

## بررسی بیان ژن سورویوین به عنوان یک نشانگر تومور اختصاصی در پیش آگهی تومورهای مثانه

نازیلا نورائی<sup>۱</sup>، اردلان اوژند<sup>۲</sup>، محمود پروین<sup>۳</sup>، امیر محسن ضیایی<sup>۴</sup>، نسیم هانفی<sup>۱</sup>، سید جواد مولی<sup>۵\*</sup>

- ۱- کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- پزشک، مرکز تحقیقات کلیه و مجاری ادراری، بیمارستان شهید لبافی نژاد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۳- استادیار، مرکز تحقیقات کلیه و مجاری ادراری، بیمارستان شهید لبافی نژاد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۴- دانشیار، مرکز تحقیقات کلیه و مجاری ادراری، بیمارستان شهید لبافی نژاد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۵- دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۶/۱۲/۱۳

دریافت مقاله: ۸۶/۱۱/۱۰

### چکیده

**هدف:** مهار مرگ برنامه ریزی شده سلول‌ها، یکی از عوامل آغاز و پیشرفت تومور است و مهارکنندگان مرگ برنامه ریزی شده سلول، در بروز سرطان نقش ویژه‌ای ایفا می‌کنند. سورویوین یکی از مهارکنندگان مرگ برنامه ریزی شده سلول است که اخیراً به عنوان یک نشانگر تومور احتمالی برای تشخیص و پیش آگهی تومورهای مثانه مورد توجه قرار گرفته است. پروتئین سورویوین عملکرد دوگانه‌ای هم در تنظیم تقسیم سلولی و هم در کنترل مرگ سلولی دارد و در اغلب سرطان‌های انسانی افزایش بیان دارد. در این تحقیق شایستگی بیان سورویوین، به عنوان نشانگرهای ملکولی ذاتی در پیش آگهی مبتلایان به سرطان مثانه، به خصوص بیماران دارای عود مجدد تومور مورد بررسی قرار گرفته است.

**مواد و روش‌ها:** بلوک‌های پارافینه از آرشیو بیمارستان لبافی نژاد به دست آمدند و پس از بررسی پرونده پنج ساله بیماران، با تکنیک RT-PCR مورد بررسی قرار گرفتند. در مجموع تعداد ۵۱ نمونه پارافینه متعلق به ۳۰ بیمار مبتلا به سرطان مثانه، از نظر بیان این ژن ارزیابی شدند. همچنین توزیع بافتی و جایگاه درون سلولی پروتئین حاصل از این ژن با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی مورد بررسی قرار گرفت.

**نتایج:** بیان سورویوین در ۶۶/۶ درصد نمونه‌ها مشخص شد. طبق یافته‌های این تحقیق، بیان سورویوین با افزایش درجه و بدخیمی تومور، افزایش می‌یابد. میزان بیان سورویوین در عودهای دوم و سوم تومور، افزایش داشت. همچنین با افزایش بدخیمی و در نتیجه افزایش بیان سورویوین شانس زنده ماندن در طی ۵ سال پیگیری، به طور معناداری کاهش داشت ( $P=0/036$ ). نتایج ایمونوهیستوشیمی نیز مؤید این بودند که پروتئین سورویوین در سلول‌های توموری بیان شده و تجمع هسته‌ای دارد.

**نتیجه گیری:** در مجموع این تحقیق توانست بیان سورویوین را در نمونه‌های پارافینه شده از سرطان مثانه، در سطح mRNA و پروتئین، آشکار کرده و نشان دهد که افزایش بیان سورویوین با افزایش بدخیمی تومورهای مثانه همراه است که این یافته می‌تواند در پیش آگهی مبتلایان به این تومورها مؤثر باشد و سورویوین را به عنوان نشانگر پیش آگهی دهنده مناسب برای سرطان مثانه معرفی می‌کند.

**کلید واژگان:** سورویوین، مرگ برنامه ریزی شده سلول، سرطان مثانه، RT-PCR نیمه کمی، بلوک‌های پارافینه.

### ۱- مقدمه

اغلب محصول تغییرات اکسایبی در ساختار DNA است. این تغییرات به صورت القای انکوژن‌ها (Oncogenes)، از دست رفتن ژن‌های بازدارنده تومور (Tumor suppressor)، تخریب مکانیسم‌های طبیعی تعمیر DNA یا از بین رفتن همئوستازی (Homeostasis)

سرطان مثانه یکی از شایع‌ترین سرطان‌هاست و در مردان و زنان به ترتیب چهارمین و هشتمین سرطان رایج است [۱]. میانگین سنی ابتلا به این سرطان ۷۰ سال تخمین زده می‌شود و مثل بسیاری از ناهنجاری‌های دیگر که در اواخر عمر رخ می‌دهند، سرطان مثانه نیز،

