibility Gene1) BRCA1 و BRCA2 احتمال ابتلاء به سرطان پستان را در زنان مبتلا به سرطان پستان ارثی تا ۳۰٪ افزایش می‌دهد (۴). بیش از نیمی از زنان که دارای این ژن‌های جهش یافته هستند، تا ۷۰ سالگی به سرطان پستان، تخمدان و در مواردی سرطان روده و پانکراس و ... مبتلا می‌شوند (۵).

DNA حاوی اطلاعات بسیار مهمی برای بقای موجود زنده می‌باشد و هرگونه تغییر در ساختار این مولکول حیاتی منجر به آسیب‌های شدید سلولی یا سرطان خواهد شد. همه موجودات زنده برای مقابله با آسیب‌های وارده به DNA، مجموعه‌ای پیچیده از مکانیسم‌های ترمیمی دارند. ۵ مسیر عمده ترمیمی شامل: روش نوترکیبی هم‌سان (همولوگوس) (HRR[1])، روش اتصال دو انتهای غیر همولوگ (NHEJ[2])، روش برش نوکلئوتید (NER[3])، روش برش باز (BER[4]) و روش جفت ناجور (MMR[5]) می‌باشد. BRCA1 و BRCA2 در مسیرهای NHEJ، HRR و NER دارای نقش اصلی و کلیدی هستند و جهش‌هایی در این دو ژن باعث می‌شود آن‌ها در این فعالیت‌های اصلی نتوانند نقش خود را ایفا کنند. این جهش‌ها در سلول‌های اپی‌تلیوم پستان افراد در معرض خطر، منجر به تحریک چرخه سلولی و رشد غیر قابل کنترل، توقف خودکشی سلول و نامیرا شدن سلول‌ها می‌گردد که این تغییرات در نهایت منجر به سرطانی شدن بافت پستان می‌شود (۶).

جهش در ژن BRCA1 مسئول ۴۵٪ از سرطان‌های پستان وراثتی و ۳۰-۲٪ از سرطان‌های پستان غیر وراثتی می‌باشد (۷). طول این ژن معادل ۱۰۰ کیلوباز بوده و بر روی باند ۲۱ بازوی بلند کروموزوم ۱۷ (17q21) قرار گرفته است. ژن BRCA1 ۲۴ اگزون داشته و پروتئینی با همین نام به طول ۱۷۶۳ آمینواسید کد می‌کند. اگزون ۱۱ بزرگ‌ترین اگزون این ژن بوده و ۶/۷ کیلوباز طول دارد. اگزون ۱ این ژن در سطح mRNA نسخه‌برداری نمی‌شود و اگزون ۴ نیز توالی Alu می‌باشد (۸). نسخه‌برداری این ژن تحت تأثیر دو پروموتر $\alpha$ و $\beta$ بوده و هر دو پروموتر توسط استروژن تحریک می‌شوند (۹).

با وجود آنکه بیش از ۱۶۰۰ واریانت از ژن BRCA1 و ۱۸۰۰ عدد از ژن BRCA2 شناسایی شده است، بیشترین جهش‌های کشنده در این ژن‌ها، جهش‌های تغییر قالب و جهش‌های بی‌معنی می‌باشند که باعث خاتمه زودرس در ساخت زنجیره پروتئین می‌شوند (۱۰، ۱۱). تعدادی از این جهش‌ها که در نژادهای خاص مشاهده شده و فراوانی بالایی دارند، به عنوان جهش بنیان‌گذار[6] تلقی می‌شوند. سه جهش 185delAG و 5382insC که به ترتیب در اگزون‌های ۲ و ۲۰ ژن BRCA1 و جهش 6174 del T در اگزون ۱۱ ژن BRCA2 به عنوان جهش بنیان‌گذار جمعیت یهودیان اشک‌نازی شناخته می‌شود و همچنین در بسیاری از جمعیت‌های دیگر نیز مشاهده شده‌اند (۱۲). عوامل مختلفی مانند محیط، جغرافیا و سایر فاکتورها بر میزان شیوع و نوع واریانت جهش‌های BRCA1 و BRCA2 در میان جوامع مختلف تأثیر گذارند (۱۳، ۱۴). میزان

