

## جهش‌های ژرم‌لاین اگزون‌های ۱۰ و ۱۱ و پروتوانکوژن رت در ۵۷ بیمار ایرانی مبتلا به سرطان مدولری تیروئید

دکتر مهدی هدایتی، دکتر ایرج نبی‌پور، دکتر نصراله رضایی قلعه، دکتر فریدون عزیزی

### چکیده

**مقدمه:** سرطان مدولری تیروئید (MTC) به دو نوع اسپورادیک و ارثی بروز می‌کند. ژن عامل حساسیت به فرم ارثی MTC، پروتوانکوژن رت (RET) است. هدف از این مطالعه، ارزیابی شیوع جهش‌های ژرم‌لاین رت در اگزون‌های ۱۰ و ۱۱ در میان مبتلایان به این بیماری در جمعیت ایرانی است. **مواد و روش‌ها:** ۵۷ بیمار غیر منسوب مبتلا به MTC در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند که میانگین سنی آنها ۴۰/۰ سال (با انحراف معیار ۱۱/۵ سال) و نسبت زن به مرد در میان آنها ۱/۲ به ۱ بود. DNA ژنومی از نمونه خون محیطی بیماران استخراج شد و اگزون‌های ۱۰ و ۱۱ پروتوانکوژن رت با استفاده از تکنیک PCR تکثیر گردید. سپس محصولات PCR در معرض آنزیم‌های محدودکننده‌ی معین قرار گرفته، الگوی پلی‌مرفیسم طول قطعات حاصل از عمل آنزیم‌های محدود کننده (RFLP) به دست آمد. **یافته‌ها:** بررسی الگوهای به دست آمده از نظر جهش‌های متداول اگزون‌های ۱۰ و ۱۱ پروتوانکوژن رت نشان داد که تنها بیمار MEN2A شرکت کننده در مطالعه دارای جهش C634W در اگزون ۱۱ بود. در میان ۶ نفر از بستگان درجه اول بیمار که مورد بررسی ژنتیکی قرار گرفتند، سه نفر دارای جهش مزبور بودند. از ۵۳ بیمار MTC به ظاهراً اسپورادیک، یک بیمار جهش C620R در اگزون ۱۰ و دو بیمار جهش C634Y در اگزون ۱۱ را نشان دادند. تنها بیمار MEN2B و دو بیمار MTC فامیلی هیچ‌کدام حاوی جهش‌های اگزون ۱۰ و ۱۱ ژن رت نبودند. **نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد شیوع جهش‌های اگزون ۱۰ و ۱۱ ژن رت در میان بیماران ایرانی مبتلا به MTC به ظاهراً اسپورادیک بالا باشد. بر اساس نتایج این مطالعه، بررسی روتین جهش‌های ژرم‌لاین پروتوانکوژن رت در میان تمامی بیماران مبتلا به MTC در ایران توصیه می‌شود. بیماران مبتلا به انواع ارثی این بیماری ممکن است نیازمند بررسی وسیع‌تر از نظر جهش‌های ژن رت باشند.

**واژگان کلیدی:** سرطان مدولری تیروئید، پروتوانکوژن رت، نئوپلازی اندوکراین چندگانه، آنالیز جهش

دریافت مقاله: ۸۴/۱/۱۵ - دریافت اصلاحیه: ۸۴/۸/۲۸ - پذیرش مقاله: ۸۴/۸/۳۰

### مقدمه

C منشأ گرفته، در ۷۵٪ موارد به شکل اسپورادیک و در ۲۵٪ موارد به شکل ارثی بروز می‌کند.<sup>۱</sup> انواع ارثی MTC، یا در

