BRIEF REPORT

Frequency of c.1905+1G>A Mutation in DPD Gene among Patients with Colorectal Cancer in Mazandaran Province

Hossein Jalali[1],
Ramin Shekarriz[2],
Mohammad Reza Mahdavi[3]

[1] PhD Candidate in Thalassemia, Student Research committee, Thalassemia Research Center, Hemoglobinophaty Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Medical Oncology and Hematology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Laboratory Medicine, Thalassemia Research Center, Hemoglobinophaty Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received October 13, 2017 ; Accepted May 28, 2019)

Abstract

Background and purpose: 5-Flourouracil (5-FU) is one of the most common chemical drugs used in chemotherapy of patients with cancers. Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) is a critical enzyme in the catabolism of 5-FU. More than 80% of the administered 5-FU is catabolized by DPD. c.1905+1G>A mutation on DPD gene is the most important mutation associated with DPD enzymatic deficiency which leads to toxicity. The aim of this study was to investigate the frequency of c.1905+1G>A mutation on DPD gene among patients with colorectal cancer in Mazandaran province, north of Iran, 2016.

Materials and methods: In this descriptive study, 60 patients with colorectal cancer were selected and the genomic DNA was extracted from 200 µl of peripheral blood using commercial DNA extraction kit (Yekta Tajhiz Iran). For identification of c.1905+1G>A mutation on DPYD gene PCR-RFLP method was used applying Mae II restriction enzyme.

Results: The patients were 26 females and 34 males. The c.1905+1G>A mutation was detected only in one male subject (1.6%) in the heterozygous state.

Conclusion: The present study showed low frequency of c.1905+1G>A mutation in Mazandaran province. However, genetic test is recommended for identification of this mutation in oredr to predict the toxicity of the 5-FU in patients with colorectal cancer.

Keywords: 5-Flourouracil, dihydropyrimidine dehydrogenase, c.1905+1G>A mutation

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 29 (173): 128-133 (Persian).

* **Corresponding Author: Mohammad Reza Mahdavi -** Thalassemia Research Center, Hemoglobinophaty Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: Mahdavi899@gmail.com)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و نهم شماره 173 خرداد سال 1398 (133-128)

بررسی فراوانی جهش c.1905+1G>A در ژن DPD در بیماران مبتلا به سرطان کولون در استان مازندران

حسین جلالی[1]
رامین شکرریز[2]
محمدرضا مهدوی[3]

چکیده

سابقه و هدف: یکی از رایج‌ترین داروهایی که در شیمی درمانی بیماران مبتلا به سرطان، مورد استفاده قرار می‌گیرد 5- فلورویوراسیل (5-FU) نام دارد. آنزیم دی هیدرو پیریمیدین دهیدروژناز (DPD) مسئول متابولیسم بیش از 80 درصد از داروی 5-FU می‌باشد. جهش c.1905+1G>A در ژن DPD مهم‌ترین عامل ژنتیکی در بروز مسمومیت با داروی 5-FU می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی جهش c.1905+1G>A در بیماران کولورکتال استان مازندران بوده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی، 60 بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال انتخاب شدند و 2 سی‌سی از خون آنان در لوله های حاوی ضد انعقاد EDTA جمع‌آوری شد. به منظور استخراج DNA ژنومی از کیت شرکت یکتا تجهیز (ایران) استفاده شد که در آن DNA ژنومی از 200 میکرولیتر از نمونه خون استخراج شد. جهت شناسایی جهش c.1905+1G>A از روش PCR-RFLP به کمک آنزیم Mae II استفاده شد.

یافته‌ها: از 60 بیمار بررسی شده 26 نفر زن و 34 نفر مرد بوده اند. از بین بیماران بررسی شده جهش c.1905+1G>A تنها در1 بیماریا 1/6 درصد از بیماران به صورت هتروزیگوت مشاهده شد.

استنتاج: مطالعه حاضر نشان می‌دهد که اگرچه در استان مازندران در درصد کمی از بیمارانی که داروی 5-فلورویوراسیل مصرف می‌کنند جهش c.1905+1G>A وجود دارد که منجر به بروز مسمومیت پس از مصرف دارو می شودبا این وجود بررسی ژنتیکی جهش c.1905+1G>A به منظور پیش آگهی از بروز مسمومیت با داروی 5-FU قبل از تجویز این دارو توصیه می شود.

