مدیریت تحصیلات تکمیلی

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پردیس خودگردان

پایان‌نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته ژنتیک

بررسی بیان ژن پروستاگلاندین اندوپروکسید سنتتاز ۲ (COX-2) در سرطان مری

استاد راهنما:

دکتر غلامرضا مطلب

دکتر حمیدرضا میری

استاد مشاور:

دکتر شهلا نجفی

تهیه و تدوین:

سمانه کیقبادی

مهر۱۳۹۳

تقدیم به:

اثر حاضر را با احترام تقدیم می نمایم به :

پدر بزرگوارم و مادری که از او متولد شدم و سر آغاز زندگی من است روحش شاد و مادری که از او جاودانه گشتم .

فرشتگانی که از خواسته هایشان گذشته سختی ها را به جان خریدند و خود را سپر بلای مشکلات و ناملایمات کردند تا به جایگاهی که اکنون در آن ایستادم برسم که هر چه آموختم در مکتب عشق شما آموختم و هر چه بکوشم قطره ای از دریای بی کران مهربانیان را سپاس نتوانم بگویم . امروز هستی ام به امید شماست و فردا کلید باغ بهشتم رضای شما.

گران سنگ تر از این ارزان نداشتم تا به خاک پایتان نثار کنم باشد که حاصل تلاشم نسیم گونه ی غبار خستگیتان را بزداید بوسه بر دستان پر مهرتان .

سبزترین نگاه زندگیم همسر مهربانم .

که مسیح وار با صبرش در تمامی لحظات زندگی رفیق راه من بود و لبخندش سایه ساز زندگی می باشد با هم آغاز کردیم در کنار هم آموختیم و به امید هم به آینده چشم می دوزیم .

استاد بزرگوار و ارجمندم جناب آقای دکتر غلامرضا مطلب .

که با دلاویز و گفته های بلند، صحیفه های سخن را به من آموخت و همواره راه گشای نگارنده اند.

به خواهر و برادر عزیز تر از جانم سارا و سجاد.

قلم لبریز از عشق به شماست و خوشبختی تان منتهای آرزویم .

دلبندانم امید بخش جانم که آسایش آنها آرامش من است.

گل نازم آیناز جان که کودکی گمشده ام را در چهره معصومش پیدا کردم و طراوت زندگی ام پسرم محمد آراد.

تشکر و قدردانی

سپاس خاضعانه به پیشگاه ایزد منان

با سپاس از سر و جود مقدس :

آنان که ناتوان شدند تا ما به توانایی برسیم . موهایشان سپید شد تا رو سفید شویم و عاشقانه سوختند تا گرما بخش وجود ما و روشنگر راهمان باشند . پدرانمان مادرانمان استادانمان .

بر حسب وظیفه و به رسم ادب خود را ملزم میدارم که صمیمانه ترین سپاسهایم را به محضر استاد راهنمای ارجمندم جناب آقای دکتر غلامرضا مطلب تقدیم دارم . چراکه در این عرصه از هیچ کمکی بر من دریغ ننموده اند و به من تفکر و عقل ؛ فداکاری و شجاعت را آموختند .

بر خود لازم می دارم مراتب قدردانی و سپاس خود را به استاد راهنایم جناب آقای دکتر حمیدرضا میری برای تمام خوبیهایش ابراز دارم امید دارم دارم خداوند همیشه یار و یاور این عزیز باشد.

از استاد مشاورم سرکار خانم دکتر شهلا بخشی که مشاور این پایان نامه را به عهده گرفتند نهایت تشکر و قدردانی را دارم .

این تحقیق در پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه زابل اجرا و به پایان رسید و در اینجا لازم می دارم از ریاست محترم پژوهشکده جناب آقای دکتر سید کاظم صباغ کمال قدردانی را داشته باشم .

از کارشناس محترم و دوست عزیزم سرکار خانم حمیده خواجه به خاطر لطف و همکاریشان در انجام این امر نهایت تشکر و امتنان را دارم .

از دوست و همکار گرانبهایم سرکار خانم عصمت پودینه که همواره پشتیبانم بودند همیشه قدرشناس این عزیز هستم .

از تمامی دوستان و همکاران و عزیزانی که در انجام این مهم مرا همراهی کردند کمال سپاس و قدردانی را دارم .