i- Medulaary thorid carcinoma

سرطان مدولری تیروئید MTC<sup>۱</sup> از سلول‌های پارافولیکولر

در حال حاضر ارزیابی ژنتیکی جهش‌های ژرم لاین پروتوانکوژن رت مقدر است و بدین ترتیب امکان تشخیص زودرس افراد حامل جهش‌های خطرناک که در معرض خطر بروز MTC در سال‌های بعد هستند، وجود دارد. آزمایش ژنتیکی، به ویژه برای بستگان درجه اول بیماران مبتلا به MTC واجد بیشترین فایده است. اگر اعضای خانواده‌ی بیمار مبتلا به MTC فاقد جهش شناخته شده در پروتوانکوژن رت باشند، احتمال بروز MTC در ایشان مشابه جمعیت عادی است و نیازی به انجام اقدام‌های پیشگیرانه‌ی فوق‌العاده (مانند تیروئیدکتومی) نخواهد بود. چنین اقدام‌هایی فقط در مورد آن گروه از اعضای خانواده‌ی بیمار MTC ضرورت دارد که وجود جهش پروتوانکوژن رت در آنها نشان داده شده باشد.<sup>۱۱</sup> معمولاً روش زیر در بررسی ژنتیکی بیماران MTC و بستگان درجه اول آنها به کار گرفته می‌شود: ابتدا اگزون ۱۱ از نظر جهش در کدون ۶۳۴ ارزیابی شده، در صورت فقدان جهش به ترتیب کدون‌های ۶۰۹، ۶۱۱، ۶۱۸ و ۶۲۰ اگزون ۱۰، کدون ۹۱۸ اگزون ۱۶ و اگزون‌های ۱۵-۱۳ مورد بررسی قرار خواهند گرفت.<sup>۲۰</sup>

در سال‌های اخیر نتایج چند مطالعه که به بررسی جهش‌های پروتوانکوژن رت در بیماران MTC در کشورهای آسیایی پرداخته‌اند، منتشر شده است.<sup>۲۱-۲۳</sup> در ایران بررسی DNA بیماران MTC و اعضای خانواده‌ی آنها به طور معمول توصیه نمی‌شود و زمینه‌ی ژنتیکی این بیماران تا کنون مورد بررسی قرار نگرفته است. مطالعه‌ی حاضر که نتایج اولین بخش آن قبلاً منتشر شده است،<sup>۲۴،۲۵</sup> اولین مطالعه در این زمینه در ایران است. هدف از این مطالعه بررسی شیوع جهش‌های شناخته شده‌ی اگزون‌های ۱۰ و ۱۱ در بیماران ایرانی مبتلا به MTC است.

## مواد و روش‌ها

**انتخاب بیماران:** جمعیت تحت مطالعه شامل ۵۷ بیمار غیر منسوب مبتلا به MTC بود که در بیمارستان‌های دانشگاهی و مراکز بالینی شهر تهران بر اساس شواهد آسیب شناختی تشخیص داده شده، تحت عمل جراحی قرار گرفته بودند. بیماران جهت شرکت در این مطالعه فراخوانده می‌شدند و افراد داوطلب پس از تکمیل فرم رضایت نامه وارد مطالعه شدند. موارد ارثی بیماری MTC بر اساس شواهد بالینی

نوع فAMILIARY (FMTC)<sup>i</sup> به صورت ایزوله بروز می‌کنند، یا بخشی از سندرم نئوپلازی اندوکراین چندگانه نوع ۲ (MEN-2)<sup>ii</sup> هستند. این سندرم که از الگوی وراثتی اتوزومی غالب پیروی می‌کند، در ۹۵٪ موارد، شامل MTC، فنوکروموسیتوما و هیپرپلازی پاراتیروئید است (سندرم MEN-ZA) است و در ۵٪ دیگر شامل MTC، فنوکروموسیتوما، نوروماهای مخاطی، گانگلیونوروماتوز روده و ظاهر شبه مارفانی است.<sup>۲۳</sup>

پروتوانکوژن رت (RET) که نوعی رسپتور تیروزین کینازی غشای سلول‌های تمایز یافته از تیغه‌ی عصبی<sup>iii</sup> کد می‌کند، ژن عامل بروز سرطان مدولری تیروئید است.<sup>۴-۹</sup> این پروتئین غشایی که یکبار عرض غشای سلول را طی می‌کند، در بخش خارج سلولی خود حاوی چهار توالی تکراری شبه کدهرین<sup>iv</sup> یک جایگاه اتصال کلسیم و یک جایگاه غنی از سیستئین است و در بخش داخل سلولی خود دارای جایگاه تیروزین کینازی می‌باشد. در پی اتصال لیگاند به پروتئین، دایمریزه شده رسپتور و سپس ترانس‌فسفوریلاسیون واحدهای تیروزین بخش داخل سلولی آن روی می‌دهد. پس از آن واحدهای فسفوتیروزین، پروتئین‌های داخل سلولی دارای جایگاه SH2 و جایگاه اتصال فسفوتیروزین را به خود جلب کرده، در نتیجه باعث انتشار سیگنال به داخل سلول می‌شوند.<sup>۱۰</sup>