[1] Homologous recombination repair
[2] Non-homologous end joining
[3] Nucleotide excision repair
[4] Base excision repair
[5] Mismatch repair
[6] Founder effect

شیوع جهش‌های BRCA1 و BRCA2 در کشورهای توسعه یافته بین ۱۳/۱-۱/۸٪ متغیر است. این شیوع در میان کشورهای آسیایی بین ۸/۶-۰/۸٪ است (۱۵، ۱۶). متأسفانه سن شروع سرطان پستان در ایران همچون دیگر کشورهای در حال توسعه، نسبت به کشورهای پیشرفته بسیار پایین‌تر است. شایع‌ترین سن مرگ‌ومیر ناشی از سرطان پستان در ایران ۴۹-۴۰ سال است، در حالی که در کشورهای پیشرفته این بازه ۶۰-۵۵ سال است. بنابراین در ایران سن ابتلاء به سرطان پستان حداقل یک دهه پایین‌تر از کشورهای پیشرفته است (۱۷). عمده‌ترین دلیل این اختلاف، می‌تواند مستقیماً به آگهی عمومی و بکارگیری یک برنامه غربالگری سرطان پستان مربوط باشد. با توجه به آنچه بیان شد، بایستی نوترکیبی ژن‌های BRCA1 و BRCA2 در افراد با سابقه ارثی ابتلاء به سرطان پستان بررسی شود (۱۸). امروزه در سراسر دنیا آزمایش‌های ژنتیکی به‌طور رایج برای تعیین حاملان جهش‌های ژنتیکی در خانواده‌هایی که سابقه قوی استعداد به سرطان پستان دارند، انجام می‌گیرد. نتایج این آزمایشات راهنمای مفیدی برای افراد در معرض خطر است و به آنها این امکان را می‌دهد که بتوانند از بروز سرطان جلوگیری کنند و یا اینکه آن را زودتر تشخیص دهند (۱۹).

## روش‌کار

این مطالعه توصیفی بین سال‌های ۹۶-۱۳۹۴ بر روی ۸۸ بیمار مبتلا به سرطان پستان شهر بیرجند انجام شد. نمونه‌گیری از تعدادی از بیمارانی که تحت درمان زیر نظر انکولوژیست بودند، با مراجعه به مراکز درمانی و کلینیک‌های تخصصی سطح شهر بیرجند انجام شد. همچنین به منظور جمع‌آوری نمونه‌های بهبود یافته سرطانی پستان، فراخوانی در مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی بیرجند داده شد و با کسب رضایت از بیماران مراجعه شونده نمونه‌گیری لازم صورت گرفت. پرسشنامه یا فرم اطلاعاتی و همچنین فرم رضایت بیمار در مرحله اول قبل از شروع مطالعه طراحی و اطلاعات فردی و کلینیکوپاتولوژیکی بیماران از پرونده پزشکی آنها استخراج شد. سپس ۵ سی‌سی خون وریدی از هر دو گروه سالم و بیمار گرفته و در ادامه در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA جمع‌آوری و سپس به آزمایشگاه منتقل گردید.

استخراج DNA و انجام واکنش PCR:

DNA ژنومیک با استفاده روش salting out استخراج و برای بررسی غلظت DNA تخلیص شده هر نمونه از دستگاه نانودراپ (Epoch Microplate Specterophotometer, BioTek, USA) استفاده شد. نمونه DNA این افراد در بانک DNA دانشگاه علوم پزشکی بیرجند در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد جمع‌آوری شد (۲۰).

به کمک نرم‌افزار Gene Runner، Primer 3 و Primer Blast و پایگاه‌های اطلاعاتی از قبیل NCBI و UCSC، پرایمرهای مربوط به هر یک از اگزون‌های (۶، ۱۳ و ۲۰) ژن BRCA1 طراحی و جهت سنتز به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید. انتخاب اگزون‌ها با توجه به گزارشات شایع در مطالعات دیگر می‌باشد. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و به روش PCR، قطعات ژنی مورد نظر تکثیر گردید (جدول ۱). به منظور اطمینان از تکثیر درست قطعات، آن‌ها بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز و توسط دستگاه ژل داک شرکت UVITEC بررسی شد.

