گزارش مورد
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۲۱، اسفند ۱۴۰۱، ۱۳۲۲-۱۳۰۷

تجزیه و تحلیل ژنتیکی ناحیه D-loop توالی DNA میتوکندری در بیماران ایرانی مبتلا به پولیپوز آدنوماتوز خانوادگی: یک مطالعه مورد-شاهدی

محمد مهدی حیدری[۱]، الهام افخمی عقدا[۲]، مهری خاتمی[۳]، فرزانه قاسمی[۴]

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۰۸/۰۸ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۱۴۰۱/۱۰/۲۷ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۱۴۰۱/۱۲/۱۰ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۱۲/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: پولیپوز آدنوماتوز خانوادگی (Familial adenomatous polyposis; FAP) یک اختلال ارثی و شکل نادری از سرطان کولورکتال است. این بیماری در هر دو جنس به طور مساوی ظاهر می‌شود و بروز آن بیشتر در دهه دوم یا سوم زندگی است. جهش‌ها و تغییرات ژنوم میتوکندری مخصوصاً در ناحیه D-loop با انواع تومورهای انسانی گزارش شده است. اما نقش دقیق این جهش‌ها در بیماری‌زایی و پیشرفت تومورها هنوز مشخص نیست. هدف مطالعه حاضر تعیین وقوع جهش‌های نوکلئوتیدی mtDNA در ناحیه D-loop و به ویژه در جایگاه‌های بسیار متغیر (Hypervariable region; HVR)، در بیماران FAP است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد-شاهدی، ۵۶ بیمار FAP از نظر وجود جهش در ناحیه D-loop میتوکندری با استفاده از تکنیک‌های Touchdown PCR، پلی‌مورفیسم کنفورماسیون تک رشته‌ای (Single-stranded conformation polymorphism; SSCP) و آنالیز تعیین توالی بررسی شدند. از آنالیز آماری فیشر برای یافتن ارتباط آماری این تغییرات نوکلئوتیدی با بیماری FAP استفاده شد.

یافته‌ها: ۱۹ تغییر نوکلئوتیدی در ناحیه D-loop ژنوم میتوکندری بیماران مبتلا به علائم FAP شناسایی شد. دو مورد از این تغییرات نوکلئوتیدی (C16335T و C16352T) جدید بودند و قبلاً در هیچ بیماری گزارش نشده بودند. نتایج آنالیز آماری جهش‌های مشاهده شده، تفاوت آماری مهمی را در بین گروه بیماران و گروه کنترل نشان داد ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه همبستگی مثبت جهش‌های mtDNA در ناحیه D-loop در تمام موارد FAP در مقایسه با گروه‌های کنترل همسان نشان می‌دهد. بنابراین، جهش در توالی‌های غیرکدکننده میتوکندری ممکن است با تأثیر بر فرآیند بیان ژن‌های میتوکندریایی منجر به تولید پروتئین‌های معیوب در زنجیره تنفسی شوند.

واژه‌های کلیدی: DNA میتوکندریایی، D-loop، بدخیمی، سرطان کلورکتال، پولیپوز آدنوماتوز خانوادگی

۱-(نویسنده مسئول) دانشیار ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه یزد، یزد، ایران
تلفن: ۳۱۲۳۳۳۸۱-۰۳۵، دورنگار: ۳۸۲۱۰۶۴۴-۰۳۵، پست الکترونیکی: Heidarimm@yazd.ac.ir
۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد، ژنتیک، دانشگاه یزد، یزد، ایران
۳- دانشیار ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه یزد، یزد، ایران
۴- دانش آموخته کارشناسی ارشد، ژنتیک، دانشگاه یزد، یزد، ایران

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-09-05]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1401.21.12.7.6]
[DOI: 10.52547/jrums.21.12.1307]

مقدمه

پولیپوز آدنوماتوز خانوادگی (OMIM #175100) (Familial adenomatous polyposis; FAP) یک اختلال نادر اتوزومال غالب است و با وجود صدها تا هزاران پولیپ در روده بزرگ، کولون و رکتوم در دهه دوم یا سوم زندگی مشخص می‌شود. درصدی از بیماران مبتلا به نوع کلاسیک پولیپ‌های FAP در صورتی که در مراحل اولیه شناسایی و درمان نشوند به کارسینوم کولورکتال (Colorectal carcinoma; CRC) مبتلا خواهند شد [۱]. برآوردها نشان می‌دهد که FAP، ۱-۳ نفر در هر ۱۱۰۰۰-۴۰۰۰۰ نفر را تحت تأثیر قرار داده است [۲]. علائم عمومی ممکن است شامل درد شکمی، یبوست یا اسهال، توده‌های قابل لمس شکم و کاهش وزن باشد [۳]. FAP ممکن است با برخی از تظاهرات خارج از روده بزرگ مانند استئوما، ناهنجاری‌های دندانی، هیپرتروفی مادرزادی اپیتلیوم رنگدانه شبکیه (Congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium; CHRPE)، پولیپ‌های دستگاه گوارش فوقانی و سایر بدخیمی‌های خارج کولون ظاهر شود [۵-۴].

تشخیص بالینی استاندارد FAP معمولی/کلاسیک در درجه اول به شناسایی بالینی ۱۰۰ پولیپ آدنوماتوز در کولون و رکتوم و یک وراثت غالب در سابقه خانوادگی متکی است. با این حال، بیماران با ۱۰۰ پولیپ یا بیشتر، یا با کمتر از ۱۰۰ پولیپ اما با سابقه خانوادگی مثبت برای FAP، از نظر بالینی نیز با FAP تشخیص داده می‌شوند. با این حال، وجود و بروز اختلالات خارج روده‌ای مانند پولیپ معده، کیست‌های اپیدرمی، تومورهای دسموئید، و ناهنجاری‌های تیروئید و دوازدهه در FAP کلاسیک به طور بالقوه معیارهای مفیدی در تشخیص بیمار هستند [۶].

سلول‌های یوکاریوتی علاوه بر ژنوم هسته‌ای دارای ژنوم‌های سیتوپلاسمی نیز هستند که در اندامک‌های پیچیده چند منظوره‌ای به نام میتوکندری طبقه‌بندی شده‌اند. میتوکندری مکانیسم‌های مختلفی از جمله تولید انرژی سلولی و متابولیسم، مرگ برنامه‌ریزی شده و برنامه‌ریزی نشده سلولی (آپوپتوز و نکروز) و مسیرهای سم‌زدایی را نیز تنظیم می‌کند. میتوکندری‌ها به عنوان اندامک‌های نیمه خودمختار در سلول‌های یوکاریوتی، در تولید رادیکال‌های آزاد نیز نقش دارند[۷]. میتوکندری‌ها می‌توانند فرآیند آپوپتوز را فعال و طی آن گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تولید کنند. به عبارت دیگر، از یک سو میتوکندری‌ها به عنوان عوامل پیش آپوپتوزی عمل می‌کنند و از سوی دیگر، در شروع و پیشرفت فرآیند تومورزایی نقش دارند. به دلیل فقدان هیستون‌ها و مکانیسم‌های ترمیم DNA و همچنین نزدیکی به گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده طی فسفوریلاسیون اکسیداتیو در غشای داخلی میتوکندری، ژنوم میتوکندری (mtDNA) در معرض نرخ جهش بالاتری نسبت به DNA هسته‌ای قرار دارد [۸]. این اندامک‌های سیتوپلاسمی انرژی سلولی را از دو مسیر اصلی فسفوریلاسیون اکسیداتیو (Oxidative phosphorylation; OXPHOS) و چرخه اسید سیتریک تولید می‌کنند [۹]. تأثیر جهش‌های OXPHOS میتوکندری بر تومورزایی یا پیشرفت به سمت تغییرات بدخیم، ممکن است از طریق تعدادی از تغییرات نوکلئوتیدی در mtDNA حاصل شود. اما پیامدهای بالقوه بالینی این جهش‌ها هنوز مشخص نشده است [۱۰]. جهش‌های سوماتیک mtDNA به طور گسترده در طیف وسیعی از تومورهای اولیه انسانی با بالاترین شیوع در ناحیه D-loop شناسایی شده‌اند و مدت‌هاست که به عنوان نشانگرهای زیستی جذاب در سرطان پیشنهاد می‌شوند [۱۱]. متابولیسم تومورهای سفت (Solid) با تولید بالای لاکتات مرتبط است. این موضوع نشان دهنده نقص عملکرد میتوکندری در تومورها است [۱۲]. با مطالعه بیش از ۲۰۰ جهش mtDNA سوماتیک اختصاصی تومور، مشخص شده است که ۵۲ درصد جهش‌ها از نوع missense، ۸۳ درصد جهش‌ها