تقریباً ۹۲٪ موارد ارثی MTC با جهش‌های ژرم لاین پروتوانکوژن رت ارتباط دارند.<sup>۱۱</sup> ۹۷٪ بیماران MEN-2A و ۸۶٪ بیماران FMTC در یکی از چهار سیستئین اگزون ۱۰ (سیستئین‌های ۶۰۹، ۶۱۱، ۶۱۸ و ۶۲۰) یا سیستئین ۶۳۴ اگزون پروتوانکوژن رت ۱۱ که همگی مربوط به بخش غنی از سیستئین پروتئین در خارج سلول هستند، جهش‌هایی را نشان می‌دهند.<sup>۱۲،۱۳</sup> این جهش‌ها با حذف سیستئین، شرایط را برای دایمریزاسیون غیر طبیعی و مداوم پروتئین حتی در شرایط فقدان لیگاند فراهم می‌کنند.<sup>۱۴-۱۰،۱۶</sup> جهش‌های ژرم لاین در جایگاه داخل سلولی پروتئین رت (در اگزون‌های ۱۳، ۱۴ و ۱۵) نیز ممکن است در بعضی از بیماران FMTC دیده شود. از سوی دیگر در ۲/۵ تا ۷٪ موارد اسپورادیک MTC نیز جهش ژرم لاین پروتوانکوژن رت مشاهده می‌شود.<sup>۱۷،۱۸</sup>

i- Familial medullary thyroid carcinoma

ii- Multiple endocrine neoplasia 2A

iii- Neural crest

iv- Cadherin

انجام شدند و شرایط برای تکثیر اگزون ۱۰ عبارت بود. از ۴۰ سیکل دمای ۹۵ درجه به مدت ۴۵ ثانیه برای دناتوراسیون دمای ۶۶/۵ درجه به مدت ۴۵ ثانیه برای بازسرشت و دمای ۷۲ درجه به مدت ۴۵ ثانیه برای سنتز. برای تکثیر اگزون ۱۱ از ۲۸ سیکل با شرایط مشابه استفاده شد و تنها دمای مرحله‌ی بازسرشت برای اگزون ۱۱، ۶۸ درجه بود. پس از انجام PCR محصولات PCR با استفاده از اتانول رسوب داده شدند.<sup>۲۸</sup>

محصول PCR اگزون ۱۰ در مجاورت مقادیر مناسب آنزیم‌های محدود کننده‌ی Taq I, BstU I, Mbo II, Rsa I, Nla IV و Cfo I و محصول PCR اگزون ۱۱ در مجاورت آنزیم‌های Cfo I, Rsa I, Hae III و Dde I قرار گرفتند. شرایط انکوباسیون مطابق با روش شرکت‌های تولید کننده تنظیم شد. جدول ۱ الگوهای RFLP ناشی از عمل آنزیم‌های فوق‌الذکر را در شرایط وجود یا فقدان جهش‌های اگزون ۱۰ و ۱۱ پروتوانکوژن رت نشان می‌دهد. محصولات ناشی از هضم احتمالی این آنزیم‌ها با استفاده از الکتروفورز روی ژل پلی آکرلامید ۱۰٪ جداسازی و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید با استفاده از پرتو فرابنفش آشکار شدند.

بیوشیمیایی و/ یا هیستوپاتولوژیک به گروه‌های MEN-2A، MEN-2B و FMTC طبقه‌بندی شدند و بقیه‌ی موارد در گروه مبتلایان به MTC ظاهراً اسپورادیک قرار داده شدند. پس از بررسی جهش در پروتوانکوژن رت بیماران، در صورتی که بیمار واجد جهش بود، بستگان درجه اول بیمار جهت بررسی ژنتیکی فراخوانده می‌شدند.