واکنش PCR در حجم ۳۵ میکرولیتر شامل ۳/۵ میکرولیتر از PCR buffer 10X، ۱/۴ میکرولیتر ازMgCl2 (۵۰ میلی مولار)، ۰/۷ میکرولیتر از dNTP mix (۱۰ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت (۱۰ PM)، ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی و ۰/۲ آنزیم پلی‌مراز Taq (۱۰ یونیت بر میکرولیتر) و در دستگاه ترموسایکلر مدل Mastercycler شرکت Eppendorf آلمان انجام شد. برنامه دمایی و زمانی تکثیر ژن BRCA1 در ۳۵ سیکل به قرار زیر می‌باشد:

واسرشت‌سازی اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، واسرشت‌سازی ثانویه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای چسبیدن پرایمرها بسته به نوع پرایمرها ۵۵-۵۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (جدول ۱) ، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه بود.

پس از انجام واکنش PCR، برای اطمینان از صحت تکثیر و تعیین میزان DNA تکثیر شده، الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۱٪ انجام شد.

**جدول ۱- خصوصیات آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن BRCA1**

| دمای اتصال | طول قطعه تکثیر شده (bp) | جایگاه | توالی | نام آغازگر |
|---|---|---|---|---|
| ۵۲ | ۳۱۱ | اگزون ۶ | ۵- CGGTTTATACAGATGTCAATG -۳′ | رفت (forward) |
| | | | ۵- CGTCATAGAAAGTAATTGTGC -۳′ | برگشت (reverse) |
| ۵۷ | ۳۲۰ | اگزون ۱۳ | ۵-AATGGAAAGCTTCTCAAAGTA - ۳′ | رفت (forward) |
| | | | ۵-ATGTTGGAGCTAGGTCCTTAC-۳′ | برگشت (reverse) |
| ۵۵ | ۲۵۸ | اگزون ۲۰ | ۵- ATATGACGTGTCTGCTCCAC -۳′ | رفت (forward) |
| | | | ۵- AGTCTTACAAAATGAAGCGG -۳′ | برگشت (reverse) |

**تعیین ژنوتیپ محصولات PCR به روش چندشکلی فضایی تک‌رشته‌ای (SSCP):**

برای تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها، از روش PCR-SSCP با استفاده از الکتروفورز عمودی روی ژل پلی‌اکریل‌آمید و رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده شد. بدین منظور ۸ میکرولیتر بافر بارگذاری SSCP (شامل فرمامید ۹۹٪، EDTA ۰/۵ مولار، برموفنل و زینول سیانید ۱۰٪) با ۵ میکرولیتر محصول PCR مخلوط و ورتکس شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا رشته‌های DNA واسرشت شود. برای جلوگیری از اتصال مجدد رشته‌ها به یکدیگر، بلافاصله به داخل یخ منتقل گردید و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد الکتروفورز شدند. برای مشاهده الگوهای باندی از تانک الکتروفورز عمودی شرکت پایا پژوهش پارس با صفحات شیشه‌ای به ابعاد ۱۷*۱۸ و ژل اکریل آمید ۱۰٪ استفاده شد. الکتروفورز نمونه‌ها به مدت ۲۰ ساعت و با اختلاف پتانسیل ۱۲۰ ولت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با بافر TBE(1X) انجام شد. در نهایت رنگ‌آمیزی ژل به روش نیترات نقره انجام گرفت.

حرکت تک رشته‌ای DNA بر حسب پیوند بین بازها و ایجاد اشکال فضایی صورت گرفت. هر نمونه که دارای اختلاف در موقعیت نوارهای DNA نسبت به کنترل سالم بود، به عنوان یک نمونه مظنون به جهش تلقی گردید و جهت بررسی وجود هرگونه جهش، نمونه‌های با الگوی باندی متفاوت به شرکت زیست فناوری کوثر جهت تعیین توالی به روش سنگر ارسال گردید. این روش یکی از روش‌های توالی‌یابی DNA بر پایه خاتمه رشته دی‌اکسی‌نوکلئوتید توسط DNA پلیمراز در فرآیند همانندسازی DNA است. آنالیز توالی‌های به‌دست آمده توسط نرم‌افزار Chromas انجام گرفت و جهش‌ها و پلی مورفیسم‌ها شناسایی شدند. داده‌ها پس از گردآوری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۲) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

از آنجایی‌که جهش‌های ژنتیکی در سرتاسر این ژن اتفاق می‌افتد، در نتیجه آنالیز مولکولی کامل ژن به دلایل مالی و تکنیکی مقدور نبود، بدین منظور در این مطالعه برخی از نقاطی که به لحاظ بروز جهش شایع‌تر شناخته شده‌اند، انتخاب شدند.