چکیده

سرطان سومین عامل مرگ در ایران است و سالانه حدود ۳۰ هزار نفر در ایران بر اثر ابتلا به انواع سرطان جان خود را از دست می دهند. سرطان مری یا esophagus cancer در بین سرطان ها رتبه ششم از نظر شیوع و از نظر مرگ و میر در رتبه نهم سرطان ها دارد. هدف از این مطالعه ارزیابی بررسی بیان ژن پروستاگلاندین اندوپروکسید سنتتاز ۲ (COX-2) در سرطان مری می باشد. COX ها (cyclo-oxygenases)، COX-1 و COX-2، آنزیم های نظارتی کلیدی دخیل در تولید پروستاگلاندین ها و دیگر پروستانوئیدها هستند. پروستاگلاندین ها عوامل واسطه ای مهم در فرآیندهای مختلف طبیعی بیولوژیکی از جمله عملکرد سیستم ایمنی و زیست شناسی تولید مثل به شمار می روند. بیان اغراق آمیز COX-2 دارای پیامدهای قابل توجهی است که مختص بافت می باشند و با بیماری های التهابی، سرطان(Williams and et al., 1999) و بیماری های شروع دوره و زایمان زودرس نیز در ارتباط است، به این ترتیب COX-2 یک هدف مهم برای مداخله دارویی است. در این تحقیق بیان ژن COX-2 در بیماران مبتلا به سرطان مری در ایران مورد مطالعه قرار گرفت ۱۵ نمونه بافت پارافینه سرطان مری و ۱۵ نمونه پارافینه سالم جمع آوری شده از مراکز مختلف پزشکی درمانی(زابل و کاشان) جهت اندازه گیری بیان ژنCOX-2 توسط روش – Reverse transcriptase real time polymerase chain reaction آنالیز گردید. تمامی واکنش های PCR با سه تکرار برای ژنCOX-2 و کنترل داخلی (B- actin) توسط متد(Livac) $2^{-\Delta\Delta ct}$ انجام شد. تفاوت در بیان ژن هدف در بیماران و گروه کنترل با استفاده از مدل PFAFFL و آزمون مقایسه میانگین ANOVA توسط نرم افزار $SPSS_{16}$ انجام گرفت. نتایج نشان داد افزایش معنی داری در بیان ژن پروستاگلاندین اندوپروکسید سنتتاز ۲ (COX-2)در بافت های سرطانی مری نسبت به نمونه های شاهد وجود داشت. همچنین اختلاف معنی داری در بیان ژن Cox-2 بین دو جنس زن و مرد در دو گروه سالم و بیمار نشان نداد.

کلمات کلیدی: سرطان مری، Real tim PCR، ژن پروستاگلاندین اندوپروکسید سنتتاز ۲(COX-2)

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول : مقدمه و کلیات

۱-۱- سرطان مری ۲

۱-۲- انواع سرطان مری ۴

۱-۳- علل ایجاد سرطان مری..... ۵

۱-۳-۱- علل ژنتیکی ۶

۱-۴- ژن COX2 ..... ۸

۱-۴-۱- تنظیم رونویسی COX-2 ..... ۱۲

۱-۴-۲- تنظیم پس از رونویسی COX2 از طریق 3’-UTR آن..... ۱۳

۱-۴-۳- COX-2 3′-UTRs: COX-2 3′-UTR ،(microRNAs) miRNAs: پلی ادنیلاسیون جایگزین ۱۴

۱-۴-۴- روشهای بررسی بیان ژن COX-2 ..... ۱۵

۱-۵- Real time polymerase chain reaction.....۱۶

۱-۶- مزایای روش qPCR..... ۱۸

۱-۶-۱- روشهای سنجش بیان ژن با qPCR ۱۸

۱-۶-۲- روشهای غیراختصاصی..... ۱۸

۱-۶-۳- آنالیز منحنی ذوب..... ۱۹

۱-۶-۴- روشهای اختصاصی..... ۲۰

۱-۶-۵- پروبهای هیدرولیز شونده ۲۰

۱-۶-۶- پروب تگمن ۲۱

۱-۶-۷- بایکونهای مولکولی ۲۲

۱-۶-۸- پروب اسکورپیون ۲۲

۱-۶-۹- پروب‌های هیبریداسیونی ۲۳

۱-۶-۱۰- پرایمرهای Sunrise ۲۳

۱-۶-۱۱- پرایمرهای LUX ۲۳

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۱۲-۶-۱- روشهای تعیین کمیت با qPCR ۲۵