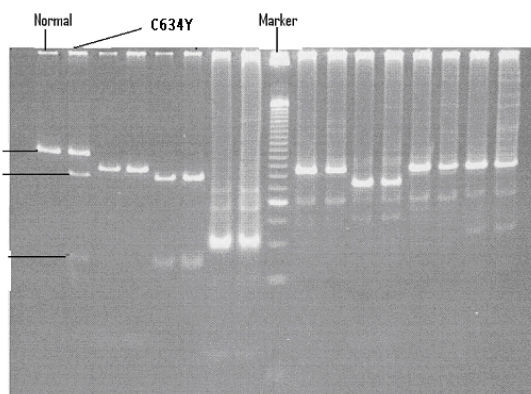
**تعیین ژنوتیپ DNA** ژنومی از نمونه خون محیطی بیماران و با استفاده از روش‌های استاندارد<sup>۲۹</sup> در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی مرکز تحقیقات غدد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی استخراج شد. به منظور تکثیر اگزون ۱۰ از پرایمرهای (10F5'GCGCCCCAGGAGGCTGATGC3') و (10R5'CGTGGTGGTCCCGGCCGCC3') و جهت تکثیر اگزون ۱۱ از پرایمرهای (11AF5'CCTCTGCGGTGCCAAGCCTC3') و (11AR5'CACCGGAAGAGGAGTAGCTG3') استفاده شد.<sup>۳۰</sup> واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر در شرایط زیر انجام شد: ۲/۵ میکرولیتر عصاره‌ی سلولی حاوی DNA غلظت ۰/۲ میلی‌مولار از هر یک از dNTPها غلظت ۰/۵ میکرومولار از پرایمرهای اگزون ۱۰ یا غلظت ۰/۲۵ میکرومولار از پرایمرهای اگزون ۱۱ و ۰/۲ واحد آنزیم TaqPolymerase. واکنش‌ها در یک ترموسایکلر اتوماتیک

**جدول ۱- جهش‌های پروتوانکوژن رت در اگزون‌های ۱۰ و ۱۱ و الگوی تحدیدی حاصل از عملکرد آنزیم‌های محدود کننده بر اگزون‌های دارای جهش**

| جهش رت | شماره‌اگزون | باز تغییر یافته  |                   | طول قطعات (جفت باز) |                |
|--------|-------------|------------------|-------------------|---------------------|----------------|
|        |             | طبیعی(جهش یافته) | آنزیم محدود کننده | قبل از برش          | الل طبیعی      |
| C611W  | ۱۰          | TGC (TGG)        | Nla IV            | ۱۸۷                 | ۹،۲۸،۷۲،۷۸     |
| C618Y  | ۱۰          | TGC (TAC)        | Rsa I             | ۱۸۷                 | ۱۲۱+۵۶         |
| C618R  | ۱۰          | TGC (CGC)        | Cfo I             | ۱۸۷                 | ۱۲۹+۳،۵۵       |
| C618F  | ۱۰          | TGC (TTC)        | Mbo II            | ۱۸۷                 | ۱۲۴+۳۴،۲۹      |
| C618S  | ۱۰          | TGC (AGC)        | Mbo II            | ۱۸۷                 | ۱۳۹+۱۹،۲۹      |
| C620R  | ۱۰          | TGC (CGC)        | BstU I            | ۱۸۷                 | ۱۳۸+۴۹         |
| C620F  | ۱۰          | TGC (TTC)        | Taq I             | ۱۸۷                 | ۱۳۸+۴۹         |
| C634R  | ۱۱          | TGC (CGC)        | Cfo I             | ۲۳۴                 | ۱۷۳+۶۱         |
| C634Y  | ۱۱          | TGC (TAC)        | Rsa I             | ۲۳۴                 | ۱۷۴+۶۰         |
| C634G  | ۱۱          | TGC (GGC)        | Hae III           | ۲۳۴                 | ۱۳۱+۶۱، ۳۰، ۱۰ |
| C634W  | ۱۱          | TGC (TGG)        | Cfo I             | ۲۳۴                 | ۱۷۰+۶۴         |
| C634S  | ۱۱          | TGC (AGC)        | Dde I             | ۲۳۴                 | ۱۱۳+۵۷، ۵۹، ۵  |

## یافته‌ها

در مجموع ۵۷ بیمار غیر منسوب MTC در این مطالعه شرکت کردند. متوسط سنی بیماران ۴۰/۰ سال و انحراف معیار ۱۱/۵ سال بود. نسبت زن به مرد در میان بیماران ۱/۲ به ۱ بود. از ۵۷ بیمار غیر منسوب شرکت کننده در مطالعه یک مورد MEN-2A، یک مورد MEN-2B و دو مورد FMTC وجود داشتند. ۵۳ بیمار باقیمانده به عنوان مبتلایان به MTC ظاهراً اسپورادیک طبقه‌بندی شدند. بیمار مبتلا به MEN-2A جهش C634W را در اگزون ۱۱ نشان داد. در میان مبتلایان به MTC ظاهراً اسپورادیک، یک بیمار جهش C620R را در اگزون ۱۰ و دو بیمار جهش C634Y را در اگزون ۱۱ نشان دادند (تصویر ۱). هیچ یک از بیماران MEN2B یا FMTC جهش‌های ژرم لاین شناخته شده را در اگزون‌های ۱۰ و ۱۱ پروتوانکوژن رت نشان ندادند.