\* نشانی مکاتبه: تهران، تقاطع بزرگراه جلال آل احمد و شهید چمران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک، صندوق پستی: ۱۷۵-۱۴۱۱۵

درمان همراه است [۱۱]. با توجه به قابلیت ویژه سورویوین به عنوان نشانگر تومور مناسب در سرطان‌ها، در این تحقیق بیان نسبی این ژن به عنوان نشانگر تومور پیش‌آگهی‌دهنده در سرطان مثانه با استفاده از روش RT-PCR (Reverse transcription-Polymerase chain reaction) روی بافت‌های تثبیت و پارافینه شده (Formalin-Fixed paraffinembedded)، بررسی شد.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- جمع‌آوری نمونه

نمونه‌های انسانی مورد نیاز این تحقیق از مرکز پزشکی شهید دکتر لبافی‌نژاد تهران جمع‌آوری شدند. برای طبقه‌بندی بیماران برای انتخاب درمان مناسب، پرونده ۵ ساله بیماران از سال‌های ۷۹ تا ۸۵ از نظر پیگیری بررسی شد و نمونه‌های مورد نظر تحت نظارت مستقیم پزشک متخصص و با توجه به سابقه ۵ ساله بیمار و وضعیت کنونی وی از نظر مراجعه به بیمارستان و امکان انجام معاینات بالینی و آزمون‌های آزمایشگاهی انتخاب شدند. از کلیه نمونه‌ها مقاطعی به روش هماتوکسیلین/ئروزین (Haematoxylin/Eosin) رنگ‌آمیزی شد و روی این اسلایدها درجه و مرحله تومور تأیید شد. مشخصات هر نمونه توموری، فاصله زمانی بین عودهای مجدد و خصوصیات کلینیکی پاتولوژیکی تعدادی از بیماران در جدول ۱ آورده شده است.

### ۲-۲- استخراج RNA

برای استخراج RNA کل از نمونه‌های توموری، پس از پارافین‌زدایی، نمونه‌ها با آنزیم پروتئیناز K (Fermentas)، با غلظت مؤثر ۱۰۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هضم و سپس از محلول RNX-Plus (Cinnagen) طبق برنامه شرکت تولیدکننده، استفاده شد.

### ۲-۳- واکنش RT-PCR

واکنش سنتز cDNA با استفاده از آنزیم نسخه‌برداری معکوس (Fermentas) MMuL و آغازگر (Primer) راندوم هگزامر طبق برنامه تعیین شده [۱۳]، انجام شد. از آنجا که طی مراحل تثبیت (Fixation)، پارافینه کردن و نگهداری این بلوک‌ها به RNA آسیب وارد می‌شود، قطعات شکسته حاصل از آن‌ها اندازه‌ای در حدود ۲۰۰-۲۱۰ bp دارند. در نتیجه در طراحی

چرخه سلولی هستند [۲]. رشد تومورهای سرطانی به دو عامل اصلی بستگی دارد: تقسیمات سلولی و مرگ سلول‌ها از طریق مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (Apoptosis). آپوپتوز مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌هاست که مشخصات مورفولوژیکی، بیولوژیکی و ژنتیکی خاص خود را دارد [۳، ۴]. مرگ برنامه‌ریزی شده سلول را می‌توان یکی از مکانیسم‌های دفاعی بدن در برابر سرطان دانست. بیان تنظیم نشده پروتئین‌های مهارکننده این مسیر مرگ سلولی، می‌تواند منجر به افزایش طول عمر سلول و در نتیجه، تجمع جهش‌های تغییر شکل دهنده و در نهایت، شروع و پیشرفت سرطان شود [۵]. همچنین افزایش بیان پروتئین‌های ضد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، منجر به رفتار تهاجمی تومور و مقاومت به درمان می‌شود [۶]. در تحقیقات متعدد، رابطه معنی‌داری بین مرگ برنامه‌ریزی شده سلول و پیش‌آگهی سرطان‌هایی همچون ریه، پستان و مری نشان داده شده است.

دو خانواده پروتئینی در تنظیم مکانیسم‌های مرگ برنامه‌ریزی شده سلول دخیل هستند: خانواده پروتئینی BCL-2 (B-Cell Lymphoma 2) و خانواده IAPها (Inhibitor of Apoptosis Protein) یا مهارکنندگان مرگ برنامه‌ریزی شده سلول [۷]. مهارکنندگان مرگ برنامه‌ریزی شده سلول گروهی از پروتئین‌های درون سلولی هستند که مشخصه اصلی آن‌ها، داشتن یک یا چند تکرار از دامین (Domain) موسوم به BIR (Baculoviral IAP Repeats) است که شامل یک واحد انگشت-روی (Zinc-finger) ۷۰ اسیدآمینوای است و در بروز خاصیت ضد مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌ها نقش دارد [۸].