۱۳-۶-۱- بازدهی واکنش تکثیر ۲۵

۱۴-۶-۱- روش تعیین کمیت نسبی ۲۶

۱۵ -۶-۱-روش $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ۲۷

۱۶-۶-۱- روش Pfaffl ۲۸

فصل دوم: مروری بر مطالعات صورت گرفته

۱-۲- مطالعات انجام شده بر روی بیان ژن COX-2 ..... ۳۰

۲-۲- مطالعات انجام شده بر روی سرطان مری ۳۳

فصل سوم: روش تحقیق

۱-۳- زمان و مکان آزمایش تحقیق ۳۷

۲-۳-تهیه نمونه ۳۷

۳-۳- استخراج RNA از بافت پارافینه ۳۷

۴-۳- بررسی کیفیت و کمیت RNA ۳۷

۵-۳- ساخت cDNA ۴۰

۶-۳- طراحی پرایمر ۴۰

۷-۳- PCR گرادیانت برای پرایمرهای طراحی شده ۴۲

۸-۳- بازده واکنش qPCR ۴۵

۹-۳- بهینه سازی شرایط Real time PCR ۴۶

۱۰-۳- روش های آماری ۴۸

فصل چهارم: نتایج و بحث

۱-۴- نمونه گیری و اطلاعات بیماران: ۵۰

۲-۴- نتایج بررسی کمیت و کیفیت RNA های استخراج شده از بافتهای پارافینه ۵۱

۳-۴- نتایج حاصل از تعیین کمیت cDNA توسط نانودراپ اسپکتروفتومتری ۵۲

۴-۴- نتایج PCR گرادیانت برای تعیین دمای مطلوب اتصال پرایمرهای beta actin و COX-2 ..... ۵۳

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۵-۴- نتایج تعیین بازدهی واکنش qPCR ۵۶

۱-۵-۴- نتایج تعیین بازده واکنش qPCR مربوط به پرایمر BETA ACTIN ۵۶

۲-۵-۴- نتایج تعیین بازده واکنش qPCR مربوط به پرایمر COX-2 ..... ۵۷

۶-۴- نتایج حاصل از انجام واکنش qPCR برای نمونهها ۵۹

۷-۴- نتایج آنالیز آماری محاسبه کمی تغییرات بیان ژن COX-2 در نمونه های بافت سرطان مری انسان ۶۱

بحث ۶۳

پیشنهادات ۶۸

منابع ۶۷

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۳- مخلوط اول جهت ساختن cDNA ۴۱

جدول ۲-۳- مخلوط دوم جهت ساختن cDNA..... ۴۱

جدول ۳-۳- مشخصات آغازگرهای ژن COX-2..... ۴۳

جدول ۴-۳- مشخصات آغازگرهای ژن مرجع ۴۳

جدول ۵-۳ ترکیب مواد مورد استفاده در واکنش PCR..... ۴۳

جدول ۶-۳- مراحل دما و زمانهای مورد استفاده در واکنش PCR ۴۴

جدول ۱-۴ فراوانی در صد مردان و زنان شرکت کننده در مطالعه در دو گروه بیمار و کنترل ۵۰

جدول ۲-۴-دمای مناسب مرحله اتصال دو جفت پرایمر بتا اکتین و COX-2 بر اساس گرادیانت دمایی ۵۴

جدول ۳-۴- تعیین بازده واکنش qPCR مربوط به پرایمر B- ACTIN ۵۶

جدول ۴-۴- تعیین بازده واکنش qPCR مربوط به پرایمر COX-2 ..... ۵۷

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- بر گرفته از سایت http://www. arthritis. co. za/cox. html ۱۱
شکل ۲-۱- موقعیت ژن COX-2 بر روی کروموزوم شماره یک انسان. ۱۱
شکل ۳-۱- COX-1 و COX-2 و نقش مهم آن در فرایند ساخت پروستاگلاندین ها ۱۲
شکل ۴-۱- نمودار تکثیر واکنش qPCR. نمودار تکثیر (Dorak, 2007) ۱۷
شکل ۳-۱ روش‌های سنجش بیان ژن توسط qPCR ۲۴
شکل ۱-۳- دستگاه PCR مورد استفاده جهت بهینه سازی شرایط واکنش PCR ۴۵
شکل۲-۳- دستگاه Rotor gene ۴۸
شکل۱-۴- نانودراپ نمونه ای از RNAهای استخراج شده ۵۱
شکل۲-۴- نمونه RNA تام استخراج شده از نمونه های کنترل و بیمار بر روی ژل ۱/۵٪ ۵۲
شکل۳-۴- نمونه ای از نتایج کیفیت و کمیتcDNA سنتز شده با استفاده از نانودراپ ۵۳
شکل۴-۴- ژل محصول PCR با گرادیانت دمایی مربوط به ژن بتااکتین در مطالعه‌ی حاضر ۵۴
شکل ۵-۴- ژل محصول PCR با گرادیانت دمایی مربوط به ژن COX2 ..... ۵۵
شکل ۶-۴- محل نشستن پرایمرهای فوروارد و ریورس ژن COX-2 در آزمایش حاضر. ۵۵
شکل ۷-۴ مقادیر C_t (a) و نمودار استاندارد (b) مربوط به ژن BETA ACTIN بعد از تهیه‌ی رقت‌های متوالی ۵۷
شکل ۸-۴- مقادیر C_t (a) و نمودار استاندارد (b) مربوط به ژن COX-2 بعد از تهیه رقت‌های متوالی ۵۸
شکل ۹-۴- نمونه‌ای از منحنی های ذوب مربوط به ژن های Beta actin و COX-2 انسانی و نمودار درجه دوم حاصل مشتق گیری از آن ۵۹
شکل۱۰- ۴- نمونه ای از منحنی تکثیر مربوط به نمونه‌های ژن |Beta actin و COX2 ..... ۶۰
شکل ۱۱-۴- محصول تکثیر ژن بتا اکتین بر روی ژل اگارز در واکنش Real time PCR ۶۰
شکل۲ ۱-۴- محصول تکثیر ژن cox-2 بر روی ژل اگارز در واکنش Real time PCR ۶۱
شکل ۱۳-۴ نمودار بیان نسبی ژن COX-2 در نمونه های بافت پارافینه سرطان مری در مقایسه با نمونه های سالم ۶۲