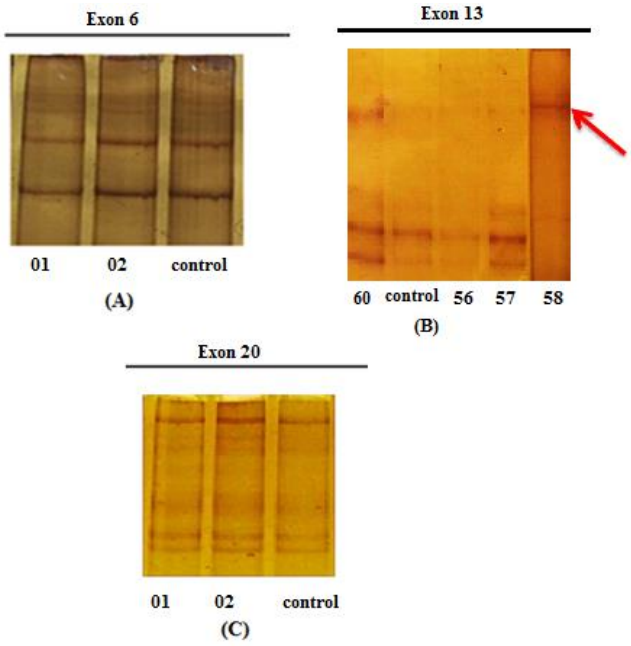
## یافته‌ها

در این مطالعه توصیفی، ۸۸ زن مبتلا به سرطان پستان که ۱۱ نفر (۱۲/۵٪) آنها سابقه ابتلاء به سرطان پستان ارثی را داشتند با میانگین سنی ۱/۱۴±۸۱/۴۵ سال به عنوان گروه بیمار مورد مطالعه قرار گرفتند. ۷۰ نفر (۷۹/۵٪) از نمونه‌ها مبتلا به نوع کارسینوم داکتال، ۱۲ نفر (۱۳/۶٪) کارسینوم لوبولار و ۶ نفر (۶/۸٪) مبتلا به نوع نادر کارسینوم موسینی بودند. در بین نمونه‌های مورد مطالعه، ۶۹ نفر (۷۸/۴٪) grade II، ۱۲ نفر (۱۳/۶٪) grade III و ۷ نفر (۷/۹٪) grade I بودند.

به منظور آنالیز PCR-SSCP، اگزون‌های ۶، ۱۳ و ۲۰ از ژن BRCA1 با استفاده از پرایمرهای طراحی شده و DNA ژنومی به‌دست آمده از بیماران تکثیر گردید. یک قطعه ۳۱۱ جفت بازی حاوی اگزون ۶ و قطعه ۳۲۰ جفت بازی حاوی اگزون ۱۳ و قطعه دیگر ۲۵۸ جفت بازی حاوی اگزون ۲۰ به‌دست آمد و جهش‌های این سه

اگزون با استفاده از تکنیک SSCP و توالی‌یابی مستقیم بررسی شد.