شکل ۱- جهش C634Y در یکی از بیماران مبتلا به سرطان مدولری تیروئید اسپورادیک ظاهری: پس از عمل آنزیم محدود کننده‌ی Rsa I، الکتروفورز روی ژل نمونه‌ی طبیعی تنها یک قطعه ۲۳۴ جفت بازی و نمونه جهش یافته قطعات ۱۷۴ و ۶۰ جفت بازی را نشان می‌دهد.

بیمار مبتلا به MEN-2A یک مرد ۶۵ ساله بود که مدت ۲۱ سال از تشخیص بیماری او می‌گذشت. در خانواده‌ی او موارد متعددی از سرطان مدولری تیروئید وجود داشت، از جمله خواهر او در سن ۵۰ سالگی با MTC و فئوکروموسیتوما فوت کرده بود و از میان دو پسر و هفت دختر او، یک پسر ۳۹ ساله و دو دختر ۴۶ و ۳۶ ساله مبتلا به MTC و فئوکروموسیتوما بودند و یک دختر ۲۸ ساله‌ی او نیز تنها مبتلا به MTC بود. بررسی جهش در اعضای خانواده نشان داد که اعضای مبتلا به بیماری خانواده همگی دارای جهش مشابه C634W در اگزون ۱۱ هستند، حال آن

که اعضای سالم خانواده فاقد آن جهش می‌باشند. همچنین خانواده‌ی پسر ۳۹ ساله‌ی بیمار مورد بررسی بیشتر قرار گرفت و در پسر ۱۲ ساله‌ی وی نیز جهش C634W مشاهده شد، در حالی که پسر ۹ ساله و دختر ۴ ساله فاقد جهش بودند.

بستگان درجه اول بیماران مبتلا به MTC اسپورادیک ظاهری که واجد جهش در اگزون‌های ۱۰ و ۱۱ بودند، نیز مورد بررسی ژنتیکی قرار گرفتند و هیچ یک از افراد مورد بررسی جهش مشاهده شده در بیمار منسوب به خود را نشان ندادند.

## بحث

در میان ۵۷ بیمار MTC غیر منسوب مطالعه شده تنها بیمار MEN-2A و سه بیمار MTC اسپورادیک ظاهری در اگزون‌های ۱۰ یا ۱۱ پروتوانکوژن رت واجد جهش ژرم لاین شناخته شده بودند. هیچ یک از بیماران MEN-2B یا FMTC جهش‌های ژرم لاین شناخته شده را در اگزون‌های ۱۰ و ۱۱ پروتوانکوژن رت نشان ندادند.

بر اساس نتایج مطالعه‌ها منتشر شده، ۹۷٪ بیماران MEN-2A در یکی از چهار سیستمین اگزون ۱۰ (سیستمین‌های ۶۰۹، ۶۱۱، ۶۱۸ و ۶۲۰) یا سیستمین ۶۳۴ اگزون ۱۱ که همگی مربوط به بخش غنی از سیستمین پروتئین رت در خارج سلول هستند، جهش‌هایی را نشان می‌دهند.<sup>۱۲،۱۳</sup> تنها بیمار مبتلا به MEN-2A در این مطالعه واجد جهش شایع C634W در اگزون ۱۱ بود و همین جهش در پسر و سه دختر مبتلای وی نیز مشاهده شد. همچنین نوه‌ی ۱۲ ساله‌ی غیر مبتلای وی حامل جهش مزبور بود. حاملان این جهش در معرض خطر جدی ابتلا به MTC هستند،<sup>۲۹</sup> بنا بر این تیروئیدکتومی پیشگیرانه در مورد نوه‌ی ۱۲ ساله‌ی بیمار MEN-2A قویاً توصیه گردید.