فصل اول

مقدمه

۱-۱- سرطان مری

سرطان سومین عامل مرگ در ایران است و سالانه حدود ۳۰ هزار نفر در ایران بر اثر ابتلا بـه انـواع سـرطان جان خود را از دست می دهند (Pourhoseingholi *et al*., 2013).

میزان مرگ و میر ناشی از سرطان مری در سال، از حـدود ۳ در ۱۰۵ نفـر سـال در سـفید پوسـتان ایـالات متحده آمریکا تا بیش از ۱۰۰ در ۱۰۵ نفر سال در برخی از نواحی چـین متغیـر اسـت. ایـن سـرطان بـه انـواع گوناگونی تقسیم می شود که دو نوع کارسینوم سلول سنگفرشی مری (ESCC)[۱] و آدنوکارسینوم مری (EAC)[۲] آن بسیار رایج است.

HNSCC[۳] برای ٪۵ تمام سرطان ها در کشورهای صنعتی حساب می شود و سرعت شیوع جهانی ۵۰۰۰۰۰ مورد جدید در هر سال رادارد(Parkin *et al*., 1990). تا یک دوم تمام HNSCC ها در حفـره دهـان اتفـاق مـی افتد. سرطان فلسی سلولی زبان متداول ترین تومر بدخیم درون دهان است که استفاده از الکـل و تنبـاکو مهـم ترین عوامل ابتلا مـی باشـد (Spitz *et al*., 1998; Schottenfeld, 1996; Merletti *et al*., 1998). تقریبـا ٪۵۰ این سرطان ها با درمان اصولی جراحی درمان می شوند ولی شناسایی موارد با احتمال بالای برگشت یک مسئله اصلی در مدیریت بالینی بیماری می باشد. در حال حاضر، مرحله گره لنف دقیق ترین پـیش بینـی از بازگشـت بیماری است(Spiro, 1974). در هر حال، با فهم روزافزون از بیولوژی بیماری، علائم پیش بینی کننده مولکـولی از بازگشت موضعی و نرخ بهبودی کاهش یافته احتمالا از مزایای شناسایی بیماران مناسـب بـرای درمـان هـای شدیدتر است. اکنون به خوبی طرح شده است که تعدادی از انکوژن ها و ژن های سرکوب کننده تومر بـا نقـش

[1] Esophageal Squamous Cell Carcinoma
[2] Esophageal Adenocarcinoma
[۳] HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma; pRb, retinoblastoma gene product; Cdk, cyclin-dependent kinase.

هایی در کنترل چرخه سلولی، طی ارزیابی سرطان های انسانی مختلف نابجا القا شده یا غیرفعال می شوند (Sherr, 1996; Hunter and Pines, 1994).

سرطان مری به دو شکل عمده " سرطان سلول سنگفرشی و آدنوکارسینوما " دیده می‌شود (Rice and Blackstone, 2013).

سرطان سلول سنگفرشی در سلول‌های سنگفرشی پوشش دهنده مری، ایجاد می‌شود. این سرطان‌ها معمولاً در قسمت فوقانی و میانی مری رخ می‌دهند. آدنوکارسینوما معمولاً در بافت غده‌ای در قسمت تحتانی مری رخ می‌دهد.