سورویوین (Survivin) یک عضو جدید از این خانواده است که از لحاظ داشتن تنها یک دامین BIR و نیز فقدان دامین انگشت-روی در پایانه C، در میان مهارکنندگان مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، منحصر به فرد است. همچنین سورویوین نقش اساسی در تقسیم میتوز دارد و با اتصال به ریزلوله‌های (Microtubules) دوک تقسیم سلولی، سانتروزوم‌ها (Centrosomes) و کینه‌توکور (kinetochore) در تنظیم تقسیم سلولی دخالت دارد. بیان زود هنگام آن در اغلب تومورهای انسانی و بیان کم یا عدم بیان آن در بافت‌های طبیعی نشان می‌دهد که سورویوین می‌تواند یک نشانگر تشخیصی و پیش‌آگهی‌دهنده کارآمد و همچنین هدف مناسبی برای درمان سرطان باشد [۹-۱۲].

با نگاهی به پاتوفیزیولوژی سرطان مثانه، مشاهده شد که سورویوین که در سلول‌های بالغ تمایز یافته بیان ندارد، در سرطان مثانه بیان بالایی دارد و میزان بیان سورویوین با پیشرفت مرحله و درجه تومور و مقاومت آن به

جدول ۱ مشخصات کلینیکوپاتولوژی تعدادی از بیماران

شماره	سن/جنس	تاریخ مراجعه	درجه	مرحله	متاستاز	برداشت مثانه	وضعیت کنونی بیمار (۸۴-۸۵)	فوت
۱	♂/۵۷	۸۰/۵/۱۰	I	A	-	-	تومور	+ (۱۳۸۴)
۲	♂/۷۲	۷۹/۱۱/۸	II	A	-	-	نرمال	-
		۸۲/۳/۱۰	II	A	-			
۳	♂/۵۲	۷۹/۱۱/۶	II	A	-	+	فاقد پیگیری	+
		۷۹/۱۱/۱۵	II	B1	+			
۴	♂/۵۰	۱۳۸۲	I	A	-	-	تومور	-
		۸۳/۵/۶	I	A	-			
		۸۵/۳/۲	II	A	-			
۵	♂/۸۴	۱۳۸۳	II	A	-	-	تومور	-
		۱۳۸۴	II	A	-			
۶	♂/۴۹	۷۹/۲/۲۴	II	A	-	+	فاقد پیگیری	-
		۷۹/۴/۲۵	II	A				
		۸۰/۵/۱۸	II	A				
۷	♂/۵۶	۸۰/۱/۲۵	I	A	-	-	تومور	-
۸	♀/۵۲	۷۷/۳/۳۰	II	A	-	برداشت بخشی از مثانه	فاقد پیگیری	-
		۷۸/۷/۲۱	II	A	-			
۹	♂/۷۵	۷۹/۴/۲۹	II	A	-	+	-	+
		۸۰/۱۰/۱	III	A	-			
		۸۰/۱۱/۲۰	III	C	+			
۱۰	♂/۸۳	۷۹/۶/۱۵	II	A	-	-	-	+ (۱۳۸۱)

آغازگر پایین دست (Reverse) خارجی:

5'- GTTCCTCTATGGGGTCGTC -3'

آغازگر بالادست داخلی:

5'- ACCACCGCATCTCTACATTC -3'

آغازگر پایین دست داخلی:

5'- GAAGAAACACTGGGCCAAG -3'

این آغازگرها در دور اول، قطعه‌ای به طول ۲۰۲ bp، و در

دور دوم قطعه‌ای به طول ۱۳۱ bp را روی cDNA ژن

سوروابوین انسانی، تکثیر می‌کنند.

برای ژن β2m نیز آغازگرهای طراحی شده این توالی‌ها را

داشتند: آغازگر بالادست:

5'- CTACTCTCTCTTTCTGGCCTG -3'

آغازگر پایین دست:

5'- GACAAGTCTGAATGCTCCAC -3'

آغازگرهای مذکور، قطعه‌ای به طول ۱۹۱ bp را روی

cDNA ژن β2m انسانی، تکثیر می‌کنند.

واکنش PCR با استفاده از ۲ میکرولیتر از cDNA سنتز شده

آغازگر برای واکنش PCR باید طول قطعات را در نظر داشت. در

این تحقیق، ژن β2m (β2 microglobulin) (شماره دستیابی

NM-012512) به‌عنوان کنترل داخلی انتخاب و از آغازگرهایی که

توسط بابایی و همکاران (۲۰۰۵) طراحی شده بود، استفاده شد.