سندرم MEN-2B بیشتر با جهش‌های پروتوانکوژن رت در جایگاه تیروزین کینازی داخل سلولی همراه است. گزارش شده است که ۹۵٪ بیماران MEN-2B در کدون ۹۱۸ اگزون ۱۶ جهشی را نشان می‌دهند.<sup>۲۰</sup> همان گونه که انتظار می‌رفت مطالعه‌ی حاضر از آن جا که محدود به اگزون‌های ۱۰ و ۱۱ بود، نتوانست جهشی را در بیمار MEN-2B نشان دهد. اگر اگزون ۱۶ بیمار نیز مورد بررسی قرار می‌گرفت، احتمال پیدا کردن جهش حدود ۹۵٪ بود.

اسپورادیک حقیقی، ارزیابی دقیق‌تر احتمال خطر برای بستگان درجه اول و طراحی برنامه‌های پیشگیرانه به پزشک معالج کمک نماید.

بدیهی است که عدم مشاهده‌ی جهش‌های ۱۰ و ۱۱ در بیماران MEN-2B و FMTC و همچنین ۵۰ بیمار MTC اسپورادیک ظاهری نمی‌تواند احتمال وجود جهش در سایر اگزون‌ها را نفی نماید. بنا بر این در مرحله‌ی بعدی مطالعه‌ی حاضر، جهش‌های احتمالی در اگزون‌های ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶ مورد بررسی قرار خواهند گرفت. به منظور یافتن جهش‌های شناخته نشده‌ی پروتوآنکوژن رت نیز از روش مستقیم تعیین توالی ژن استفاده خواهد شد.

در نهایت به نظر می‌رسد که شیوع جهش‌های اگزون‌های ۱۰ و ۱۱ ژن رت در میان بیماران ایرانی مبتلا به MTC اسپورادیک ظاهری بالاست و می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که در مورد این بیماران، انجام بررسی ژنتیکی از نظر جهش‌های ژن رت بسیار ضروری است. شکل‌های ارثی بیماری به ویژه نیازمند بررسی وسیع‌تر اگزون‌های ژن رت هستند.

### سپاسگزاری

از همکاری بزرگوارانه‌ی تعداد زیادی از متخصصان غدد در تشخیص و معرفی بیماران نهایت امتنان را داریم. همچنین از زحمات بی‌دریغ و کمک‌های فنی پرسنل زحمتکش آزمایشگاه ژنتیک مولکولی مرکز تحقیقات غدد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، سپاسگزاریم.

در حال حاضر اعتقاد بر آن است که بیشتر بیماران مبتلا به FMTC (۸۶٪ آنها) واجد جهش در یکی از چهار سیستئین اگزون ۱۰ (سیستئین‌های ۶۰۹، ۶۱۱، ۶۱۸ و ۶۲۰) یا سیستئین ۶۳۴ اگزون ۱۱ هستند.<sup>۱۲،۱۳</sup> جهش رت در بیماران FMTC همچنین ممکن است در اگزون‌های ۱۳، ۱۴، ۱۵ روی داده باشد. در واقع نتایج یک مطالعه‌ی نسبتاً جدیدتر نشان می‌دهد که حدود ۶۰٪ خانواده‌های مبتلا به FMTC واجد جهش‌های غیر سیستئینی هستند.<sup>۲۱</sup> هیچ یک از دو بیمار FMTC بررسی شده در این مطالعه واجد جهش در اگزون‌های ۱۰ و ۱۱ نبودند. به نظر می‌آید در صورت بررسی اگزون‌های دیگر امکان پیدا کردن جهش در این دو بیمار به نحو قابل ملاحظه‌ای وجود داشته باشد.

سه تن از ۵۳ بیمار اسپورادیک ظاهری بررسی شده در این مطالعه یعنی ۵/۷٪ آنها دارای جهش در اگزون‌های ۱۰ یا ۱۱ بودند. شیوع مشاهده شده در محدوده‌ی ۲/۵-۷٪ قرار می‌گیرد که پیش‌تر برای شیوع همه‌ی انواع جهش ژرم لاین در بیماران MTC اسپورادیک ظاهری گزارش شده است.<sup>۱۶،۱۷</sup> بیماران MTC اسپورادیک ظاهری همچنین ممکن است دارای جهش‌های با قدرت نفوذ پایین در اگزون‌های ۱۳-۱۵ باشند.<sup>۲۰</sup> در صورتی که اگزون‌های ۱۳-۱۵ در این مطالعه مورد بررسی قرار می‌گرفتند، میزان شیوع جهش احتمالاً بزرگتر از ۵/۷٪ بود. به نظر می‌رسد شیوع جهش رت در بیماران ایرانی MTC اسپورادیک ظاهری بالا باشد و در نتیجه درصد بزرگی از آنها در واقع مبتلا به شکل‌های ارثی بیماری باشند. بنا بر این بررسی ژنتیکی بیماران ایرانی مبتلا به MTC اسپورادیک ظاهری قویاً توصیه می‌شود. نتایج این بررسی‌ها می‌تواند در تفکیک موارد ارثی از موارد