واژه های کلیدی: 5- فلورویوراسیل، دی هیدرو پیریمیدن دهیدروژناز، جهش c.1905+1G>A

مقدمه

5- فلورویوراسیل یکی از معمول‌ترین داروهایی است که در درمان سرطان‌ها به‌کار می‌رود. این دارو یکی از آنالوگ‌های پیریمیدین می‌باشد که از طریق مسیرهای پیریمیدن متابولیزه می‌شود.

آنزیم دی هیدرو پیریمیدین دهیدروژناز Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) یک آنزیم تعیین‌کننده در مسیر متابولیسم داروی 5-FU می‌باشد. مطالعات مختلف نشان داده اند که این آنزیم مسئول متابولیسم بیش از 80 درصد از داروی 5-FU می‌باشد. از این رو میزان فعالیت این آنزیم می‌تواند یک

مولف مسئول: محمدرضا مهدوی - ساری: بلوار کشاورز، ساختمان دکتر دادخواه، آزمایشگاه پاتوبیولوژی و ژنتیک پزشکی فجر ساری E-mail: Mahdavi899@gmail.com
1. دانشجوی دکتری تالاسمی، کمیته تحقیقات دانشجویی مرکز تحقیقات تالاسمی، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
2. استادیار، گروه خون و اونکولوژی،دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
3. استادیار، گروه علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات تالاسمی، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : 1396/9/22 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :1396/9/27 تاریخ تصویب : 1398/2/8

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

پارامتر نشان‌دهنده و پیش‌بینی‌کننده کارایی و یا مسمومیت دارو باشد. نقص در عملکرد این آنزیم با یک تاخیر قابل ملاحظه در پاک‌سازی دارو از سرم همراه است(2،1). فعالیت آنزیم DPD در جمعیت های مختلف متفاوت است. علی‌رغم استفاده از دوزهای مختلف دارو مشاهده شده است که در جمعیت‌های مختلف حدود 3 درصد از جمعیتی که داروی 5-FU مصرف می‌کنند علایم مسمومیت شدید را بروز می‌دهند(3). علائم معمول مسمومیت با داروی 5-FU عبارتند از اسهال، موکوسیتیس (mucositis)، استوماتیسیس (stomatitis) و لوکوپنی. گفته می‌شود علت 50 درصد از مسمومیت‌های پس از مصرف 5-FU ناشی از نقص درعملکرد آنزیم DPD می‌باشد(5،4). ژن DPD بر روی کروموزوم شماره 1 و جایگاه 1p21.3 قرار گرفته است و این ژن دارای 23 اگزون می‌باشد(8-6). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که جهش c.1905+1G>A بر روی ژن DPD با مسمومیت شدید با داروی 5-FU همراه است. این جهش منجر به حذف اگزون 14 از ژن DPD می‌شود زیرا در اثر وقوع این جهش، ناحیه ویرایش در اینترون و در Pre-mRNA دچار تغییر می‌شود(11-9). در نتیجه این تغییرات در mRNA تولید شده، 165 نوکلئوتید حذف می‌شود که به تبع آن اسیدهای آمینه شماره 581 الی 635 در زنجیره پروتئینی تولید شده حذف می شوند(11). از آن‌جایی که شیوع سرطان در استان مازندران بالا می‌باشد و از داروی 5-FU برای درمان سرطان زیاد استفاده می‌شود هدف از این مطالعه بررسی فراوانی جهش c.1905+1G>A در بیماران مبتلا به سرطان کولون در استان مازندران می‌باشد. در صورتی که این جهش در بیماران مشاهده شود می‌توان انجام تست تشخیصی برای جهش ذکر شده جهت پیش آگهی از وقوع مسمومیت دارویی را در بیماران پیشنهاد داد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی که در سال 1395 صورت پذیرفت 60 نفر از بیماران مبتلا به سرطان کولون که داروی 5-FU را مصرف می‌کردند انتخاب شدند. تمامی این افراد ساکن مازندران بوده‌اند و جهت درمان به کلینیک طوبی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی مازندران در شهرستان ساری مراجعه نموده بودند. پس از کسب رضایت از افراد از طریق پر کردن فرم رضایتنامه، میزان 2 سی‌سی از خون بیماران در لوله های حاوی ضد انعقاد EDTA نمونه‌برداری شد و تا زمان استخراج در فریزر منهای 20 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور استخراج DNA ژنومی از کیت شرکت یکتا تجهیز (ایران) استفاده شد که در آن DNA ژنومی از 200 میکرولیتر از نمونه خون استخراج گردید. جهت انجام تست PCR از پرایمرهای 5- TGCAAATATGTGAGGAGGGACC -3 و 5- CAGCAAAGCAACTGGCAGATT-3 استفاده شد. این پرایمرها قطعه‌ای به طول 411 نوکلئوتید را بر روی ژن DPD تکثیر می‌کنند(12). جهت انجام تست PCR از مستر میکس ساخت شرکت Takara (Cat number: RR310B محصول کشور ژاپن) استفاده شد. هم‌چنین از برنامه زیر جهت تکثیر DNA استفاده شد (جدول شماره 1). برنامه PCR در دستگاه ترموسایکلر Peq Lab (ساخت کشور آلمان) مورد استفاده قرار گرفت.