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-09-05]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1401.21.12.7.6]
[DOI: 10.52547/jrums.21.12.1307]

در ژن‌های tRNA، ۳۸ درصد جهش‌ها در ژن‌های rRNA و ۸۵ درصد، جهش‌های نواحی تنظیمی میتوکندری هستند [۱۳]. جهش‌های خاص توموری در mtDNA می‌تواند به عنوان یک نشانگر تشخیصی اولیه ارزشمند باشد. مطالعه حاضر برای یافتن رابطه بین جهش‌های mtDNA و بدخیمی‌های توموری بسیار حائز اهمیت است و ممکن است بینش جدیدی را در رویکردهای تشخیص و درمان سرطان در آینده پیشنهاد دهد. مطالعاتی که تاکنون انجام شده است تأثیر تغییرات mtDNA را در تومورهای انسانی عمدتاً، بر نواحی کمپلکس‌های زنجیره تنفسی نشان می‌دهد. به عبارت دیگر، وضعیت ناحیه D-loop در میتوکندری بیماران FAP و ارتباط کمی بین تغییرات mtDNA در این ناحیه و FAP انجام هنوز مشخص نشده است. لازم به ذکر است که این مطالعه به تجزیه و تحلیل ناحیه D-loop میتوکندری در بیماران FAP پرداخته است. با این وجود، ممکن است با افزایش سن و ایجاد آسیب‌های سوماتیک در DNA هسته‌ای و میتوکندریایی سلول‌های اپی‌تلیال دستگاه گوارش، خطر بروز بیماری‌های پولیپوز در افراد افزایش یابد [۱۴].

ژنوم میتوکندری انسان شامل یک مولکول DNA دو رشته‌ای حلقوی است که طولی به اندازه ۱۶۵۶۹ جفت باز (bp) دارد. ژنوم میتوکندری متشکل از ۳۷ ژن شامل ۱۳ ژن کد کننده زیرواحدهای پلی‌پپتیدی سیستم فسفوریلاسیون اکسیداتیو (OXPHOS)، ۲ ژن کد کننده rRNA و ۲۲ ژن کدکننده tRNA برای تولید و ذخیره انرژی است. علاوه بر این، ژنوم میتوکندری شامل یک ناحیه غیر کد کننده به نام D-loop است. ناحیه D-loop شامل دو منطقه به نام‌های HVR1 (۱۶۰۲۴ تا ۱۶۳۶۵) و HVR2 (۷۳ تا ۳۴۰) (Hypervariable Region1,2) است. به دو دلیل میانگین جهش در HRV1,2 بیش‌تر از سایر قسمت‌های ژنوم میتوکندری است. دلیل اول اینکه این دو ناحیه، کدکننده هیچ پروتئینی نیستند و دوم اینکه ناحیه D-loop به عنوان پیش‌برنده رونویسی، نقش مهمی ندارند. از این رو جهش‌های صورت‌گرفته در آن ابقاء می‌شوند [۱۵].

طبق پایگاه داده میتوکندری (www.mitomap.org) تغییرات نوکلئوتیدی mtDNA در ناحیه D-loop به عنوان یک رویداد تکرار شونده عنوان شده است. لازم به ذکر است که این تغییرات بوفور در سرطان دهانه رحم، سرطان سینه، کارسینوم معده، مری، سرطان کولورکتال، سرطان کبد سلولی، سرطان ریه، آندومتریوز رحم، کارسینوم سلول کلیه و سایر بدخیمی‌ها به شکل جهش‌های نقطه‌ای، درج شدگی و حذف نوکلئوتیدی گزارش شده است [۱۷-۱۶]. D-loop دارای طولی به اندازه ۱۱۲۲ جفت‌باز است (نوکلئوتیدهای ۱۶۰۲۴-۱۶۵۶۹ و ۱-۵۷۶). در این مطالعه، یک ناحیه به طول تقریباً ۱ کیلوباز در ناحیه D-loop ژنوم میتوکندری بیماران مبتلا به FAP مورد مطالعه قرار گرفته است تا پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی ناحیه D-loop مرتبط با خطر ابتلاء به FAP شناسایی شود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مورد-شاهدی، ۵۶ بیمار خانوادگی و تک‌گیر (Sporadic) مبتلا به FAP پس از جراحی برای درمان سرطان کولورکتال، جهت بررسی‌های مولکولی انتخاب شدند. همه بیماران با میانگین سنی ۱۳/۵ سال (محدوده ۰/۷ تا ۲۰ سال) و با تشخیص تأیید شده FAP کلاسیک بودند که در فاصله زمانی ۱۳۹۵ تا ۱۳۹۷ به بیمارستان امام خمینی(ره) تهران مراجعه کرده بودند. پس از بررسی سوابق بالینی، بیمارانی که سابقه هرگونه بیماری گوارشی، کبدی، کلیوی و قلبی داشتند از مطالعه خارج شدند. بیماران انتخاب شده برای بررسی‌های مولکولی، متعلق به ۹ خانواده مختلف ایرانی (۱۷ زن و ۹ مرد) و ۳۰ بیمار تک‌گیر و غیر خویشاوند (۱۶ زن و ۱۴ مرد) بودند.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-09-05]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1401.21.12.7.6]
[DOI: 10.52547/jrums.21.12.1307]

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-09-05]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1401.21.12.7.6]

[DOI: 10.52547/jrums.21.12.1307]

علاوه بر این، یک گروه ۶۰ نفره به عنوان نمونه‌های کنترل سالم انتخاب شدند. گروه کنترل از نظر سن و جنسیت با گروه بیماران اختلاف آماری مهم و معناداری نداشتند (۲ تا ۱۹ سال: P=۰/۲۶ و ۳۱ مرد و ۲۹ زن: P=۰/۷۶). گروه کنترل متشکل از افراد سالم و غیر مرتبط با هم و بدون سابقه خانوادگی شناخته شده هر نوع سرطان و از همان منطقه جغرافیایی وارد مطالعه شدند. این افراد برای انجام معاینات روتین به بیمارستان مراجعه کرده بودند. توزیع جنسیتی در هر دو گروه بیمار و کنترل، تقریباً برابر بود و تعداد ۵۴ مرد (۴۶,۵۵ درصد) و ۶۲ زن (۵۳,۴۵ درصد) در مطالعه حضور داشتند. به علت توزیع یکسان متغیرهای ذکر شده در گروه‌های بیمار و کنترل، نمونه مورد بررسی برای یک تحلیل آماری معتبر، قابل قبول در نظر گرفته شد. تمامی پروتکل‌های این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه یزد تأیید شد (IR.YAZD.REC.1401.053) و تمامی رویه‌ها مطابق با اعلامیه هلسینکی (Declaration of Helsinki) ۱۹۷۵، اصلاح شده در سال ۲۰۰۸ و استانداردهای اخلاقی بود [۱۸].