برای تکثیر ژن سوروابوین (شماره دستیابی NM-001168.2) نیز توسط

نرم‌افزار GeneRunner (Hastings Software, Inc, Hastings, NY, USA)،

دو جفت آغازگر به صورت داخلی (Nested)، طراحی و توسط

شرکت MWG Biotech (Ebersberg, آلمان) با خلوص

HPSF (High Purified Salt Free) و به‌صورت لیوفیلیزه

(Lyophilized)، ساخته شد. تمام آغازگرهای طراحی شده کاوش

(Blast) [۱۴] و با ژنوم انسان به‌منظور بررسی عدم تطابق با سایر

نواحی ژنوم، مقایسه شدند تا اتصال آن‌ها به‌طور اختصاصی

صورت گیرد.

توالی آغازگرهای مورد استفاده در این واکنش به این ترتیب بود:

آغازگر بالادست (Forward) خارجی:

5'- TGGCAGCCCTTTCTCAAG -3'

چرخه انجام شد و در دور دوم با آغازگرهای داخلی واکنش PCR، تعداد چرخه‌های مختلف، از ۱۰-۳۰ آزمایش شد و نیز به منظور تکثیر اختصاصی قطعه مورد نظر و مهار اتصالات غیراختصاصی آغازگرها به cDNA الگو، غلظت‌های مختلف  $MgCl_2$  در واکنش PCR به کار رفت و مناسب‌ترین غلظت  $MgCl_2$ ، ۲ میلی مولار در نظر گرفته شد. برای آغازگرهای  $\beta 2m$  نیز دمای اتصال، ۵۷ درجه سانتی‌گراد و تعداد چرخه ۳۵ مناسب دیده شد (نتایج نشان داده نشده است).

### ۲-۳- بیان متمایز سورویوین در بافت‌های

#### توموری مثانه

روی تمامی نمونه‌های پارانینه انتخاب شده و با شرایط ذکر شده در بالا، واکنش PCR انجام گرفت. مقدار RNA به کار رفته برای سنتز cDNA و شرایط انجام واکنش RT-PCR برای همه نمونه‌ها یکسان بود. به منظور تأیید نتایج، هر آزمایش سه بار تکرار شد. محصولات PCR هر نمونه به همراه محصول PCR مربوط به  $\beta 2m$  همان نمونه، روی ژل آگارز ۲ درصد از هم تفکیک و با محلول اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) آشکارسازی شدند. شدت بیان هر ژن با استفاده از نرم‌افزار Uvitech محاسبه و نسبت بیان سورویوین به  $\beta 2m$  اندازه‌گیری شد. بیان  $\beta 2m$  (کنترل داخلی) در تمام نمونه‌های توموری مشاهده شد در حالی که بیان سورویوین در برخی نمونه‌ها مشاهده نشد (شکل ۱). در این تحقیق در مجموع ۵۱ نمونه توموری مربوط به ۳۰ بیمار بررسی شد که از این میان تعداد ۳۴ نمونه بیان سورویوین را نشان دادند.

### ۳-۳- آنالیز آماری بیان نسبی ژن سورویوین در

#### نمونه‌های توموری

به منظور مقایسه آماری بیان نسبی ژن سورویوین در نمونه‌های توموری با مشخصات کلینیکیپاتولوژی متفاوت از نرم‌افزار SPSS استفاده شد. دستبندی تومورها بر اساس عوامل سن، جنسیت، فوت یا زنده بودن بیمار، درجه و مرحله تومور، نسبت میزان زنده ماندن طی ۵ سال پیگیری و تعداد دفعات عود صورت گرفت.

با ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمرز ۵ واحد بر میکرولیتر (Cinnagen) طبق برنامه تعیین شده، انجام شد [۱۴]. میزان بیان ژن سورویوین در هر فرد و در عودهای مجدد هر تومور، با استفاده از روش RT-PCR نیمه کمی تعیین شد.

### ۲-۴- تعیین توالی قطعات تکثیر شده

به منظور تأیید هویت قطعات حاصل از PCR، محصولات ۲۰۲ نوکلئوتیدی سورویوین در دور اول PCR توسط شرکت MWG تعیین توالی شدند و صحت توالی تکثیر شده، تأیید شد.