جدول شماره 1: برنامه PCR جهت تکثیر ژن DPYD

مرحله	دما (درجه سانتیگراد)	زمان
آغاز	95	5 min
سیکل PCR (35 سیکل)	95	20 sec
	62	30 sec
	72	30 sec
تکثیر نهایی	72	5 min

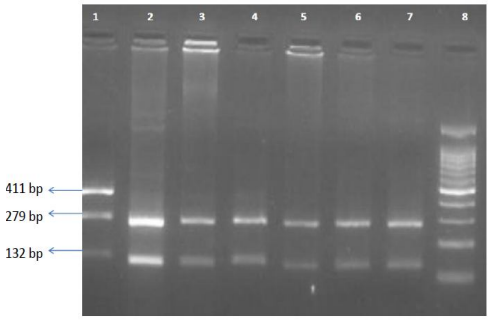
پس از اطمینان از صحت عملکرد PCR بر روی ژل آگارز 1 درصد از روش هضم آنزیمی(RFLP) برای شناسایی جهش c.1905+1G>A استفاده شد. به این صورت که محصولات PCR به مدت 16 ساعت در مجاورت آنزیم Mae II (محصول شرکت

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

Thermo scientific) و دردمای 55 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. محصولات حاصل از هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز 2 درصد لود شدند و پس از الکتروفورز در زیر نور UV رویت و آنالیز شدند. درنهایت فراوانی آللی جهش ذکر شده با استفاده از نرم افزار SPSS در این بیماران محاسبه شد.

یافته ها و بحث

میانگین سنی بیماران 11 ±50 بوده است که از این تعداد 26 نفر زن و 34 نفر مرد بوده اند. از بین بیماران بررسی شده جهش c.1905+1G>A، تنها در یک بیمار به صورت هتروزیگوت مشاهده شد. نتایج الکتروفورز پس از انجام تست RFLP در تصویر شماره 1 نشان داده شده است. همان‌طور که در تصویر مشخص است در آلل‌های نرمال، قطعه 411 جفت بازی به دو قطعه شکسته می‌شود و در آلل موتانت، این قطعه بدون تغییر باقی می‌ماند.



تصویرشماره 1: نتایج حاصل از PCR-RFLP جهت تشخیص جهش c.1905+1G>A در ژن DPD . 1- نمونه هتروزیگوت دارای جهش، 2 الی 7 – نمونه‌های نرمال، 8- لدر 100 جفت بازی.

در 1/7 درصد از بیماران مبتلا به سرطان کولون این جهش دیده شده است. فراوانی آللی این جهش در بیماران سرطانی 0/83 درصد می باشد.

در میان تمامی جهش‌های موجود در ژن DPD، جهش c.1905+1G>A که با نام‌های IVS14+1G>A و DPD*2A نیز شناخته شده است بیش تر از سایر جهش‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است. مطالعات اولیه نشان می‌داد که در نزدیک 29 درصد از افراد مبتلا به سرطان که مسمومیت درجه 3 را پس از مصرف داروی 5-FU نشان داده‌اند این جهش وجود داشته است(13). این نتیجه نشان داد که نقص در عملکرد آنزیم DPD یک سندرم فارماکوژنتیک است که حضور یک موتاسیون در یک تک ژن می‌تواند پیش‌بینی کننده مسمومیت با داروی 5-FU باشد.