تمام افراد (مورد و شاهد) فرم رضایت آگاهانه مشارکت در طرح تحقیقاتی را تکمیل نمودند. با مروری بر مطالعات پیشین، یک چک لیست جامع در ارتباط با عوامل احتمالی مرتبط با بیماری، تهیه و هنگام نمونه‌گیری توسط فرد آگاه تکمیل گردید. سپس از همه افراد، ۵ میلی‌لیتر نمونه خون محیطی گرفته شد و نمونه‌ها در لوله‌های استریل حاوی ماده ضد انعقاد EDTA در شرایط سرد به آزمایشگاه ژنتیک انتقال داده شدند. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایشات در فریز ۲۰- درجه سانتی‌گراد (شرکت پارس، ساخت ایران) نگه‌داری شدند. استخراج DNA از نمونه‌های خون تام، طبق پروتکل پیشنهادی کیت استخراج DNA شرکت یکتا تجهیز آزما (YT9040، ایران) انجام گرفت. برای بررسی‌های مولکولی ناحیه D-loop از روش Touchdown PCR برای تکثیر قطعه مورد نظر استفاده شد. روش Touchdown PCR یکی از انواع روش‌های تکثیر DNA است که سبب کاهش احتمال تکثیر قطعات غیراختصاصی می‌گردد. در این روش به جای استفاده از یک دمای اتصال پرایمر مشخص، از یک بازه دمایی در مرحله اتصال (Annealing) استفاده می‌شود. بدین صورت که دمای اتصال با بالاترین دما شروع می‌شود که فقط سبب تکثیر اختصاصی قطعه مورد نظر می‌شود. به تدریج در سیکل‌های بعدی دما به صورت تدریجی کاهش می‌یابد. در واقع این روش، سبب افزایش اختصاصیت و حساسیت تکثیر قطعه DNA مورد نظر می‌شود [۱۹].

در روش Touchdown PCR دو پرایمر در میکروتیوب واکنش PCR ریخته می‌شود. پرایمرهای اختصاصی، با نرم‌افزار آنلاین Primer1 (http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html) طراحی شد. پرایمرها، پس از بلاست کردن (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) و بررسی همولوژی با کل ژنوم انسان و تأیید اختصاصیت آن‌ها در تکثیر ناحیه هدف، مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱).

جدول ۱- توالی و موقعیت پرایمرهای طراحی شده برای واکنش PCR ژن D-loop

نام قطعه	اندازه (bp)	Tm (C°)	موقعیت نوکلئوتیدی پرایمرها	توالی پرایمرها ('5-'3)
D-loop	۹۲۷	۶۰	۱۶۱۳۳-۱۶۱۵۳	F-CCATAAATACTTGACCACCTG
		۶۰	۴۹۱-۴۶۹	R-GTATTGATGAGATTAGTAGTATG

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر برای تکثیر ناحیه D-loop با استفاده از مسترمیکس آماده شرکت یکتا تجهیز آزما انجام گرفت. برای انجام روش Touchdown PCR، مخلوط واکنش PCR شامل ۱۰ میکرولیتر مخلوط مسترمیکس، ۳ میکرولیتر از هر پرایمر (Forward و Reverse)، ۵ میکرولیتر DNA الگو و ۷ میکرولیتر آب دیونیزه استریل آماده شد. با کمک دستگاه ترموسایکلر TMT100 (شرکت Rad Bio، ساخت آمریکا) واکنش تکثیر قطعه DNA انجام گرفت. برنامه زمانی و دمایی واکنش Touchdown PCR به این صورت انجام گرفت: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و به دنبال آن ۳۵ سیکل دمایی متشکل از دمای دناتوراسیون ۹۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال از درجه حرارت ۵۴ تا ۶۳ درجه سانتی‌گراد (به صورت کاهشی ۰/۵ درجه سانتیگراد به ازای هر سیکل) و مرحله گسترش به مدت یک دقیقه در درجه حرارت ۷۲ درجه سانتی‌گراد و مرحله گسترش نهایی به مدت پنج دقیقه در درجه حرارت ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. در نهایت برای اطمینان از تکثیر قطعات مورد نظر، ۵ میکرولیتر از محصولات PCR روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید، بارگذاری و الکتروفورز شد. ژل آگارز به مدت ۳۰ دقیقه و با ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز گردید و پس از آن نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ترانسلومیناتور Gel Doc (UVITEc, UK) مشاهده شد و تصویربرداری از آن‌ها صورت گرفت.

در مرحله بعد، برای غربالگری محصولات تکثیر شده PCR که حاوی جهش بودند، از تکنیک SSCP (Single-stranded conformation polymorphism) برای تمام بیماران FAP و افراد سالم استفاده شد. در این تکنیک، ابتدا ۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR با ۷ میکرولیتر محلول بارگذاری (لودینگ) SSCP شامل فرمامید ۹۵ درصد، ۱۰ میلی مولار NaOH، ۴۵ درصد ساکارز و ۰/۲ درصد زایلن سیانول FF مخلوط شدند. سپس قطعات DNA به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد دناتوره شدند و بلافاصله به مدت ۵ دقیقه در حمام یخ خنک شدند. الکتروفورز و جداسازی قطعات DNA روی ژل پلی‌آکریل آمید ۷ درصد (با نسبت ۴۹:۱ آکریل آمید به بیس آکریل آمید) به مدت ۱۶-۱۸ ساعت در ولتاژ ۱۱۰ ولت در دمای اتاق انجام شد. رنگ‌آمیزی باندهای SSCP روی ژل با روش رنگ‌آمیزی نقره مطابق پروتکل استاندارد انجام شد [۲۰]. قطعاتی که الگوهای الکتروفورتیک و مهاجرتی متفاوتی در مقایسه با نمونه‌های کنترل سالم نشان می‌دادند، مستقیما برای شناسایی دقیق تغییر نوکلئوتیدی تعیین توالی شدند (شرکت نورژن، تهران). نتایج تعیین توالی‌ها با نرم افزار MEGA5 و برنامه کروماس (chromas) بررسی و با توالی مرجع کمبریج (CRS)، MITOMAP و توالی ثبت شده در سایت NCBI هم‌تراز شدند. هم‌ردیفی با توالی ناحیه D-loop سایر گونه‌ها نیز از طریق پایگاه BLAST انجام شد.

برای بررسی‌های آماری و تعیین ارتباط یا تفاوت معنادار تغییرات نوکلئوتیدی با بیماری FAP در دو گروه کنترل و بیمار، از آزمون آماری فیشر (Fisher's exact) و نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۳ استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون t مستقل انجام شد. صفات کیفی با آزمون مجذور کای بین دو گروه مقایسه شدند. مقایسه مقادیر مورد انتظار و مشاهده شده ژنوتیپ‌ها در هر دو گروه کنترل و بیمار با آزمون مجذور کای مورد بررسی قرار گرفت. سطح معنی‌داری کم‌تر از ۰/۰۵ ($P<0.05$)، از نظر آماری مهم و معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

در مطالعه حاضر ۵۶ بیمار مبتلا به FAP با میانگین سنی ۱۳/۵ سال (محدوده ۰/۷ تا ۲۰ سال) و با تشخیص تأیید شده FAP کلاسیک برای بررسی‌های مولکولی انتخاب شدند که متعلق به ۹ خانواده مختلف ایرانی (۱۷ زن و ۹ مرد) و ۳۰ بیمار تک‌گیر و