### ۲-۵- واکنش ایمونوهیستوشیمی

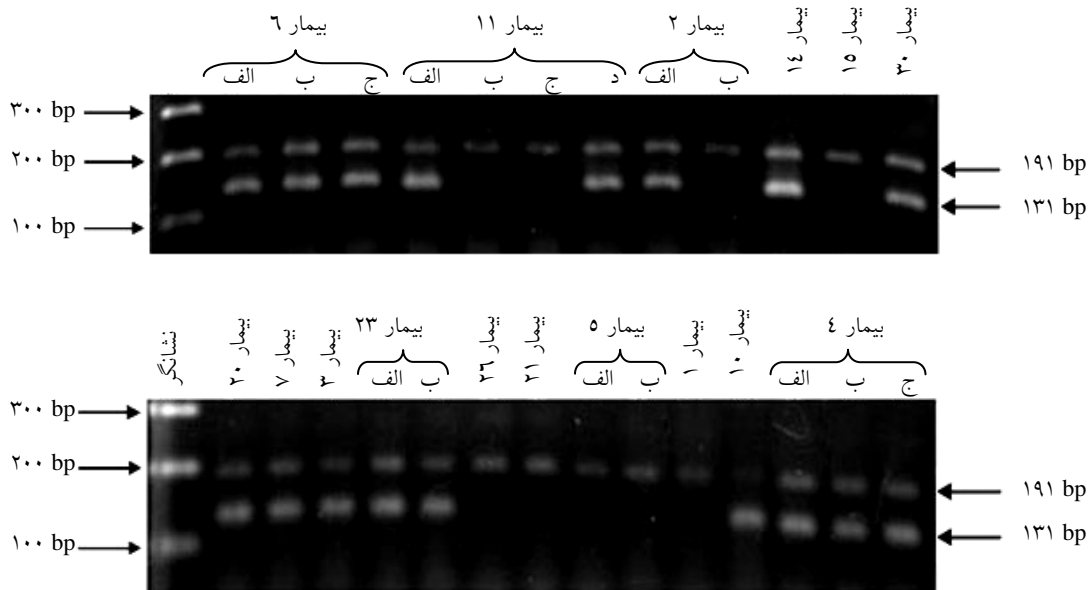
#### (Immunohistochemistry :IHC)

به منظور بررسی جایگیری زیر سلولی پروتئین سورویوین، روی نمونه‌های مثبت و منفی از نظر بیان این ژن که در واکنش RT-PCR بیان آن‌ها تأیید شده بود، با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی علیه پروتئین سورویوین، واکنش IHC انجام شد. در این روش پس از پارافین‌زدایی بافت‌ها، مرحله بازیابی آنتی‌ژن (Antigen retrieval) با استفاده از بافر سیترات (۹ میلی مولار pH=۶) در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای مهار واکنش زمینه، از سرم نرمال بز ۱۰ درصد استفاده شد و سپس لام‌ها با آنتی‌بادی اولیه پلی‌کلونال (Polyclonal) سورویوین (Novus، آمریکا) با رقت ۱/۵۰۰ انکوبه شدند. آنتی‌بادی ثانویه آنتی‌بادی ضد خرگوش بیوتینیل (Biotinylated) (Vector، آمریکا) بود که با رقت ۱/۲۵۰ استفاده شد. برای مرحله بهبود آنزیمی (Enzyme development) و تشدید رنگ، از کمپلکس DAB (Diaminobenzidine)/پراکسید هیدروژن (۱/۱۰۰۰) استفاده شد.

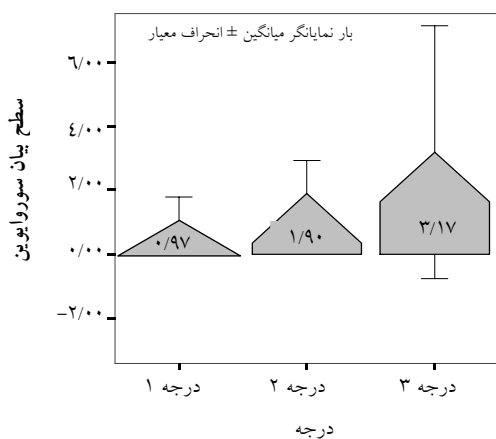
### ۳- نتایج

#### ۳-۱- بهینه‌سازی شرایط PCR

برای تعیین دمای مناسب برای اتصال هر جفت آغازگر، واکنش‌های PCR در دماهای مختلف از ۵۵-۶۲ درجه سانتی‌گراد برای هر دو دور PCR انجام شد و مناسب‌ترین دما در دور اول، ۵۷ درجه سانتی‌گراد و در دور دوم ۶۲ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. به منظور تعیین تعداد چرخه مناسب، در دور اول، واکنش با ۳۵



شکل ۱ الکتروفورز محصولات PCR مربوط به (۱۳۱ bp) سورویوین و (۱۹۱ bp)  $\beta 2m$  در تعدادی از نمونه‌های بیماران (موارد عود تومور در هر بیمار با حروف الف، ب، ج، د نشان داده شده است)