از آنجایی که SSCP دقت بالایی دارد و بر اساس تغییر کنفورماسیون حاصل از تغییر در نوع یا توالی نوکلیوتیدها است، تفاوت تک نوکلئوتید را نشان می‌دهد، بنابراین هرگونه تغییر در الگوی باندهای مربوط به تک رشته‌ای‌ها می‌تواند دلیل بر تغییر توالی DNA تک رشته‌ای باشد. در هر بار SSCP، باندهای حاصله از فرد سالم به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد، بنابراین در صورت مشاهده تفاوت در الگوی باندها در هر یک از نمونه‌ها با الگوی مشاهده شده در کنترل مثبت، نمونه مورد نظر جهت تعیین توالی فرستاده شد. تمام نمونه‌های مشکوک به تفاوت در الگوی باندی تعیین توالی و مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱). در اگزون‌های ۶ و ۲۰ هیچ تفاوت الگویی مشاهده نشد. جهت اطمینان چند نمونه برای توالی‌یابی فرستاده شد و نتایج نشان داد هیچ جهشی در این دو اگزون رخ نداده است. نتایج SSCP وجود دو الگوی باندی متفاوت را در اگزون ۱۳ نشان داد که پس از توالی‌یابی این نمونه‌ها یک پلی‌مورفیسم در نوکلئوتید ۴۴۲۷ مشخص شد. به موجب این موتاسیون، آمینواسید شماره ۱۴۳۶ سیرین تغییر نمی‌کند. این پلی‌مورفیسم در ۲۸ فرد بیمار مشاهده شد که ۱۲ نفر (۴۲/۸٪) آنها ژنوتیپ هموزیگوت CC و ۱۶ فرد (۵۷/۲٪) دیگر ژنوتیپ هتروزیگوت TC را نشان دادند (جدول ۲).




**شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR اگزون‌های ۶، ۱۳ و ۲۰ ژن BRCA1 بر روی ژل اکریل آمید ۱۰٪. (A): الگوی باندی اگزون ۶، نمونه‌های بیمار شماره ۰۱، ۰۲ و نمونه فرد کنترل. (B): الگوهای باندی اگزون ۱۳ نمونه‌های بیمار شماره ۵۶، ۵۷ و کنترل الگوی باندی یکسان و نمونه‌های ۵۸ و ۶۰ الگوی باندی متفاوت نشان دادند. (C): الگوی باندی اگزون۲۰ نمونه‌های بیمار شماره ۰۱، ۰۲ و کنترل.**

**جدول۲- نتایج حاصل از بررسی جهش‌های ژن BRCA1**

| اگزون | اسید نوکلیک | تغییر اسید آمینه | اثر جهش | نوع جهش | فراوانی جهش | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | NFBC =۷۷ | FBC =۱۱ |
| ۱۳ | ۴۴۲۷ T>C | Ser۱۴۳۶ Ser | هم معنی | پلی مورفیسم | ۲۴ (۳۱٪) | ۴ (۳۶٪) |

FBC: Familiar Breast Cancer, NFBC: Non Familiar Breast Cancer

## بحث

در مطالعه حاضر برای اولین بار جهش‌های ژنتیکی ژن BRCA1 در جمعیت استان خراسان جنوبی (شرق ایران) مورد بررسی قرار گرفت. این ژن جزء خانواده ژن‌های سرکوبگر تومور بوده و وظیفه ترمیم جهش‌ها و آسیب‌های وارد بر DNA را بر عهده دارد. جهش در این ژن با افزایش خطر ابتلاء به برخی از انواع سرطان‌ها از جمله سرطان پستان و تخمدان همراه است. بدین منظور ۸۸ زن مبتلا به سرطان پستان که ۱۱ نفر مبتلا به سرطان پستان ارثی و ۷۷ نفر از آنها سرطان پستان غیرارثی بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین سنی بیماران مورد مطالعه ۴۵/۸ سال بود که با مطالعات دیگری که در استان‌های مختلف ایران انجام گرفته است (بین ۵۰-۴۵ سال) مشابهت داشت (۲۳-۲۱)، در حالی که میانگین سنی این بیماری در ایالات متحده آمریکا ۶۱ سال می‌باشد. گزارشات نشان دهنده این واقعیت است که میانگین سنی ابتلاء به سرطان پستان در کشورهای در حال توسعه از جمله ایران بیش از یک دهه کمتر از کشورهای توسعه یافته بوده که یکی از دلیل آن، پایین بودن میانگین سنی جمعیت زنان در ایران نسبت به کشورهای دیگر و همچنین به دلیل عدم وجود برنامه‌های پیشگیری و غربالگری منظم و تدوین شده برای کنترل سرطان در کشورهای در حال توسعه می‌باشد (۲۴). در نمونه‌های مورد مطالعه ۸۰٪ مبتلا به کارسینوم داکتال، ۱۳٪ مبتلا به کارسینوم لوبولار و ۷٪ مبتلا به کارسینوم موسینی بودند. بر اساس مطالعات انجام شده، شایع‌ترین نوع سرطان پستان، داکتال کارسینوما است و بر اساس گزارشات تقریباً از هر ۱۰ نفر، ۷ نفر مبتلا به سرطان پستان، داکتال کارسینوما می‌باشند (۲۷-۲۵).