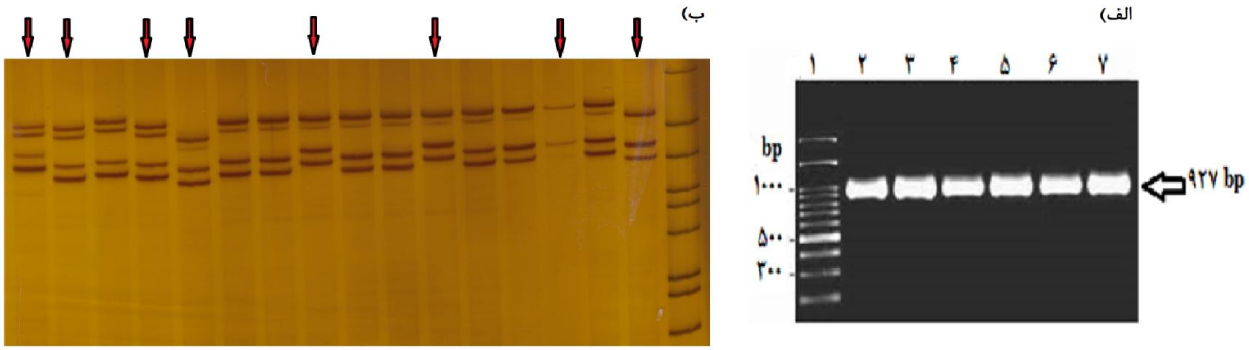
[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-09-05]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1401.21.12.7.6]
[DOI: 10.52547/jrums.21.12.1307]

غیرخویشاوند (۱۶ زن و ۱۴ مرد) بودند. ارزیابی اولیه برای FAP با دلیل سابقه خانوادگی مثبت در ۲۶ بیمار از ۹ خانواده مختلف ایرانی، فراوانی ۴۶/۴۳ درصد را نشان داد. سایر بیماران با تشخیص FAP موارد تک‌گیر جدید بودند (۳۰ نفر با فراوانی ۵۳/۵۷ درصد). خصوصیات جمعیتی بیماران بررسی شده در جدول ۲ آورده شده است.

جدول۲- مشخصات بالینی و دموگرافیک بیماران FAP

مشخصات بالینی	تعداد بیماران=۵۶	محدوده	فراوانی یا میانگین
جنسیت			
زن	۳۳	۱۷ با سابقه خانوادگی	٪۵۸/۹۲
مرد	۲۳	۹ با سابقه خانوادگی	٪۴۱/۰۸
وقوع FAP			
با سابقه خانوادگی	۲۶	از ۹ خانواده مختلف	٪۴۶/۴۳
بدون سابقه خانوادگی	۳۰	براساس تشخیص بالینی FAP	٪۵۳/۵۷
سن در زمان تشخیص			
در موارد خانوادگی	۲۶	۰/۷ تا ۲۰ سال	۱۲/۵ سال
در موارد تک‌گیر (Sporadic)	۳۰	۱/۵ تا ۲۰ سال	۱۵ سال
موارد پرونده‌های پی‌گیری شده			
در موارد خانوادگی	۳	۱ تا ۱۰ سال	۶/۱۶ سال
در موارد تک‌گیر (Sporadic)	۵	۲/۵ تا ۲۰ سال	۱۱/۸ سال

توالی ناحیه D-loop میتوکندری، با استفاده از واکنش Touchdown PCR و آنالیز SSCP و تعیین توالی مستقیم توالی در ۵۶ بیمار FAP و ۶۰ نمونه کنترل سالم و غیرسرطانی مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱). در بیماران (۳۳ زن و ۲۳ مرد)، ۱۹ تغییر نوکلئوتیدی هموزیگوت در توالی D-loop مشاهده شد. در گروه کنترل نیز با فراوانی بسیار کمتر نسبت به بیماران FAP، ۱۳ تغییر نوکلئوتیدی در این ناحیه مشخص شد.



شکل ۱- الف) تکثیر قطعه DNA از ژنوم میتوکندری در ۶ بیمار، ستون ۱، DNA Ladder با اندازه ۱۰۰bp است و ستون‌های ۲ تا ۷ قطعات تکثیر شده در بیماران را نشان می‌دهد. ب) نتایج آنالیز SSCP در بیماران. فلش‌ها نشان دهنده شیفت باندی نمونه‌های بیماران و تفاوت الگوی مهاجرت باندها روی ژل هستند که به وجودجهش‌های نوکلئوتیدی در نمونه‌ها دلالت دارد. ستون آخر، DNA ladder با اندازه ۱۰۰ bp است.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-09-05]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1401.21.12.7.6]
[DOI: 10.52547/jrums.21.12.1307]

تجزیه و تحلیل‌های آماری نیز با استفاده از آزمون دقیق فیشر و نرم‌افزار SPSS انجام شد. براساس تجزیه و تحلیل رگرسیون لجستیک و سه پرامتر *P*-value، Odd-ratio و 95 درصدCI در گروه بیماران، افزایش آماری معنی‌داری در فراوانی و نرخ وقوع تغییرات نوکلئوتیدی نسبت به گروه کنترل وجود دارد. این تغییرات نوکلئوتیدی در بیماران FAP دارای همبستگی و ارتباط مثبت هستند (جدول ۳). با توجه به نتایج به نظر می‌رسد، میزان جهش‌های مشاهده شده، تفاوت آماری معنی‌داری را در بین بیماران و افراد کنترل نشان می‌دهد ($P<0.05$) و تنها دو تغییر نوکلئوتیدی تفاوت آماری مهمی را بین دو گروه نشان ندادند (:C16223 $P=0.055$, A16482G: $P=0.177$). لازم به ذکر است که جهش‌های نوکلئوتیدی مشاهده شده شامل جهش‌های نقطه‌ای بودند و حذف شدگی یا درج شدگی در نمونه‌های بیماران این مطالعه مشاهده نشد.

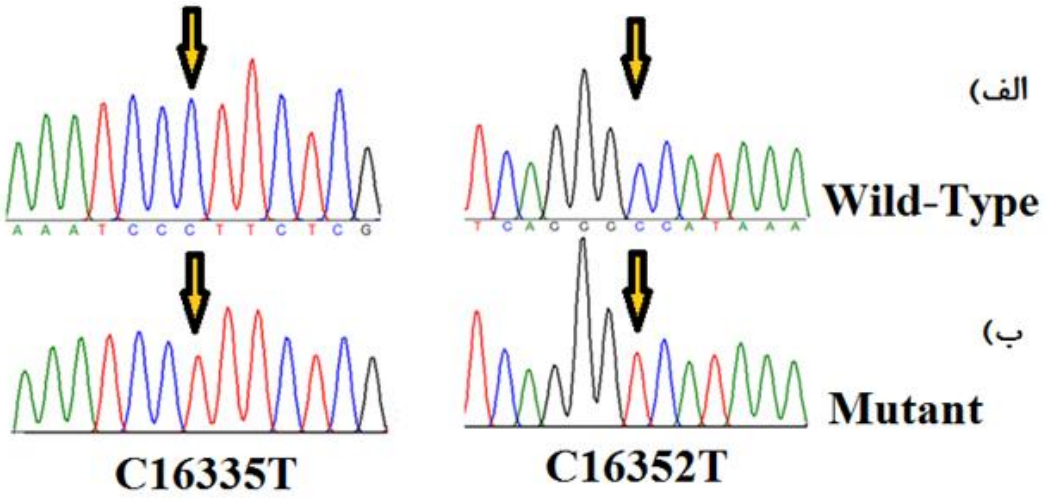
جدول ۳- تغییرات نوکلئوتیدی در ناحیه D-loop در بیماران مبتلا به FAP