مطالعات مختلفی در مورد بررسی فراوانی جهش c.1905+1G>A در ژن DPD در جمعیت های مختلف صورت پذیرفته است. نتایج مطالعات مختلف نشان می‌دهد که فراوانی این جهش در کشورهای اروپایی تقریبا یکسان است. به طوری که فراوانی این جهش در جمعیت کشورهای ترکیه، فرانسه، هلند و آلمان به ترتیب برابر با 0/75 درصد(14)، 0/98 درصد(15)، 0/91 درصد(16) و 0/94 درصد(17) گزارش شده است. در حالی این جهش در 121 بیمار کره ای(18)، 300 بیمار تایوانی(19)، 239 مصری(20) دیده نشده است که همگی به صورت هتروزیگوت بوده است. با مقایسه نتایج مطالعات ذکر شده با مطالعه حاضر فراوانی این جهش در بیماران مبتلا به سرطان کولون در استان مازندران برابر با 1/6 درصد بوده است که تقریباً برابر با فراوانی آن در کشورهای اروپایی می‌باشد. فراوانی این جهش به صورت هموزیگوت نادر است به طوری که فراوانی آن در هلند به میزان 1/2 در 10000 نفر می‌باشد(15) این جهش به صورت هموزیگوت در مطالعه حاضر نیز پیدا نشده است. هم‌چنین گزارش شده است که جهش c.1905+1G>A به صورت هموزیگوت منجر به نقص کامل در عملکرد آنزیم DPD می‌شود در حالی که ژنوتیپ هتروزیگوت آن درنقص آنزیمی به‌صورت جزئی بروز پیدا می‌کند. نقص جزئی آنزیمی نیز نقش مهمی را در مسمومیت به داروی 5-FU بازی می کند(20). بررسی ژنتیکی جهش c.1905+1G>A با تکنیک PCR-RFLP

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

ساده می‌باشد. بنابراین به منظور پیش آگهی از بروز مسمومیت با داروی 5-FU قبل از تجویز این دارو انجام تست تشخیصی توصیه می‌شود. اگرچه جهش c.1905+1G>A مهم‌ترین جهش شناخته شده و گزارش شده در ارتباط با مسمومیت با داروی 5-FU می‌باشد اما فراوانی آن در استان مازندران و در بیماران چندان بالا نمی‌باشد. هم‌چنین در مواردی جهش‌های جدیدی نیز در بیمارانی که تحت درمان با 5-FU قرار می گیرند شناسایی می‌شود مانند جهش c.321+2T>C و c.2242+1G>T که در سال 2018 شناسایی شدند(23-21) بنابراین بررسی مولکولی بیش‌تر ژن DPD در منطقه به منظور شناسایی سایر جهش‌ها در مطالعات آتی توصیه می‌شود.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از کلیه کارکنان مرکز تحقیقات تالاسمی که در تهیه این مقاله یاری رساندند تقدیر و تشکر به عمل می‌آورند.

References

1. Meyerhardt JA, Mayer RJ. Systemic therapy for colorectal cancer. N Engl J Med 2005; 352(5): 476-487.
2. Diasio RB, Harris BE. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. Clin Pharmacokinet 1989; 16(4): 215–237.
3. Mattison LK, Soong R, Diasio RB. Implications of dihydropyrimidine dehydrogenase on 5-fluorouracil pharmacogenetics and pharmacogenomics. Pharmacogenomics 2002; 3(4): 485–492.
4. Bano N, Najam R, Qazi F, Mateen A. Gastrointestinal adverse effects in advanced colorectal carcinoma patients treated with different schedules of FOLFOX. Asian Pac J Cancer Prev 2014; 15(19): 8089–8093.
5. Ezzeldin Hany, Diasio Robert. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency, a pharmacogenetic syndrome associated with potentially life-threatening toxicity following 5-fluorouracil administration. Clin Colorectal Cancer 2004; 4(3):181–189.
6. Wei X, Elizondo G, Sapone A, McLeod HL, Raunio H, Fernandez-Salguero P, et al. Characterization of thehuman dihydropyrimidine dehydrogenase gene. Genomics 1998; 51(3): 391-400.
7. van Kuilenburg AB, Vreken P, Abeling NG, Bakker HD, Meinsma R, Van Lenthe H, et al. Genotype and phenotype in patientswith dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. Hum Genet 1999; 104(1): 1-9.
8. McLeod HL, Collie-Duguid ES, Vreken P, Johnson MR, Wei X, Sapone A, et al. Nomenclature for human DPYD alleles. Pharmacogenetics 1998; 8(6): 455-459.
9. Goetz MP, Ames MM, Weinshilboum RM. Primer on medicalgenomics. Part XII: Pharmacogenomics-general principles with cancer as a model. Mayo Clin Proc 2004; 79(3): 376-384.
10. Ridge SA, Sludden J, Brown O, Robertson L, Wei X, Sapone A, et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase pharmacogenetics in Caucasian subjects. Br J Clin Pharmacol 46(2): 1998; 151-156.
11. Meinsma R, Fernandez-Salguero P, van Kuilenburg AB, van Gennip AH, Gonzalez FJ. Human polymorphism in drugmetabolism: mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene results in exon skipping and thymine uracilurea. DNA Cell Biol 1995; 14(1): 1-6.
12. Kumar CK, Murthy S, Jamil K. Possible