درمان سرطان مری از مشکل ترین چالش های درمانی از دیدگاه جراحی و انکولوژی است و درمورد درمان مناسب اتفاق نظر وجود ندارد. گرچه جراحی یکی از درمان های اصلی کارسینومای مری محسوب میشود اما میزان بقای کلی با جراحی به تنهایی ضعیف بوده است و نتایج رادیوتراپی تنها نیز در بسیاری از مطالعات نامطلوب بوده است. بقاء ۵ ساله بیمارانی که با رادیوتراپی تنها درمان شده اند، در، حد صفر تا ده درصد بوده است و ترکیب رادیوتراپی و جراحی نیز نتوانست باعث بهبود در بقاء بیماران شود (Kinner, 2006).

درمان هر دو نوع سرطان مری مشابه هم می‌باشد. اگر سرطان به خارج از مری انتشار یابد ابتدا به عقده‌های لنفاوی، انتشار پیدا می‌کند. هم چنین سرطان مری تقریباً در تمام قسمت های بدن شامل کبد، ریه‌ها، مغز و استخوان‌ها انتشار می‌یابد. این سرطان دارای ۴ مرحله است که معمولاً در مرحله ۴ که به آن End stage میگویند سلولهای سرطانی به نقاط دیگر بدن متاستاز می‌دهد. در مرحله ۱ تا ۳ امکان بهبودی بیمار بالاست (Keditsu *et al*., 2013).

سرطان مری یا *esophagus cancer* در بین سرطان ها رتبه ششم از نظر شیوع و از نظر مرگ و میر در رتبه نهم سرطان ها دارد (Jobe *et al*., 2009). تعداد مبتلایان به این بیماری در سال گذشته نزدیک ۵۰۰ هزار نفر

در سراسر جهان بوده است. میزان ابتلا به این بیماری در مردان ۷/۸ و در زنان ۱/۸ ابتلا در هر صد هزار نفر است. الکل و دخانیات از عوامل اثبات شده ابتلا به این تومور در سرتاسر جهان است (Jobe *et al*., 2009).

برخلاف دیگر کشورها، در ایران زنان بیشتر به این سرطان مبتلا می گردند و متاسفانه آمار داخلی حاکی است که مبتلایان در کشور از نقطه نظر درمانی یکی از پایین ترین سرطان ها را داراست و میزان بقای ۵ ساله آنها کمتر از ۱۰ درصد است (مقیمی دهکردی و همکاران ۱۳۸۷).

یکی از عواملی که در بسیاری از مناطق جهان از جمله شمال کشور ایران علت squamous cell carcinoma SCC برشمرده می گردد سبک زندگی آنها بویژه مصرف نوشیدنی ها و چای بصورت داغ است(Hakim *et al*., 2000; Islami *et al*., 2009).

مصرف بیش از اندازه ویتامین B12 و کلسترول نیز نشان داده شده که ریسک ابتلا به این سرطان را افزایش می دهد(Tang *et al*., 2008). همچنین چاقی (obesity) با شاخص توده بدنی (BMI) بیش از ۲۵ نیز از عوامل مهم ابتلا به سرطان مری می باشد. میانگین سنی مبتلا به این سرطان در جهان ۶۹ سال می باشد(Kinner, 2006).

۲-۱- انواع سرطان مری

مطالعات گسترده اپیدمیولوژیک نشان می دهد که فراوانی تجمعی تومورهای اپی تلیال مری شامل سرطان سلول سنگفرشی (Squamous Cell Carcinoma) و آدنوکارسینوم (AdenoCarcinoma) سیر صعودی دارند که مربوط به افزایش بروز AC[۱] است. به طوری که امروزه در بسیاری از مناطق شیوع و بروز ESCC[۲] **و** EAC[۳]

[۱] Adenocarcinoma cancer

[۲] Esophageal squamous cell carcinoma

[۳] Esophageal Adenocarcinoma cancer

مساوی شده است. در حالی که تا سال ۱۹۶۰ بیشتر از ۹۰ درصد تومورهای مری SCCتشکیل می داد. (Gallo and Cha, 2006; Holmes and Vaughan, 2007).

مشخصهٔ اصلی سرطان مری، پیشرفت سریع و پیش آگهی بد در بیشتر بیماران است. بروز آن با افزایش سن بیشتر می شود به طوری که بیشترین شیوع در سن ۵۰ تا ۷۰ سالگی می باشد. این بیماری در مردان شایعتر از زنان است، هر چند در مناطق مختلف نسبت آن متفاوت است(Kollarova *et al*., 2007).