شماره نوکلئوتید	تغییر نوکلئوتید	موقعیت در ناحیه D-loop	فراوانی نسبی جهش در بیماران (٪)	فراوانی نسبی جهش در کنترل (٪)	مقدار P	نسبت شانس	فاصله اطمینان ۹۵ درصد
۱۶۱۸۹	T→C	*MT-HV1	۱۲ (۲۱/۴۲)	۲ (۳/۳۳)	۰/۰۰۱	۱۶/۰۹۱	۲/۰۱۶-۱۲۸/۴۱۵
۱۶۲۲۳	C→T	MT-HV1	۶ (۱۰/۷۱)	۱ (۱/۶۶)	۰/۰۵۵	۷/۰۸۰	۰/۸۲۴-۶۰/۷۹۷
۱۶۲۴۲	C→T	MT-HV1	۷ (۱۲/۵۰)	۱ (۱/۶۶)	۰/۰۲۸	۸/۴۲۹	۱/۰۰۲-۷۰/۸۷۳
۱۶۲۴۸	C→T	MT-HV1	۱۲ (۲۱/۴۲)	۰	<۰/۰۰۱	-	۱/۱۱۰-۱/۴۵۹
۱۶۲۵۷	C→T	MT-HV1	۱۰ (۱۷/۸۵)	۰	۰/۰۰۱	-	۱/۰۶۵-۱/۳۱۱
۱۶۲۹۴	C→T	MT-HV1	۱۶ (۲۸/۵۷)	۳ (۵)	۰/۰۰۱	۷/۶۰۰	۲/۰۷۶-۲۷/۸۲۲
۱۶۳۱۱	T→C	MT-HV1	۱۲ (۲۱/۴۲)	۱ (۱/۶۶)	۰/۰۰۱	۱۶/۰۹۱	۲/۰۱۶-۱۲۸/۴۱۵
۱۶۳۳۵	C→T	MT-HV1	۱۸ (۳۲/۱۴)	۱ (۱/۶۶)	<۰/۰۰۱	۲۷/۹۴۷	۳/۵۸۲-۲۱۸/۰۷۷
۱۶۳۵۲	C→T	MT-HV1	۱۱ (۱۹/۶۴)	۰	<۰/۰۰۱	-	۱/۰۹۳-۱/۴۱۶
۱۶۳۶۲	T→C	MT-HV1	۵ (۸/۹۲)	۰	۰/۰۲۴	-	۱/۰۱۲-۱/۱۹۲
۱۶۳۹۰	G→A	**MT-ATT	۱۰ (۱۷/۸۵)	۱ (۱/۶۶)	۰/۰۰۳	۱۲/۸۲۶	۱/۵۸۴-۱۰۳/۸۵۰
۱۶۴۸۲	A→G	MT-ATT	۸ (۱۴/۲۸)	۳ (۵)	۰/۱۱۷	۳/۱۶۷	۰/۷۹۶-۱۲/۶۰۴
۱۶۵۱۹	T→C	MT-ATT	۳۵ (۶۲/۵۰)	۷ (۱۱/۶۶)	<۰/۰۰۱	۱۲/۶۱۹	۴/۸۵۱-۳۲/۸۲۶
۷۳	A→G	***MT-HV2	۲۳ (۴۱/۰۷)	۲ (۳/۳۳)	<۰/۰۰۱	۲۰/۲۱۲	۴/۴۷۹-۹۱/۲۰۱
۱۴۶	T→C	****MT-HV2/OHR/ATT	۱۷ (۳۰/۳۵)	۵ (۰/۳۳)	۰/۰۰۴	۴/۷۹۵	۱/۶۳۱-۱۴/۰۹۵
۱۵۲	T→C	MT-HV2/OHR/ATT	۱۴ (۲۵)	۱ (۱/۶۶)	<۰/۰۰۱	۱۹/۶۶۷	۲/۴۸۹ -۱۵۵/۳۸۵
۱۹۵	T→C	MT-HV2/OHR/ATT	۹ (۱۶/۰۷)	۰	۰/۰۰۱	-	۱/۰۶۲-۱/۳۳۶
۱۹۹	T→C	MT-HV2/OHR/ATT	۱۵ (۲۶/۷۸)	۰	<۰/۰۰۱	-	۱/۱۶۶-۱/۶۰۰
۲۰۴	T→C	MT-HV2/OHR/ATT	۱۹ (۳۳/۹۲)	۲ (۳/۳۳)	<۰/۰۰۱	۱۴/۸۹۲	۳/۲۷۶-۶۷/۶۹۹

****قطعه HVR1 میتوکندری (نوکلئوتیدهای ۱۶۰۲۴ تا ۱۶۳۸۳)، ** غشای میتوکندری، *** قطعه HVR2 میتوکندری (نوکلئوتیدهای ۵۷ تا ۳۷۲)، **** منشأ همانندسازی زنجیره سنگین (نوکلئوتیدهای ۱۱۰ تا ۴۴۱)***

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-09-05]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1401.21.12.7.6]
[DOI: 10.52547/jrums.21.12.1307]

از آن‌جایی که ناحیه D-loop ژنوم میتوکندری به عنوان ناحیه کنترلی در فرآیندهای همانندسازی و نسخه برداری mtDNA مشخص شده است، بنابراین دور از انتظار نیست که دارای موقعیت‌های نوکلئوتیدی حفاظت شده باشد. از این رو ما شاخص حفاظت شدگی (Conservation index; CI) را برای هر نوکلئوتید در این ناحیه در میان حداقل ۱۰۰ گونه شامل پستانداران غیر انسانی و غیر پستانداران بررسی کردیم (از جمله انواع نخستی‌ها، گربه‌سانان، پرندگان، ماهی‌ها، خزندگان و حشرات). توالی‌های ناحیه D-loop این موجودات از طریق سایت مرجع (www.mitomap.org) MITOMAP و GenBank حاصل شد و با هم هم‌تراز گردید. هشت جهش از مجموع ۱۹ تغییر نوکلئوتیدی مشاهده شده در بیماران FAP، با CI حداقل ۹۷٪ -۱۰۰٪ حفاظت شده بودند: T16189C، T195C ،T16362C ،C16352T ،C16335T ،C16257T ،C16248T و T199C، همچنین، سه تغییر نوکلئوتیدی با CI حداقل ۹۰٪ - ۹۷٪ به طور متوسط حفاظت شده بودند: C16294T، T16519C، و T146C. هشت تغییر نوکلئوتیدی دیگر نیز در موقعیت‌های کمتر حفاظت شده مشاهده شدند. از ۱۹ تغییر نوکلئوتیدی یافت شده در این مطالعه، تنها دو جهش نقطه‌ای در موقعیت‌های بسیار حفاظت شده (۹۷ درصد<CI)، جدید بودند (C16335T و C16352T) و تاکنون در بانک‌های اطلاعاتی MITOMAP و SNP در ارتباط با هیچ بیماری گزارش نشده بودند (شکل ۲).



شکل ۲- (الف) توالی‌های نرمال در افراد کنترل. (ب) توالی‌های جهش یافته هموپلاسمی در افراد بیمار که در نوکلئوتید ۱۶۳۳۵ (سمت چپ) و در نوکلئوتید ۱۶۳۵۲ (سمت راست) هر دو دارای جهش‌های جدید C به T می‌باشند.

بحث

فرکانس تغییرات نوکلئوتیدی با نرخ بالا در ژنوم میتوکندری با افزایش خطر بیماری‌های مختلف از جمله سرطان مرتبط است. بررسی‌ها نشان می‌دهد که پلی‌مورفیسم‌های ناحیه D-loop در mtDNA با برخی سرطان‌ها مانند کولورکتال، ریه، کبد، معده، پستان، دهانه رحم، پوست، دهان، کلیه و سر و گردن [۲۲-۲۱] در ارتباط است [۲۳]. یکی از اولین شواهد مبتنی بر نقش ژنوم میتوکندری در پیشرفت سرطان‌ها، مطالعه جهش‌های ژن *ND3* بود

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-09-05]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1401.21.12.7.6]
[DOI: 10.52547/jrums.21.12.1307]

که با افزایش خطر سرطان‌های مهاجم سینه و آندومتر، در زنان آفریقایی-آمریکایی مرتبط بود [۲۴].