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

Associations of Splice Site Mutation of Dihydropyrimidine Dehydrogenase (IVS14+1G>A) in Adverse Drug Reactions in Some Invasive Ductal Carcinoma Patients. Int J Pharmacol. 2007; 3 (2): 130-136.

13. Van Kuilenburg AB, Meinsma R, Zoetekouw L, Gennip AH. High prevalence of the IVS14 + 1G>A mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene of patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity. Pharmacogenetics 2002; 12(7): 555–558.
14. Celik I, Kars A, Guc D, Tekuzman G, Ruacan S. Dihydropyrimidine dehydrogenase enzyme deficiency: clinical and genetic assessment of prevalence in Turkish cancer patients. Cancer Invest 2002; 20(3): 333-339.
15. Magne N, Etienne-Grimaldi MC, Cals L, Renee N, Formento JL, Francoual M, et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and the IVS14+1G>A mutation in patients developing 5FU-related toxicity. Br J Clin Pharmacol 2007; 64(2): 237-240.
16. van Kuilenburg AB, Muller EW, Haasjes J, Meinsma R, Zoetekouw L, Waterham HR, et al. Lethal outcome of a patient with a complete dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency after administration of 5-fluorouracil: frequency of the common IVS14+1G>A mutation causing DPD deficiency. Clin Cancer Res 2001; 7(5): 1149-1153.
17. Raida M, Schwabe W, Hausler P, van Kuilenburg AB, van Gennip AH, Behnke D, et al. Prevalence of a common point mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) gene within the 5'-splice donor site of intron 14 in patients with severe 5-fluorouracil (5-FU)-related toxicity compared with controls. Clin Cancer Res 2001; 7(9): 2832-2839.
18. Cho HJ, Park YS, Kang WK, Kim JW, Lee SY. Thymidylate synthase (TYMS) and dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) polymorphisms in the Korean population for prediction of 5-fluorouracil-associated toxicity. Ther Drug Monit 2007; 29(2): 190-196.
19. Hsiao HH, Yang MY, Chang JG, Liu YC, Liu TC, Chang CS, et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase pharmacogenetics in the Taiwanese population. Cancer Chemother Pharmacol 2004; 53(5): 445-451.
20. Hamdy SI, Hiratsuka M, Narahara K, El-Enany M, Moursi N, Ahmed MS, et al. Allele and genotype frequencies of polymorphic cytochromes P450 (CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1) and dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) in the Egyptian population. Br J Clin Pharmacol 2002; 53(6): 596-603.
21. Van Kuilenburg AB, Haasjes J, Richel DJ, Zoetekouw L, Van Lenthe H, De Abreu RA, et al. Clinical implications of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity: identification of new mutations in the DPD gene. Clin Cancer Res 2000; 6(12): 4705-4712.
22. García-González X, López-Tarruella S, García MI, González-Haba E, Blanco C, Salvador-Martin S, et al. Severe toxicity to capecitabine due to a new variant at a donor splicing site in the dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) gene. Cancer Manag Res 2018; 10: 4517-4522.
23. Tong CC, Lam CW, Lam KO, Lee VHF, Luk MY. A Novel DPYD Variant Associated With Severe Toxicity of Fluoropyrimidines: Role of Pre-emptive DPYD Genotype Screening. Front Oncol 2018; 8: 279.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]