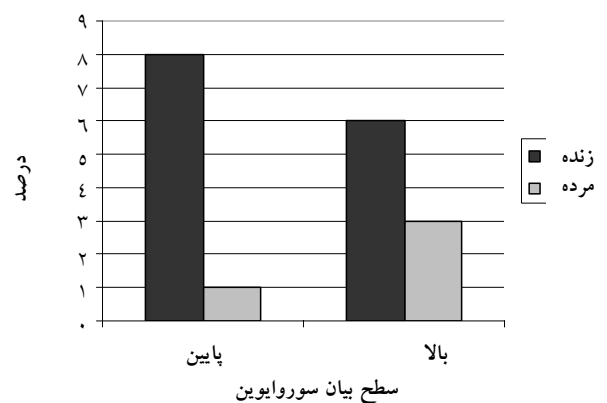


نمودار ۲ نسبت شدت بیان نسبی سورویوین در درجه‌های مختلف تومورهای مثانه

### ۳-۴- تعیین توزیع بافتی سورویوین به وسیله IHC

ابتدا به منظور بهینه‌سازی شرایط آزمایش، از یک نمونه مثبت از نظر بیان سورویوین استفاده شد و صحت عملکرد آنتی‌بادی‌های اولیه و ثانویه تأیید و شرایط آزمایش بهینه‌سازی شد. سپس IHC روی سه نمونه سورویوین مثبت (بر اساس یافته‌های RT-PCR) و نیز دو نمونه سورویوین منفی انجام شد. محصول نهایی واکنش به شکل رسوب قهوه‌ای رنگ، بیانگر وجود پروتئین سورویوین و جایگیری هسته‌ای آن در سلول‌های تحت بررسی است (شکل ۲). برای تأیید حساسیت آنتی‌بادی و صحت آزمایش در کنار نمونه‌های اصلی، کنترل منفی نیز گذاشته شد که از هر نمونه یک لام انتخاب و به جای اضافه کردن آنتی‌بادی اولیه یا ثانویه از محلول سرم نرمال بز (که برای مهار واکنش زمینه استفاده شده بود) به کار رفت.

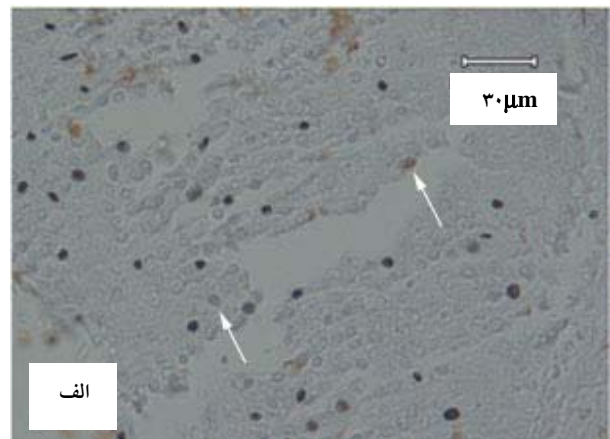
آزمون  $\chi^2$  (Chi Square) نشان داد که با تقسیم‌بندی نمونه‌ها از نظر میزان بیان ژن سورویوین به دو دسته بیان بالا و بیان پایین، بین میزان بیان این ژن و میزان زنده ماندن طی ۵ سال پیگیری، اختلاف معنی‌داری وجود دارد ( $P=0/036$ ) (نمودار ۱).



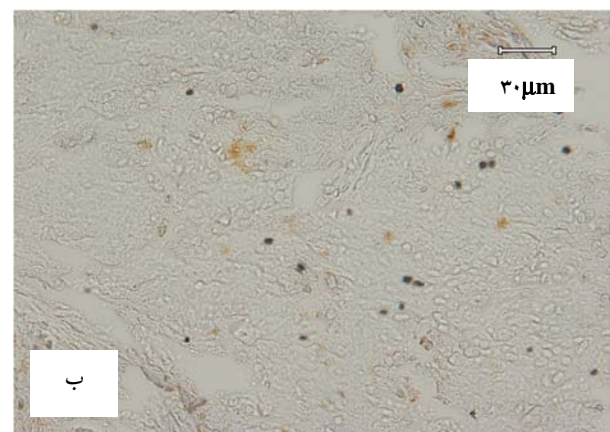
نمودار ۱ شانس زنده ماندن در گروه‌های مختلف از نظر میزان بیان سورویوین

در این تقسیم‌بندی، با افزایش سطح متغیر بیان ژن، احتمال مرگ تقریباً ۶ برابر می‌شود. همچنین بررسی‌های آماری نشان داد که بیان سورویوین با افزایش درجه تومور، افزایش می‌یابد ولی این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود. شانس زنده بودن در درجه ۱ تقریباً ۱/۸ برابر درجه ۲ ( $OR = 1/8$ ) و در درجه ۲ نسبت به ۳ حدود ۱/۴ برابر ( $OR = 1/37$ ) بود (نمودار ۲). به علاوه مشخص شد که بین دو متغیر شدت بیان نسبی سورویوین و مرحله، رابطه معنی‌داری وجود ندارد.