### References

1. Marsh DJ, Learoyd DL, Robinson BG. Medullary thyroid carcinoma: recent advances and management updates. *Thyroid* 1995;5:407-24.
2. Thakker RV. Multiple endocrine neoplasia-syndromes of the twentieth century. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2617-20.
3. Hoff AO, Cote GL, Gagel RF. Multiple endocrine neoplasias. *Annu Rev Physiol* 2000;62:377-411.
4. Donis-Keller H, Dou S, Chi D, Carlson KM, Toshima K, Lairmore TC, et al. Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN2A and FMTC. *Hum Mol Genet* 1993;2:851-6.
5. Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, et al. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 1993;363:458-60.
6. Hofstra RM, Landsvater RM, Ceccherini I, Stulp RP, Stelwagen T, Luo Y, et al. A mutation in RET proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. *Nature* 1994;367:375-6.
7. Quadro L, Panariello L, Salvatore D, Carlomagno F, Del Prete M, Nunziata V, et al. Frequent RET proto-oncogene mutations in multiple endocrine neoplasia type 2A. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:590-4.
8. Mulligan LM, Marsh DJ, Robinson BG, Schuffenecker I, Zedenius J, Lips CJ, et al. Genotype-phenotype correlation in MEN 2: report of the International Ret Mutation Consortium. *J Intern Med* 1995;238:343-6.
9. Avantaggiato V, Dathan NA, Grieco M, Fabien N, Lazzaro D, Fusco A, et al. Developmental expression of