براساس داده های موجود بیشترین بروز سرطان مری در بعضی مناطق آسیا و افریقا و کشور ایران اتفاق می افتد. در این مناطق که به عنوان مناطق با بروز بالا شناخته می شوند همچنان SCC مری بسیار بیشتر از آدنو کارسینوم اتفاق می افتد. (Mosavi-Jarrahi and Mohagheghi, 2006) بسیاری از تحقیقات نشان داده اند که افزایش بروز آدنوکارسینوم مری احتمالا ناشی از کاهش شیوع عفونت با هلیکوباکترپیلوری است. تغییرات اپیدمیولوژیک در بروز و شیوع سرطان مری نشان می دهدکه عوامل محیطی در بروز این سرطان نقش مهمی بازی می کنند. با شناسایی عوامل خطر شاید بتوان با اقدامات پیشگیرانه این عوامل را تعدیل نمود و بروز و یا حداقل، عوارض سرطان مری را کم نمود(Li *et al*., 2007). بعضی مشاهدات بیان گر این موضوع بود که هلیکوباکترپیلوری با کلونیزه شدن در نواحی متاپلازی مری در ایجاد مری بارت و در نتیجه آدنوکارسینوم مری نقش بازی می کند هر چند در همان زمان بعضی دیگر از محققین این موضوع را تایید نکردند(Newton *et al*., 1997).

۳-۱- علل ایجاد سرطان مری

شاید بتوان این افزایش چشم گیر در آدنوکارسینوم مری(EAC)[۱] را توسط افزایش قابل توجه در مبتلایان به مری بارت (Barrett's esophagus) توضیح داد. آمار به دست آمده در ایالات متحده آمریکا حاکی از رشد ۴۶۰ درصدی در مردان سفید پوست و ۳۳۵ درصدی در زنان سفید پوست بین سالهای ۱۹۷۵ تا ۲۰۰۴ می باشد. این در حالی است که در کشورهای شرق آسیا و آسیای مرکزی از جمله ایران کارسینوم سلول سنگفرشی مری (ESCC)[۲] رایج تر است. (Kamangar *et al*., 2007) مطالعات انجام شده در ایران نشان دهنده میزان بالای خطر ابتلا به سرطان مر ی در نواحی ساحلی دریای خزر) شمال ایران است. هچنین مطالعات سال ۲۰۰۸ که در استان کرمان انجام گرفته است بیانگر افزایش ۱۱ درصدی خطر ابتلا به EAC در سال است. در حالی که خطر ابتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی مری (ESCC)کم و بیش ثابت بوده است (Kamangar *et al*., 2007; Xu, 2009).

این سرطان مانند سایر سرطان ها، حاصل مجموعه عامل ها ی محیطی و تغییرات ژنتیکی است. عامل های خطر در EAC و ESCC با هم متفاوت هستند. بر ای نمونه، عامل های محیطی و رژیم غذایی به شدت با کارسینوم سلول سنگفرشی مری (ESCC)در ارتباط هستند، درحالی که رفلاکس یا جریان برگشتی معدی کرر و واکنش های التها بی پس از آن مری بارت نقش بسیار مهمی در آدنوکارسینوم مری(EAC) بازی می کند. توقف مصرف الکل و تنباکو خطر ابتلا به سرطان را کاهش می دهد.

۱-۳-۱- علل ژنتیکی

[۱] Esophageal Adenocarcinoma cancer

[۲] Esophageal squamous cell carcinoma

رفلاکس معدی- مروی مزمن به عنوان مهم تر ین عامل تاثیرگذار در ایجاد آدنوکارسینوم مـری (EAC[1]) در نظر گرفته مـی شـود. روی هـم انباشـته شـدن خطاهـا ی کرومـوزوم ی ماننـد آنیوپلوییـدی و از دسـت رفـتن هتروزیگوسیتی تغییرات ژنتیکی ویژه و ناهنجاری های اپی ژنتیکی ژن های سرکوب گر تومور، مشـخص کننـده این بدخیمی می باشد. تغییرات دیگر شامل افزا یش فعالیت تلومراز و تغیرات اپی ژنتیکی مانند بیش متیله شدن است که در بخش ژنتیک مولکو لی بررسی شـده اسـت (An *et al*., 2005; Haghdoost et al., 2008; Holmes and Vaughan, 2007; Xu, 2009).