در مطالعه حاضر به منظور بررسی جهش‌های ژن BRCA1 از تکنیک SSCP به همراه توالی‌یابی مستقیم DNA استفاده شد که بر اساس نتایج، هیچ یک از جهش‌های گزارش شده در اگزون ۶ در جمعیت مورد مطالعه حاضر وجود نداشت. نتایج مطالعه حاضر با مطالعه کشاورزی و همکاران (۲۰۱۰) که بر روی جمعیت تهران انجام شد، مطابقت داشت و هیچ جهشی در اگزون ۶ گزارش نشد (۲۸). با توجه به اینکه جهش 5382insC یکی از جهش‌های بنیانگذار ( Funder mutation) ژن BRCA1 در اگزون ۲۰ واقع می‌شود و در کشورهای اروپایی و آمریکا فراوانی بالایی دارد، در مطالعه حاضر اگزون ۲۰ مورد بررسی قرار گرفت، ولی هیچ جهشی در این اگزون مشاهده نشد. در بسیاری از مطالعاتی که در ایران انجام شده است، فراوانی این جهش صفر گزارش شده است (۲۹، ۳۰). تنها در مطالعه کوشیار و همکاران (۲۰۱۳) که بر روی جمعیت شمال شرق ایران انجام دادند، فراوانی این جهش ۱٪ گزارش شد (۳۱).

نتایج SSCP و توالی‌یابی اگزون ۱۳ نشان‌دهنده یک پلی‌مورفیسم در نوکلیوتید ۴۴۲۷ بود که باز تیمین به سیتوزین تبدیل و اسیدآمینه تغییری نکرد. با جستجوی این واریانت c. 4308T>C در پایگاه‌های اطلاعاتی ژنومیک مانند NCBI گزارش قبلی آن توسط سایر محققان داخلی و خارجی با نام بین‌المللی rs1060915 و درج در dbSNP (www.ncbi.nlm.nih.gov/snp) تأیید شد. این واریانت ژنی در ۲۸ فرد بیمار مشاهده شد که ۴ نفر آنها مبتلا به سرطان پستان ارثی و ۲۴ نفر دیگر مبتلا به سرطان غیر ارثی بودند. در بین نمونه‌ها، یکی از بیماران با ژنوتیپ هموزیگوت CC مبتلا به سرطان زودرس پستان بوده و در سن ۲۸ سالگی به این بیماری مبتلا شده بود. فراوانی ژنوتیپ وحشی، ژنوتیپ هتروزیگوت و هموزیگوت rs1060915 در جمعیت مورد مطالعه حاضر به ترتیب ۶۸/۲، ۱۸/۲ و ۱۳/۶٪ و همچنین فراوانی آللی این پلی‌مورفیسم برای آلل C، ۲۷/۷٪ و برای آلل T، ۷۷/۳٪ در جمعیت بود. در مطالعات متعدد این پلی‌مورفیسم در جمعیت ایران گزارش شده است، از جمله در مطالعه کشاورزی و همکاران (۲۰۱۲) که بر روی ۸۵ بیمار انجام شد، فراوانی این پلی‌مورفیسم در جمعیت تهران ۱۶/۴٪ بود (۳۲). در مطالعه پیتچمن و همکاران (۲۰۰۵) که بر روی جمعیت ایران انجام گرفت، فراوانی این پلی‌مورفیسم ۳۰٪ گزارش شد (۳۳). در مطالعه قادری و همکاران (۲۰۰۱) که بر روی ۸۰ زن مبتلا به سرطان پستان جمعیت شیراز انجام شد، فراوانی

پلی‌مورفیسم c. 4308T>C در اگزون ۱۳ برای ژنوتیپ وحشی ۳۶/۴٪، ژنوتیپ هتروزیگوت ۵۰٪ و هموزیگوت ۱۳/۶٪ بود (۳۴).