جهش‌های میتوکندریایی در بیماری‌های گوارشی نیز رایج است. زیرا وجود رادیکال‌های آزاد به مدت زیاد در میتوکندری باعث تشکیل ROS (گونه‌های اکسیژن واکنش‌زا: Reaction Oxygen Species) می‌شود و در نتیجه باعث القای جهش‌های mtDNA و آپوپتوز می‌شود [۲۵]. نکته مهم اینجاست که میزان زیاد جهش‌های mtDNA در بیماران، سبب ناپایداری ژنوم میتوکندری این بیماران در مقایسه با افراد سالم می‌گردد. وجود این جهش‌ها ممکن است موجب نقص در فعالیت زنجیره‌های تنفسی میتوکندری و در نتیجه کاهش تولید ATP شود [۱۴]. مطالعات اخیر نشان داده است که جهش‌های mtDNA، شامل جهش‌های نقطه‌ای و حذف، در انواع مختلف سرطان‌ها و بیماری‌های انسانی از جمله FAP شناسایی شده‌اند [۲۶, ۲۷]. میتوکندری‌ها اندامک های موجود در سلول‌های یوکاریوتی هستند که نقش اصلی آنها تولید منابع انرژی به شکل ATP از طریق فسفوریلاسیون اکسیداتیو است. به این ترتیب، این اندامک تعدادی از فرآیندهای مربوط به بقای سلول را کنترل می‌کند و همچنین نقش برجسته‌ای در نگهداری سلول‌های تومور دارد. تغییرات نوکلئوتیدی mtDNA ممکن است بر کارایی زنجیره انتقال الکترون (Electron transport chain; ETC) و تولید ROS تأثیر بگذارد که در افزایش خطر ابتلا به سرطان نقش دارد [۲۸]. این SNPها ممکن است رونویسی ژنوم میتوکندری را تغییر دهند و به همین ترتیب تولید ROS با تغییر رونویسی میتوکندری افزایش می‌یابد. اما هنوز مشخص نیست که چگونه SNPها در ناحیه تنظیم‌کننده رونویسی در ناحیه D-loop، خطر ابتلاء به سرطان را افزایش می‌دهند. با این وجود، این تغییرات ژنتیکی اغلب در بسیاری از انواع سرطان شناسایی شده است.

به دلیل ارتباط قوی بین پلی‌مورفیسم‌های موجود در ناحیه D-loop و خطر ابتلا به انواع سرطان‌ها، این ناحیه به طور گسترده در جمعیت‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته است. در سال ۲۰۱۱ Ebner و همکارانش با بررسی ۳۵۱ فرد مبتلا به ملانوما و ۱۵۹۸ فرد کنترل، مشاهده کردند که تغییرات نوکلئوتیدی ناحیه تنظیمی mtDNA (Control region ;CR) در روند بیماری‌زایی دخیل است [۲۹]. در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۱، Abdel Meguid Kassem و همکاران با تحقیق بر روی ۶ ناحیه مختلف ژنی mtDNA از جمله D-loop در ۸۰ بیمار مبتلا به سندرم‌های پولیپوز گوارشی (شامل ۲۰ نفر مبتلا به ضایعات کولیت اولسراتیو (UC: Ulcerative Colitis)، ۲۰ بیمار مبتلا به پولیپ‌های آدنوماتوز (Adenomatous Polyposis: AP) و ۴۰ نفر مبتلا به سرطان کلورکتال)، طیف وسیعی از تغییرات نوکلئوتیدی (هموپلاسمی و هتروپلاسمی) به‌ویژه در ناحیه تنظیمی میتوکندری گزارش کرده‌اند [۳۰]. بنابراین، در این مطالعه، این ناحیه به عنوان نقطه داغ (Hot spot) در بیماران در نظر گرفته شده است.

طبق یافته‌های ما، این مطالعه اولین گزارش در بیماران پولیپوز آدنوماتوز خانوادگی است که در آن ناحیه D-loop میتوکندری مورد توالی‌یابی گردید. این مطالعه به بررسی جهش‌های نقطه‌ای در ۵۶ مورد FAP و ۶۰ نمونه کنترل پرداخته است که ناحیه D-loop در آن‌ها تعیین توالی شده است. نتایج تعیین توالی در بیماران FAP، ۱۹ تغییر نوکلئوتیدی را نشان داد که همگی به حالت هموپلاسمی مشاهده شدند. فراوانی این جهش‌ها در بیماران و نمونه‌های کنترل متفاوت بود و تنها ۱۳ مورد از این جهش‌ها در گروه کنترل نیز مشاهده شد.

با توجه به نتایج حاصل از ارزیابی در این مطالعه، اکثر این جهش‌ها معیارهای لازم را برای داشتن اهمیت بالقوه در پاتوژنز FAP دارند. یافته‌ها نشان می‌دهد که جهش‌های mtDNA تومور

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-09-05]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1401.21.12.7.6]
[DOI: 10.52547/jrums.21.12.1307]

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-09-05]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1401.21.12.7.6]

[DOI: 10.52547/jrums.21.12.1307]

ممکن است به دو دسته اصلی تقسیم شوند: بیماری‌زا و پلی‌مورفیسم. جهش‌های mtDNAی بیماری‌زا، جهش‌های مضرتری هستند و غالبا شامل جهش‌های نقطه‌ای هتروپلاسمی، جهش‌های درج-حذف‌شدگی، و جهش‌های بی‌معنی (Nonsense) هستند که آمینواسیدهای به شدت حفاظت‌شده‌ای را در پروتئین‌های میتوکندریایی تغییر می‌دهند. این جهش‌های مضر به عنوان عامل مهارکننده زنجیره انتقال الکترون (ETC) میتوکندری، پیشنهاد می‌شوند که در افزایش قابل‌توجه تولید ROS در میتوکندری شرکت دارند [۳۱]. افزایش ROS در میتوکندری می‌تواند باعث تغییرات درون سلولی و آسیب اکسیداتیو به DNA شود و به عنوان آغازگر و محرک توموری عمل کند. همچنین می‌تواند پروتوانکوژن‌ها را به انکوژن‌های فعال تبدیل کند و در نهایت سلول تومور را تحریک به تکثیر نماید [۳۲]. افزایش سطوح ROS اغلب در سلول‌های سرطانی دیده می‌شود. به عنوان مثال، جهش‌های هتروپلاسمی nonsense/missense در ژن *ND5* میتوکندری (کمپلکس I) باعث افزایش تولید ROS و افزایش رشد تومور می‌شود [۳۳، ۱۳].

جهش‌های چندشکلی یا پلی‌مورفیسم‌های mtDNA جهش‌های قابل تحملی هستند که در جمعیت‌های مختلف انسانی به عنوان تغییرات جمعیتی و یا طی روند پیری و یا بیماری مشاهده می‌شوند. با این وجود، مشخص شده است که این تغییرات نوکلئوتیدی حتی می‌تواند آمینواسیدهای حیاتی را نیز تغییر دهند و یا در فرآیند همانندسازی و رونویسی ژنوم میتوکندری اختلال ایجاد کنند. بنابراین، این جهش‌های چندشکلی را می‌توان به عنوان فاکتورهای کمکی در بقای تومور، سازگار کردن تومورها با محیط‌های کوچک جدید و تشویق آن‌ها برای رسیدن به مرحله متاستاز پیشنهاد کرد [۳۴].

در این مطالعه، ما به دنبال بررسی رابطه پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs) در ناحیه D-loop ژنوم میتوکندری بین بیماران مبتلا به FAP و مستعد به سرطان کلورکتال و گروه کنترل بودیم. از مجموع ۱۹ تغییر نوکلئوتیدی مشاهده شده، ۱۷ جهش با بیماری FAP و افزایش خطر ابتلاء به سرطان کلورکتال همراه بود و تنها دو تغییر نوکلئوتیدی A16482G و C16223 ارتباط قابل توجهی با افزایش خطر ابتلا نداشتند. در مقایسه با فراوانی پلی‌مورفیسم‌ها در نمونه‌های کنترل، این یافته از نظر آماری نشان‌دهنده وجود ارتباط معنی‌دار بین پلی‌مورفیسم‌های ناحیه D-loop و افزایش خطر ابتلا به بیماری FAP در جمعیت مورد بررسی بود. با این حال، این یافته‌ها باید در مطالعات بعدی در جمعیت‌های بزرگ‌تر تأیید شوند.