بر خلاف آدنوکارسینوم مری، عامل های خطر و ساز و کارهای متفاوت مولکو لی در ایجادESCC نقش دارنـد. نمونه های مرسومِ ژن های سرکوب گرِ تومور شاملRb وp53 است که مطالعات، نقش جهـش ایـن دو ژن را در مراحل آغاز ین ESCC نشان داده است. جهش در ژن BCL-2 که نقش ضد آپوپتو زی دارد، نیز مشاهده شـده است یکی از عامل ها ی تاثیرگذار کارکرد بر ژن های سرکوب گر تومور، ریز ماهواره ها هستند. پژوهش ها نشان داده است که تغییر در ریزماهواره ها یکی از عامل های مهم است که م ی تواند سلولهای طبیعی را به سـلولهایی نامیرا و نئوپلاستی تبدیل کند. بعضی از جایگاه های ریز ماهواره ها در نقاط داغِ در برخی از بـدخیمی‌هـا وجـود دارند. ژن های سرکوب گر تومور در نزدیکی این نقاط داغ قرار گرفته یکی از ساز و کارهایی است که در غیر فعال شدن ژن های سرکوب گر تومور نقـش دارد. (Gallo and Cha, 2006; Haghdoost *et al*., 2008; Upadhyay *et al*., 2009; Xu, 2009)

یکی از ساز و کارهای بسیار مهم در ایجاد نئوپلاسم، تغییرات اپی ژنتیک به ویژه متیله شـدن بازهـای ناحیـه پروموتور ژن است، که موجب غیر فعال شدن ژن های سرکوب گر تومور و تنظیم چرخه سلولی می شود. خاموش سازیی اپی ژنتیکی عامل های رونویسی نیز به فقدان بیان ژن منجر می شود. متیله شدن جزیره در ناحیـه پـیش برنده موجب خاموش شدن ژن های پایین دست که به عنوان سازوکار اپی ژنتیکی اصلی در غیر فعال شـدن ژن

[1] Esophageal Adenocarcinoma cancer

های سرکوب گر تومور شناخته می شود(Gallo and Cha, 2006; Holmes and Vaughan, 2007; Kawamori *et al*., 1998; Nguyen et al., 2009; Omer *et al*., 2012; Xu, 2009).

مطالعات ژنتیک مولکولی: مطالعات مولکولی سرطان مری، ناهنجاری های ژنتیکی را مانند دگرگونی در بیان ژن های P53، RAR، iNOS، COX-2، E-cadherin، EGFR، D سیکلین1 در NF-κB، TGTα، VEGF، c-MYC، APC، p21، ESCC hTERT و EAC نشان داده اند. در بسیاری از موارد دگرگونی های ژنتیکی معینی به طور مشترک در EAC و ESCC مشاهده شده است، اما در برخی از موارد بیان مکرر و نابه جای ژن ها در یکی از انواع سرطان مری بیش از نوع دیگر ذکر شده است. بیان ژن های تغییر یافته اغلب با عامل های خطر سرطان مری ارتباط نزدیکی دارد.

p53 از مهم ترین ژن های سرکوب کننده تومور است و کارکرد اولیه آن حفظ پایداری ژنتیکی انسان و ظرفیت ترمیم DNA است. میزان بروز جهش در P53 در هر دو نوع سرطان مری بالا گزارش شده است. مطالعه 98 نمونه SCC در بیمارستان های تهران بیا نگر جهش ژن در 50 درصد از تومورها می باشد (Ryan *et al*., 2001).

۴-۱- ژن COX2

COX ها (cyclo-oxygenases)، COX-1و COX-2، آنزیم های نظارتی کلیدی دخیل در تولید پروستاگلاندین ها و دیگر پروستانوئیدها هستند. پروستاگلاندین ها عوامل واسطه ای مهم در فرآیندهای مختلف طبیعی بیولوژیکی از جمله عملکرد سیستم ایمنی و زیست شناسی تولید مثل به شمار می روند. اگر چه COX-1 به طور فعال در بسیاری از بافت ها بیان شده است، بیان COX-2 نیاز به القا دارد، چون تنها در سطوح قابل اغماض در شرایط عادی فیزیولوژیکی (Mitchell and Warner,1999) وجود دارد.

بیان اغراق آمیز COX-2 دارای پیامدهای قابل توجهی است که مختص بافت می باشند و با بیماری های التهابی، سرطان(Williams and *et al*., 1999) و بیماری های شروع دوره و زایمان زودرس (Allport *et al*., 2001) نیز در ارتباط است، به این ترتیب COX-2 یک هدف مهم برای مداخله دارویی است. تلاش قابل توجهی

در زمینه تعریف مسیرهای کلیدی سیگنالینگ و مکانیسم های مولکولی صورت گرفته است که مسئول بیان بیش از حد پروتئین COX-2 می باشد.