## نتیجه‌گیری

در این مطالعه میزان بروز جهش در دو اگزون ۶ و ۲۰ از ژن BRCA1 صفر و یک جهش از نوع پلی‌مورفیسم rs1060915 در اگزون ۱۳ از ژن BRCA1 با فراوانی ۳۱/۸٪ مشاهده شد.

## تشکر و قدردانی

این مطالعه به صورت یک طرح تحقیقاتی مصوب شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند در سال ۱۳۹۴ با شماره کد ۱۱۴۵ و با حمایت مالی معاونت محترم تحقیقات و فناوری این دانشگاه به انجام رسید. بدین‌وسیله از تمام افرادی که ما را در انجام این مطالعه یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

## منابع


1. Ferlay J, Héry C, Autier P, Sankaranarayanan R. Global burden of breast cancer. Breast cancer epidemiology. New York: Springer; 2010. P. 1-19.
2. Fouladi N, Pourfarzi F, Amani F, Ali-Mohammadi H, Lotfi I, Mazaheri E. Breast cancer in Ardabil province in the north-west of Iran: an epidemiological study. Asian Pac J Cancer Prev 2012; 13(4):1543-5.
3. Claus EB, Schildkraut JM, Thompson WD, Risch NJ. The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. Cancer 1996; 77(11):2318-24.
4. Beggs AD, Hodgson SV. Genomics and breast cancer: the different levels of inherited susceptibility. Eur J Hum Genet 2009; 17(7):855-6.
5. Barakat RR, Markman M, Randall M. Principles and practice of gynecologic oncology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009.
6. Deng CX, Wang RH. Roles of BRCA1 in DNA damage repair: a link between development and cancer. Hum Mol Genet 2003; 12(Suppl 1):R113-23.
7. Stoppa-Lyonnet D, Laurent-Puig P, Essioux L, Pages S, Ithier G, Ligot L, et al. BRCA1 sequence variations in 160 individuals referred to a breast/ovarian family cancer clinic. Institut Curie Breast Cancer Group. Am J Hum Genet 1997; 60(5):1021.
8. Stoppa-Lyonnet D, Ansquer Y, Dreyfus H, Gautier C, Gauthier-Villars M, Bourstyn E, et al. Familial invasive breast cancers: worse outcome related to BRCA1 mutations. J Clin Oncol 2000; 18(24):4053-9.
9. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, et al. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. Science 1990; 250(4988):1684.
10. Belogianni I, Apessos A, Mihalatos M, Razi E, Labropoulos S, Petounis A, et al. Characterization of a novel large deletion and single point mutations in the BRCA1 gene in a Greek cohort of families with suspected hereditary breast cancer. BMC Cancer 2004; 4(1):61.
11. von Sternberg T, Averbeck B, McClure N. Collection of data on race and ethnic group by physician practices. N Engl J Med 2010; 363(1):96.
12. Levy-Lahad E, Catane R, Eisenberg S, Kaufman B, Hornreich G, Lishinsky E, et al. Founder BRCA1 and BRCA2 mutations in Ashkenazi Jews in Israel: frequency and differential penetrance in ovarian cancer and in breast-ovarian cancer families. Am J Hum Genet 1997; 60(5):1059-67.
13. Landgren O, Katzmann JA, Hsing AW, Pfeiffer RM, Kyle RA, Yeboah ED, et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance among men in Ghana. Mayo Clin Proc 2007; 82(12):1468-73.
14. Claes K, Poppe B, Machackova E, Coene I, Foretova L, De Paepe A, et al. Differentiating pathogenic mutations from polymorphic alterations in the splice sites of BRCA1 and BRCA2. Genes Chromosomes Cancer 2003; 37(3):314-20.
15. Tommasi S, Crapolicchio A, Lacalamita R, Bruno M, Monaco A, Petroni S, et al. BRCA1 mutations and polymorphisms in a hospital-based consecutive series of breast cancer patients from Apulia, Italy. Mutat Res 2005; 578(1-2):395-405.
16. Liede A, Narod SA. Hereditary breast and ovarian cancer in Asia: genetic epidemiology of BRCA1 and BRCA2. Hum Mutat 2002; 20(6):413-24.
17. Khadivi R, Harrirchi I, Akbari ME. Ten year breast cancer screening and follow up in 52200 women in Shahre-Kord, Iran (1997-2006). Iran J Cancer Prev 2012; 1(2):73-7.
18. Kooshyar MM, Nasiri MR, Nasiri K. Role of BRCA1 and BRCA2 genes in risk of breast cancer. Iran J Obstet Gynecol Infertil 2016; 19(19):25-38. (Persian).
19. Youlden DR, Cramb SM, Dunn NA, Muller JM, Pyke CM, Baade PD. The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality. Cancer Epidemiol 2012; 36(3):237-48.