همچنین اهمیت بیولوژیکی احتمالی تغییرات نوکلئوتیدی مشاهده شده با محاسبه شاخص حفاظت بین گونه‌ای (CI) ارزیابی شد. تجزیه و تحلیل CI به فراوانی نوکلئوتیدهای خاص در موقعیت‌های بسیار حفاظت‌شده در گونه‌های یوکاریوت در طول تکامل اشاره داشت. حفاظت تکاملی معمولاً برای تعیین ارزش بیماری‌زایی جایگزینی نوکلئوتیدها در mtDNA استفاده می‌شود و اطلاعاتی در مورد اهمیت عملکردی آن‌ها ارائه می‌دهد. اگر شاخص حفاظت‌شدگی نوکلئوتید نوع وحشی (نرمال) در ۱۰۰ گونه غیرانسانی CI=97-100 درصد باشد، آن نوکلئوتید از دیدگاه تکاملی بسیار محافظت شده است. بنابراین تغییر آن نوکلئوتید به احتمال زیاد بیماری‌زا است یا ارتباط و همبستگی نزدیکی با روند بیماری‌زایی دارد. در مطالعه حاضر، ۸ تغییر نوکلئوتیدی شاخص بالای حفاظت شدگی را داشتند که موید ارتباط نزدیک آن‌ها با بروز FAP است. همچنین در مقایسه با بانک اطلاعاتی میتوکندری MitoMap و SNP مشخص گردید که برخی از این تغییرات نوکلئوتیدی مشاهده شده در این بررسی، در بیماری‌های دیگری مانند آندومتریوز (T۱۴۶C)، ملانوما (T۱۹۵C) و گلوکوم یا آب سیاه (G۱۶۳۹۰A) نیز گزارش شده است [۳۵]. از ۱۹ تغییر

نوکلئوتیدی یافت شده در این مطالعه، دو جهش نقطه‌ای در موقعیت‌های بسیار حفاظت شده (CI>97 درصد)، برای اولین بار شناسایی و معرفی شدند (C16335T و C16352T) که تاکنون در ارتباط با هیچ بیماری گزارش نشده بودند.

از مهمترین محدودیت‌های مطالعه حاضر اندازه کوچک نمونه و محدود بودن نمونه‌ها به منطقه جغرافیایی جنوب کشور می‌باشد. از این رو پیشنهاد می‌گردد مطالعات مشابه با اندازه نمونه بزرگ‌تر و پراکندگی جمعیتی بیشتر در سایر نقاط کشور نیز انجام گردد. مطالعاتی با حجم نمونه‌های بزرگ‌تر، برای کشف تغییرات ژنتیکی جزئی‌تر و اعتبارسنجی مقادیر پیش‌بینی SNPهای شناسایی‌شده مورد نیاز است، زیرا افزایش کمیت باعث کاهش ضریب خطای موجود در نتایج به دست آمده می‌شود.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر که برای اولین بار در بیماران مبتلا به FAP انجام شد، ارتباط SNPها و جهش‌های نوکلئوتیدی در ناحیه D-Loop ژنوم میتوکندری با بیماری FAP را نشان داد. بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر، می‌توان استنباط کرد که پلی‌مورفیسم‌های به دست آمده از ناحیه D-loop، نقش موثری در افزایش خطر ابتلاء به بیماری FAP دارد. کاربرد شناسایی پلی‌مورفیسم‌های mtDNA برای پیش‌بینی خطرات سرطان ناشی از عوامل مختلف محیطی، زمینه امیدوارکننده‌ای برای پیش‌گیری از سرطان در آینده است و هم‌چنین به اصلاح تصمیم‌های درمانی برای این بیماران کمک می‌کند. با این حال، انجام تحقیقات بعدی می‌تواند راه‌هایی را برای مطالعه و مقایسه سطوح بیان، ویژگی‌های پروتئین‌های سنتز شده و تقابل ژن‌های کدکننده میتوکندری با ناحیه غیر کدکننده D-loop مطرح نماید.

تشکر و قدردانی

از همه بیماران و کادر درمان بیمارستان امام خمینی (ره) تهران که همکاری‌های بی‌دریغ و دل‌سوزانه‌ای جهت تهیه نمونه خون بیماران داشتند، کمال تشکر را داریم. هم‌چنین از معاونت پژوهشی دانشگاه یزد جهت همکاری در اخذ کد اخلاق و حمایت‌های مادی و معنوی از این تحقیق، قدردانی می‌کنیم.

References

[1] Biondi A, Basile F, Vacante M. Familial adenomatous polyposis and changes in the gut microbiota: New insights into colorectal cancer carcinogenesis. *World J Gastrointest Oncol* 2021;13(6):495.

[2] Talseth-Palmer BA. The genetic basis of colonic adenomatous polyposis syndromes. *Hered Cancer Clin Pract* 2017;15(1):1-7.

[3] Sawicki T, Ruszkowska M, Danielewicz A, Niedźwiedzka E, Arłukowicz T, Przybyłowicz

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-09-05]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1401.21.12.7.6]
[DOI: 10.52547/jrums.21.12.1307]

KE. A review of colorectal cancer in terms of epidemiology, risk factors ,development, symptoms and diagnosis. *Cancers* 2021;13(9):2025.

[4] de Oliveira JC, Viana DV, Zanardo C, Santos EM, de Paula AE, Palmero EI, et al. Genotype-phenotype correlation in 99 familial adenomatous polyposis patients: A prospective prevention protocol. *Cancer Med* 2019;8(5):2114-22.

[5] Ghadamyari F, Heidari MM, Zeinali S, Khatami M, Merat S, Bagherian H, et al. Mutational screening through comprehensive bioinformatics analysis to detect novel germline mutations in the APC gene in patients with familial adenomatous polyposis (FAP). *J. Clin. Lab. Anal* 2021;35(5):e23768.

[6] Hyer W, Cohen S, Attard T, Vila-Miravet V, Pienar C, Auth M, et al. Management of familial adenomatous polyposis in children and adolescents: position paper from the ESPGHAN Polyposis Working Group. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr* 2019;68(3):428-41.

[7] Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Role of cardiolipin in mitochondrial function and dynamics in health and disease :molecular and pharmacological aspects. Cells. 2019;8(7):728.

[8] Weinberg F, Ramnath N, Nagrath D. Reactive Oxygen Species in the Tumor Microenvironment: An Overview. *Cancers (Basel)* 2019;11.(۸)

[9] Fernandez-Vizarra E, Zeviani M. Mitochondrial disorders of the OXPHOS system. *FEBS Lett* 2021;595(8):1062-106.

[10] Hahn A, Zuryn S. Mitochondrial genome (mtDNA) mutations that generate reactive oxygen species. Antioxidants. 2019;8(9):392.

[11] Guo Z, Zhao S, Fan H, Du Y, Zhao Y, Wang G. Identification of sequence polymorphisms in the D-Loop region of mitochondrial DNA as a risk factor for colon cancer. Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal. 2016 Nov;27(6):4244-4245.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-09-05]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1401.21.12.7.6]
[DOI: 10.52547/jrums.21.12.1307]

[12] Harmon C, O'Farrelly C, Robinson MW. The immune consequences of lactate in the tumor microenvironment. Tumor Microenvironment: Molecular Players–Part A. 2020:113-24.

[13] Afkhami E, Heidari MM, Khatami M, Ghadamyari F, Dianatpour S. Detection of novel mitochondrial mutations in cytochrome C oxidase subunit 1 (COX1) in patients with familial adenomatous polyposis) FAP). Clin. Transl. *Oncol* 2020;22:908-18.

[14] Hertweck KL, Dasgupta S. The Landscape of mtDNA Modifications in Cancer: A Tale of Two Cities. *Front Oncol* 2017;7.

[15] Falkenberg M. Mitochondrial DNA replication in mammalian cells :overview of the pathway. *Essays Biochem* 2018;62(3):287-296.