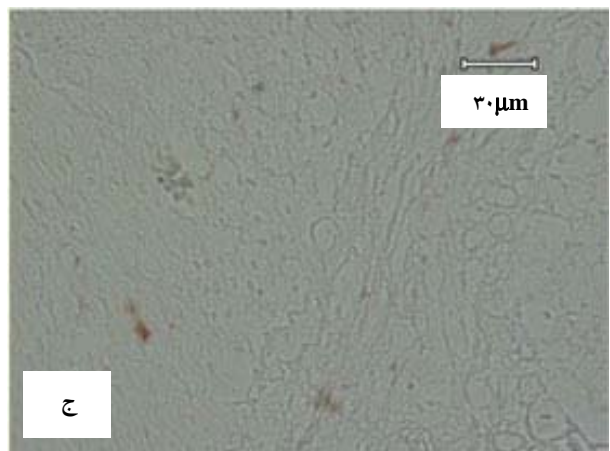
به دلیل تعداد نامحدود نمونه‌ها در آرشیو مراکز تشخیصی و بیمارستان‌ها، امکان بررسی‌های پس‌نگر (Retrospective) مبتلایان به سرطان (برای تعیین پیش‌آگهی بیماری جهت اتخاذ استراتژی‌های مؤثرتر درمانی) را امکان‌پذیر ساخته است. روش‌های متداول بررسی بافت‌های پارافینه مثل IHC وقت‌گیر بوده و اطلاعات محدودی را در اختیار تیم درمانی قرار می‌دهد. بنابراین استفاده از روش‌های PCR و RT-PCR می‌تواند دقت و حساسیت تشخیص را افزایش داده و اطلاعات کامل‌تری را عرضه کند. روش معمول برای استخراج RNA از نمونه‌های پارافینه، استفاده از کیت مخصوص استخراج از این نوع بافت‌ها است که کارایی مراحل آزمایش را افزایش می‌دهد. ولی این کیت‌ها به آسانی در دسترس نبوده و هزینه تهیه آن‌ها بالاست. بنابراین در این تحقیق با انجام تغییراتی در روش کاربری کیت‌های معمولی در استخراج RNA از نمونه‌های بافتی تازه، موفق شدیم تا RNA با کیفیت مطلوب را از نمونه‌های پارافینه استخراج کنیم. یافته‌های ما برای نخستین بار، بیان ژن سورویوین را در ۶۶٪ درصد از نمونه‌های پارافینه تومورهای مثانه نشان داد. مطالعات قبلی روی انواع مختلف تومورهای انسان از جمله سرطان‌های سینه [۱۵]، روده [۱۶]، مری [۱۷]، ریه [۱۸] و مثانه [۱۹] نشان داده است که بیان سورویوین در عمده سرطان‌های انسانی با افزایش درجه و مرحله بدخیمی تومور، افزایش می‌یابد. همچنین بر پایه این گزارش‌ها میزان بقای بیمار طی دوره پیگیری ۵ ساله، با افزایش بیان سورویوین کاهش می‌یابد. در تأیید گزارش‌های قبلی، یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که میزان بیان سورویوین با افزایش درجه و مرحله تومور افزایش می‌یابد. همچنین در مورد رابطه میزان نسبی بیان سورویوین و میزان مرگ و میر بیماران نتایج حاصل از این تحقیق نشان دهنده افزایش احتمال مرگ و میر، به نسبت افزایش میزان نسبی بیان سورویوین است. با این حال از لحاظ آماری اختلافات مشاهده شده در بیان سورویوین و دیگر مشخصه‌های کلینیکوپاتولوژیکی بیمار معنی‌دار نبود که این مشاهده می‌تواند به دلیل کم بودن تعداد نمونه‌های مورد بررسی یا رابطه ضعیف و قابل اغماض بیان سورویوین با این مشخصه‌ها باشد. از میان ۳۰ بیمار مورد بررسی، هفت نفر فوت شده بودند (۲۰ درصد) و هشت نفر (۲۶٪ درصد) نیز تحت عمل جراحی برداشت مثانه (Radical Cystectomy) یا برداشت بخشی از مثانه (Partial Cystectomy) قرار گرفته بودند که این تعداد از گروه تحت پیگیری خارج می‌شدند. یکی از مشکلات جدی در انجام این تحقیق عدم ثبت دقیق و نیز عدم دسترسی به پرونده کامل بیمار طی



الف



ب



ج

شکل ۲ نتایج واکنش IHC. الف) نمونه مثبت از نظر بیان سورویوین، پیکان‌ها علائم قهوه‌ای را نشان می‌دهند. ب) نمونه منفی از نظر بیان سورویوین. ج) نمونه کنترل منفی در واکنش IHC روی بلوک‌های پارافینه

## ۴- بحث

هدف اصلی این تحقیق، بررسی رابطه بین بیان نسبی سورویوین و درجه بدخیمی، رفتار پاتولوژیکی و عود مجدد آن تومورهای مثانه با استفاده از نمونه‌های پارافینی موجود در آرشیو بیمارستانی بود. استفاده از بافت‌های پارافینه در تحقیقات مولکولی

در مجموع در این تحقیق با استخراج RNA از نمونه‌های تثبیت‌شده و پرافینه‌شده سرطان مثانه با کیفیت مطلوب برای نخستین بار بیان نسبی ژن سوروایوین در این نمونه‌ها بررسی شد. همچنین مشخص شد که میزان نسبی بیان این ژن با افزایش بدخیمی تومور و نیز در تکرارهای بعدی تومور در هر بیمار، افزایش نشان می‌دهد که این یافته می‌تواند سوروایوین را به‌عنوان یک نشانگر تومور پیش‌آگهی دهنده در این تومورها معرفی کند.