20. Mohsen N, Ahmadreza S, Fatemeh H, Fatemeh H, Fariba ER. Frequency of K-RAS and N-RAS Gene mutations in colorectal cancers in southeastern Iran. Asian Pac J Cancer Prev 2016; 17(9):4511-5.
21. Harirchi I, Ebrahimi M, Zamani N, Jarvandi S, Montazeri A. Breast cancer in Iran: a review of 903 case records. Public Health 2000; 114(2):143-5.
22. Sadjadi A, Nouraie M, Ghorbani A, Alimohammadian M, Malekzadeh R. Epidemiology of breast cancer in the Islamic Republic of Iran: first results from a population-based cancer registry. East Mediterr Health J 2009; 15(6):1426-31.
23. Khalili G, Barzegar A, Nikbakhsh N, Ansari-Pirsaraee Z. Study of Cytochrome P450 1A1 (T3801C) single nucleotide polymorphism in patients with breast cancer in mazandaran province-northern Iran. Res Mol Med 2015; 3(4):17-22.
24. Neinavaie M, Soltani HR, Soltani N. The relationship between breast self-examination (BSE) awareness and demographic factors in women health management. Iran J Obstet Gynecol Infertil 2017; 20(1):15-22. (Persian).
25. Harirchi I, Karbakhsh M, Kashefi A, Momtahen AJ. Breast cancer in Iran: results of a multi-center study. Asian Pac J Cancer Prev 2004; 5(1):24-7.
26. Janbabaee G, Moosazadeh M, Asdaghi Jahrom Z. Epidemiological, clinical and pathological characteristics of patients with breast cancer. J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 25(134):43-51.
27. Bakhtiyari A, Haj Ahmadi M. Year assessment of breast cancer at Rajaii Hospital, Babolsar (1991-1996). Iran J Obstet Gynecol Infertil 2006; 9(1):47-51. (Persian).
28. Keshavarzi F, Javadi GR, Nafissi N, Akbari ME, Yassaee VR, Sharafi Farzad M, et al. BRCA1 and BRCA2 genetic testing in breast and/or ovarian cancer families in Iran. Yakhteh Med J 2010; 12(3):329-40.
29. Mehdipour P, Hosseini-Asl S, Savabi-E A, Habibi L, Alvandi E, Atri M. Low frequency of 185delAG founder mutation of BRCA1 gene in Iranian breast cancer patients. J Cancer Mol 2006; 2(3):123-7.
30. Tajadini MH, Khadem H, Pourhosein M, Sabzghabaee AM, Hemati S, Sadeghi HM. Investigating the prevalence of BRCA1 and BRCA2 Gene mutations in patients with breast cancer. J Isfahan Med Sch 2013; 30(218):2217-24.
31. Kooshyar MM, Nassiri M, Mahdavi M, Doosti M, Parizadeh A. Identification of germline BRCA1 mutations among breast cancer families in Northeastern Iran. Asian Pac J Cancer Prev 2013; 14(7):4339-45.
32. Keshavarzi F, Javadi GR, Zeinali S. BRCA1 and BRCA2 germline mutations in 85 Iranian breast cancer patients. Fam Cancer 2012; 11(1):57-67.
33. Pietschmann A, Mehdipour P, Atri M, Hofmann W, Hosseini-Asl SS, Scherneck S, et al. Mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in Iranian high risk breast cancer families. J Cancer Res Clin Oncol 2005; 131(8):552-8.
34. Ghaderi A, Talei A, Farjadian S, Mosalaei A, Doroudchi M, Kimura H. Germline BRCA1 mutations in Iranian women with breast cancer. Cancer Lett 2001; 165(1):87-94.