- the RET proto-oncogene. *Cell Growth Diff* 1994;5:305-11.
10. Santoro M, Melillo RM, Carlomagno F, Vecchio G, Fusco A. RET: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 2004;145:5448-51.
  11. Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, Lenoir G, Cote G, Gagel RF, et al. The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2: International RET Mutation Consortium. *JAMA* 1996;276:1575-9.
  12. Mulligan LM, Eng C, Healey CS, Clayton D, Kwok JB, Gardner E, et al. Specific mutations of the RET proto-oncogene are related to disease phenotype in MEN2A and FMTC. *Nature Genet* 1994;6:70-4.
  13. Klein I, Esik O, Homolya V, Szeri F, Varadi A. Molecular genetic diagnostic program of multiple endocrine neoplasia type 2A and familial medullary thyroid carcinoma syndromes in Hungary. *J Endocrinol* 2001;170:661-6.
  14. Chappius-Flament S, Pasini A, De Vita G, Segouffin-Cariou C, Fusco A, Attie T, et al. Dual effect on the RET receptor of MEN2 mutations affecting specific extracytoplasmic cysteines. *Oncogene* 1998;17:2851-61.
  15. Santoro M, Carlomagno F, Romano A, Bottaro DP, Dathan NA, Grieco M, et al. Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B. *Science* 1995;267:381-3.
  16. Eng C, Mulligan LM, Smith DP, Healey CS, Frilling A, Raue F, et al. Low frequency of germline mutations in the RET proto-oncogene in patients with apparently sporadic medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995;43:123-7.
  17. Wohllk N, Cote GJ, Bugalho MM, Ordonez N, Evans DB, Goepfert H, et al. Relevance of RET proto-oncogene mutations in sporadic medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:3740-5.
  18. Lallier M, St-Vil D, Giroux M, Huot C, Gaboury L, Oligny L, et al. Prophylactic thyroidectomy for medullary thyroid carcinoma in gene carriers of MEN2 syndrome. *J Pediatr Surgery* 1998;33:846-8.
  19. Lips CJ, Hoppener JW, Thijssen JH. Medullary thyroid carcinoma: role of genetic testing and calcitonin measurement. *Ann Clin Biochem* 2001;38(Pt 3):168-79.
  20. Puxeddu E, Fagin JA. Genetic markers in thyroid neoplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001;30:493-513.
  21. Wu SL, Chang TC, Huang CN, Chuang LM, Chang TJ. Germline RET proto-oncogene mutations in two Taiwanese families with multiple endocrine neoplasia type 2A. *J Formos Med Assoc* 1998;97:614-18.
  22. Lee MS, Hwang DY, Kim YH, Chung JH, Oh YS, Lee MK, et al. Mutations of ret proto-oncogene in 3 Korean families with MEN 2A: clinical use of new restriction sites for genetic diagnosis. *Endocr J* 1998;45:555-61.
  23. Zirie M, Mohammed I, El-Emadi M, Haider A. Multiple endocrine neoplasia type II A: report of a family with a study of three generations in Qatar. *Endocr Pract* 2001;7:19-27.
  ۲۴. عزیزی فریدون، نبی‌پور ایرج، قاسمی ف، کیایی ش، برادر جلیلی رضا. شناسایی حاملین ژن سرطان مدولری تیروئید موروثی در ایران با استفاده از موتاسیون‌های پروتوانکوژن RET. *طب جنوب*. اسفند ۱۳۸۰، سال چهارم، شماره ۲، صفحات ۷۹ تا ۸۷.
  25. Nabipour I, Haji-Ghasemi F, Kiai S, Baradar Jalili R, Azizi F. The mutations of RET proto-oncogene in medullary thyroid carcinomas in Iran. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran* 2004;18:95-9.
  26. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 1988;16:1215.
  27. Wells SA Jr, Chi DD, Toshima K, Dehner LP, Coffin CM, Downton SB, et al. Predictive DNA testing and prophylactic thyroidectomy in patients at risk for multiple endocrine neoplasia type 2A. *Ann Surg* 1994;220:237-47.
  28. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning, a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2nd edition.
  29. Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordi C, et al. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5658-71.
  30. Learoyd DL, Marsh DJ, Richardson AL, Twigg SM, Delbridge L, Robinson BG. Genetic testing for familial cancer. Consequences of RET proto-oncogene mutation analysis in multiple endocrine neoplasia, type 2. *Arch Surg* 1997; 132:1022-5.
  31. Niccoli-Sire P, Murat A, Rohmer V, Franc S, Chabrier G, Baldet L, et al. Familial medullary thyroid carcinoma with noncysteine RET mutations: phenotype-genotype relationship in a large series of patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3746-53.

**Original Article****Germline RET mutations in exons 10 and 11: An Iranian survey of 57 medullary thyroid carcinoma cases**

Hedayati M, Nabipour E, Rezaei-Ghaleh N, Azizi F.

Endocrine Research Center, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran.

**Introduction:** Medullary Thyroid Carcinoma (MTC) occurs in either sporadic or hereditary forms. The susceptibility gene for hereditary MTC is the RET proto-oncogene. The aim of this study was to evaluate the prevalence of common germline RET mutations in exons 10 and 11 among Iranian MTC patients. **Materials and Methods:** 57 non-related MTC patients were examined in this survey (F: M=1.2:1.0, 40.0 +/- 11.5 years). Genomic DNA was extracted from their peripheral blood samples and exons 10 and 11 of the RET proto-oncogene were amplified using polymerase chain reaction (PCR). The PCR products were then digested by specific restriction enzymes and the Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) patterns were analyzed for common RET mutations in exons 10 and 11. **Results:** Only the MEN2A patient displayed a C634W mutation in exon 11. Three of the six first-degree relatives of the MEN2A evaluated patient had the same mutation. Among apparently sporadic MTC patients (53 cases), one patient showed a C620R mutation in exon 10 and two other patients displayed C634Y mutations in exon 11 of the RET proto-oncogene. Neither were the only MEN2B patient nor the two FMTC patients found to carry germline mutations in exons 10 and 11 of the RET proto-oncogene. It seems that the prevalence of germline RET mutations in exons 10 or 11 is prominent (5.7%) among Iranian, apparently sporadic, MTC patients. **Conclusion:** We conclude that a routine germline mutation analysis of the RET proto-oncogene should be advised for apparently sporadic MTC patients. Hereditary forms of MTC require a more extended investigation for RET mutations.

**Key words:** Medullary thyroid carcinoma, RET proto-oncogene, multiple endocrine neoplasia, mutation analysis