[16] Fang H, Shen L, Chen T, He J, Ding Z, Wei J, et al. Cancer type-specific modulation of mitochondrial haplogroups in breast, colorectal and thyroid cancer. *BMC Cancer* 2010;10(1):421.

[17] O'Farrell N, Feighery R, Picardo S, Lynam-Lennon N, Biniecka M, McGarrigle S, et al. Changes in mitochondrial stability during the progression of the Barrett's esophagus disease sequence. *BMC Cancer* 2016;16(1):497.

[18] Williams JR. The Declaration of Helsinki and public health. Bull. World Health Organ. 2008; 86:650-2.

[19] Green MR, Sambrook J. Touchdown Polymerase Chain Reaction (PCR). Cold Spring Harb. *Protoc* 2018; 2018.(۵)

[20] Sivaraman B, Jeyasekaran G, Shakila RJ, Aanand S ,Sukumar D. Authentication of nine snapper species by single-strand conformation polymorphism (SSCP) and forensically informative nucleotide sequencing (FINS) methods. *Food Control* 2019;99:124-30.

[21] Kumar M, Sarma MK, Choudhury Y, Ghosh SK, Mondal R. Somatic Mutations in Circulating Cell-Free D-Loop Region of Mitochondrial DNA: A Study from North-East India. J. Med. Biol. *Eng Res & Rev* 2019;6(1):08-13.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-09-05]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1401.21.12.7.6]
[DOI: 10.52547/jrums.21.12.1307]

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-09-05]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1401.21.12.7.6]

[DOI: 10.52547/jrums.21.12.1307]

[22] Schubert AD, Broner EC, Agrawal N, London N, Pearson A, Gupta A, et al .Somatic mitochondrial mutation discovery using ultra-deep sequencing of the mitochondrial genome reveals spatial tumor heterogeneity in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 2020; 471:49-60.

[23] Chen K, Lu P, Beeraka NM, Sukocheva OA, Madhunapantula SV, Liu J, et al., editors. Mitochondrial mutations and mitoepigenetics: Focus on regulation of oxidative stress-induced responses in breast cancers. Semin. Cancer Biol; 2022: Elsevier.

[24] Kopinski PK, Singh LN, Zhang S, Lott MT, Wallace DC. Mitochondrial DNA variation and cancer. Nat. Rev. Cancer. 2021; 21(7): 431-45.

[25] Chintha R, Kaipa PR, Sekhar N, Hasan Q. Mitochondria and tumors: a new perspective. *Indian J Cancer* 2013; 50(3): 206-13.

[26] Afkhami E, Heidari M, Khatami M, Ghadamyari F, Dianatpour S. Detection of novel mitochondrial mutations in cytochrome C oxidase subunit 1 (COX1) in patients with familial adenomatous polyposis (FAP). *Clin Transl Oncol* 2019: 1-11.

[27] Ardakani ZS, Heidari MM, Khatami M, Sani MB. Association of Pathogenic Missense and Nonsense Mutations in Mitochondrial COII Gene with Familial Adenomatous Polyposis (FAP). *Int J Mol Cell Med* 2020; 9(4): 255.

[28] Filograna R, Mennuni M, Alsina D, Larsson NG. Mitochondrial DNA copy number in human disease: the more the better? *FEBS Lett* 2021; 595(8): 976-1002.

[29] Ebner S, Lang R, Mueller EE, Eder W, Oeller M, Moser A, et al. Mitochondrial haplogroups, control region polymorphisms and malignant melanoma: a study in middle European Caucasians. *PLoS One* 2011; 6(12).

[30] Kassem AM, El-Guendy N, Tantawy M, Abdelhady H, El-Ghor A, Abdel Wahab AH. Mutational hotspots in the mitochondrial D-loop region of cancerous and precancerous colorectal lesions in Egyptian patients. *DNA Cell Biol* 2011; 30(11): 899-906.

[31] Sreedhar A, Aguilera-Aguirre L, Singh KK. Mitochondria in skin health, aging, and disease. *Cell Death Dis* 2020; 11(6): 444.

[32] Katerji M, Filippova M, Duerksen-Hughes P. Approaches and methods to measure oxidative stress in clinical samples: Research applications in the cancer field. *Oxid Med Cell Longev* 2019;2019.

[33] Kim HR, Kang M-G, Lee YE, Na BR, Noh MS, Yang SH, et al. Spectrum of mitochondrial genome instability and implication of mitochondrial haplogroups in Korean patients with acute myeloid leukemia. *Blood Research* 2018;53(3):240.

[34] Wallace DC, Chalkia D. Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. Cold Spring Harb. *Perspect Biol* 2013; 5(11): a021220.

[35] Brandon MC, Lott MT, Nguyen KC, Spolim S, Navathe SB, Baldi P, et al. MITOMAP: a human mitochondrial genome database—2004 update. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(suppl_1): D611-D3.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-09-05]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1401.21.12.7.6]
[DOI: 10.52547/jrums.21.12.1307]

Genetic Analysis of D-Loop Region of Mitochondrial DNA Sequence in Iranian Patients with Familial Adenomatous Polyposis (FAP): A Case-Control Study

Mohammad Mehdi Heidari[1], Elham Afkhami[2], Mehri Khatami[3], Farzaneh Ghasemi[4]

Received: 30/10/22 Sent for Revision: 17/01/23 Received Revised Manuscript: 01/03/23 Accepted: 04/03/23

Background and Objectives: Familial adenomatous polyposis (FAP) is an inherited disorder and a rare form of colorectal cancer. This disease appears equally in both sexes and its occurrence is more in the second or third decade of life. Mutations and alterations of the mitochondrial genome, especially the D-loop region, have been reported in various human tumors. But the exact role of these mutations in the pathogenesis and progression of tumors is still unclear. The purpose of the present study was to investigate the occurrence of mtDNA nucleotide mutations in the D-loop region, especially the hypervariable regions (HVR) in FAP patients.

Materials and Methods: In this case-control study, 56 FAP patients were investigated for mutations in the mitochondrial D-loop region by Touchdown PCR, single-stranded conformation polymorphism (SSCP), and sequencing analysis. Fisher's exact statistical tool was used to find the relationship between these nucleotide changes and the risk of FAP disease.

Results: Nineteen nucleotide changes were identified in the D-loop region of patients with FAP symptoms. Two of these nucleotide changes (C16335T and C16352T) were novel and not previously reported in any disease. The results of the statistical analysis of observed mutations showed a statistically significant difference between the patient's group and the control group ($p<0.05$).

Conclusion: The findings of this study indicate a positive correlation of mtDNA mutations in the D-loop region in all FAP cases compared to the matched control groups. Therefore, the mutation in mitochondrial non-coding sequences may lead to the production of defective proteins in the respiratory chain by affecting the expression process of mitochondrial genes.

Key words: Mitochondrial DNA, D-loop, Malignancy, Colorectal cancer, Familial adenomatous polyposis

Funding: This study was funded by Yazd University, Yazd, Iran.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Yazd University approved the study (IR.YAZD.REC.1401.053).

How to cite this article: Heidari Mohammad Mehdi, Afkhami Elham, Khatami Mehri, Ghasemi Farzaneh. Genetic Analysis of D-Loop Region of Mitochondrial DNA Sequence in Iranian Patients with Familial Adenomatous Polyposis (FAP): A Case-Control Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2023; 21 (12): 1307-22. [Farsi]

1- Associate Prof. of Molecular Genetics, Dept. of Biology, Yazd University, Yazd, Iran, ORCID: 0000-0002-3328-4746
(Corresponding Author) Tel: (035) 31233381, Fax: (035) 38210644, E-mail: heidarimm@yazd.ac.ir
2- MSc, Genetics, Yazd University, Yazd, Iran
3- Associate Prof. of Molecular Genetics, Dept. of Biology, Yazd University, Yazd, Iran
4- MSc, Genetics, Yazd University, Yazd, Iran

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-09-05]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1401.21.12.7.6]
[DOI: 10.52547/jrums.21.12.1307]