دوره ۵ تا ۶ ساله پیگیری بود. چرا که بسیاری از بیماران، پیگیری منظم و متداول نداشته و نیز بسیاری از نمونه‌های مندرج در پرونده، در آرشیو بیمارستان موجود نبودند که این مطلب، بررسی پرونده را مشکل و تعداد نمونه‌های با قابلیت بررسی را محدود می‌ساخت. بنابراین بازنگری در نحوه ثبت و پیگیری دقیق‌تر اطلاعات متعلق به بیماران در بیمارستان‌های کشور می‌تواند بانک اطلاعاتی خوبی را برای تحقیقات پس‌نگر به‌وجود آورد.

## ۵- منابع

- [1] Wingo PA, Tong T, Bolden S. Cancer Statistics. *Cancer J Clin* 1995; 45: 8-30.
- [2] Charles H, Spruck III, Petra F, Ohneseit, Gonzalez-Zulueta M, Esrig D, Miyao N, Yvonne C, Seth PT, Schmitt C, Yang AS, Dubeau RL, Nichols PW, Hermann GG, Steven K, Horn T, Skinner DG, Jones PA. Two Molecular pathways to Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. *Cancer Res* 1994; 54: 784.
- [3] Vaish M, Mandhani A, Mittal RD, Mittal B. Microsatellite instability as prognostic marker in bladder tumors: A clinical significance. *BMC Urol* 2005; 5: 2.
- [4] Guo M, Hay BA. Cellproliferation and apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 745-52.
- [5] Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-62.
- [6] Lowe SW, Lin AW, Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21: 485-95.
- [7] Rossi D, Gaidano G. Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. *Haematologica* 2003; 88: 212-8.
- [8] Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS Reed JC, X-linked IAP is a direct inhibitor of cell death proteases. *Nature* 1997; 388: 300-4.
- [9] O'Driscoll L, Linehan R, Clynes M. Survivin: role in normal cells and in pathological conditions. *Curr Cancer Drug Targets* 2003; 3: 131-52.
- [10] Velculescu VE, Madden SL, Zhang L, Lash AE, Yu J, Rago C, Lal A, Wang CJ, Beaudry JA, Ciriello KM, Cook BP, Dufault MR, Ferguson AT, Gao Y, He T, Hermeking H, Hiraldo SK, Hwang PM, Lopez MA, Luderer HF, Mathews B, Petroziello JM, Polyak K, Zawel L, Zhang W, Zhang X, Zhou W, Haluska FG, Jen J, Sukumar S, Landes JM, Riggins GJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Analysis of human transcriptomes. *Nature Genet* 1999; 23: 387-8.
- [11] Span PN, Tjan-Heijnen VC, Manders P, van Tienoven D, Lehr J, Sweep FC, High survivin predicts a poor response to endocrine therapy, but a good response to chemotherapy in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 98(2): 223-30.
- [12] Mowla SJ, Emadi Baygi M, Ziaee SAM, Atlasi Y, Nikpoor P. Evaluation of sensitivity and specificity of urine survivin as a new molecular marker in diagnosis of bladder tumors. *Iran J Biothec* 2005; 3: 163-9.
- [13] Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning a laboratory manual, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [14] BLAST genome [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/HsBlast.html>
- [15] Végran F, Boidot R, Oudin C, Defrain C, Rebutti M, Lizard-Nacol S. Association of p53 gene alterations with the expression of anti-apoptotic survivin splice variants in breast cancer.

- Oncogene 2007; 26: 290-7.
- [16] Meng H, Lu C, Mabuchi H, Tanigawa N. Prognostic significance and different properties of survivin splicing variants in gastric cancer. Cancer Letters 2004; 216: 147-55.
- [17] McCabe ML, Dlamini Z. The molecular mechanisms of oesophageal cancer. Int Immunopharmacol 2004; 5(7-8): 1113-30.
- [18] Tanabe H, Yagihashi A, Tsuji N, Shijubo Y, Abe S, Watanabe N. Expression of survivin mRNA and livin mRNA in non-small-cell lung cancer. Lung Cancer 2004; 49: 299-304.
- [19] Mowla SJ, Emadi Baygi M, Ziaee SAM, Nikpoor P. Evaluating Expression and Potential Diagnostic and Prognostic Values of Survivin in Bladder Tumors: A Preliminary Report. Urol J 2005; 12: 141-7.