سیکلواکسیژناز، آنزیم کلیدی در متابولیسم اسید آرشیدونیک است و بیوسنتز پروستاگلایدن h2 را کاتالیز می کند تنظیم رونویسی، فرایند اصلی در تنظیم بیانCOX2 می باشد. بیان بیش از حد آنزیم COX2 به فراوانی در سرطان های گوناگون، دیده شده است. به نظر می رسد که سهم COX2 در سرطان زایی و فنوتیپ بدخیم سلول های تومور، به توانایی های آن در افزایش تولید پروستاگلاندین ها، تبدیل عامل های پیش سرطانی به سرطان زا، مهار آپوپتوز، -افزایش رگ زایی، تعدیل التهاب و کارکرد سیستم ایمنی بدن و افزایش توان تهاجمی سلول تومور، مربوط باشد.(Fitzpatrick, 2004)

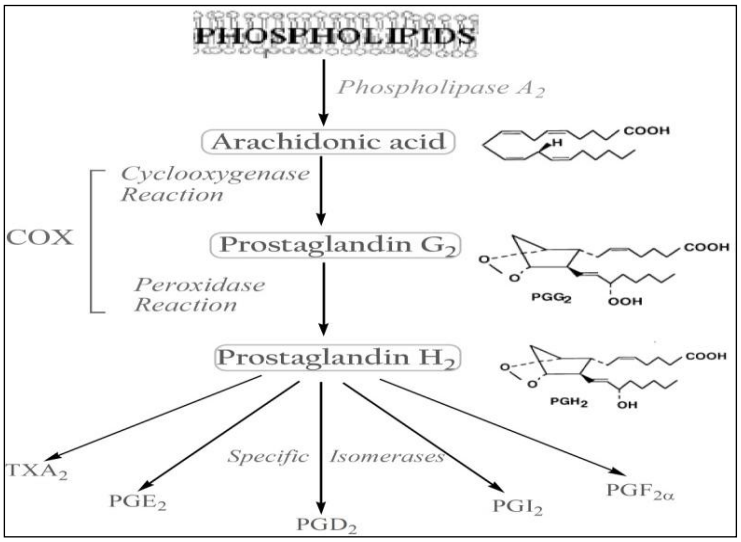
داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی (NSAIDs) با کاهش ریسک توسعه سرطان مری نقش مهمی در این زمینه ایفا می کنند. افزایش بیان COX-2 در مراحل مختلف این تومور گزارش شده است که در نهایت منجر به SCC یا ADC گردیده است. در مدل های حیوانی نشان داده شده که مهار کننده انتخابی COX-2 مانند سلکوکسیب celecoxib می تواند آسیب های اسید و پپسین معده را کاهش داده و از عارضه Barret's esophagus نیز جلوگیری کند (Haastrup *et al*., 2012).

COX-2 دارای نام های دیگری همچون prostaglandin Endoperoxide synthetase 2 (PTGS2) و سیکلواکسیژناز نیز است. COX-2 آنزیم کلیدی در بیوسنتز پروستوگلاندین‌ها است و فعالیت پراکسیدازی و هم دی اکسیژنازی دارد. COX-1 و COX-2 فعالیت مشابهی دارند ولی کاک بسیار تحریک پذیر بوده و همچنین بافتهای بیان کننده هر یک مجزا است(genecards. org).

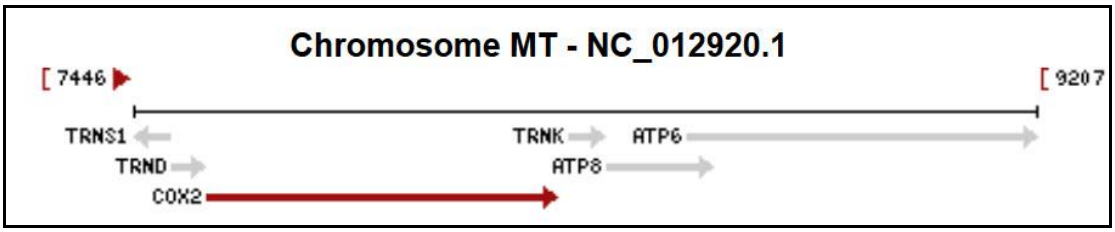
این ژن بر روی بازوی بلند کروموزم یک است و در منطقه 1 .31 قرار دارد. کوفاکتور این آنزیم آهن است. داروهای ضدالتهاب غیر استرویئدی مانند آسپرین این آنزیم را مهار می کنند. بیشترین بیان COX-2 در خون و بویژه در گلبول های سفید و پس از آن در عضلات صاف و کبد می باشد (genecards. org).

پروستاگلاندین ها که محصول آنزیم COX-2 هستند مواد شبه هورمونی هستند که ویژگی پیام رسانی اتوکراینی و پرارکراینی دارند و در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی نقش دارند. این مواد با گیرنده های G (G protein coupled receptors) افیشنسی بسیار بالایی دارند(genecards. org).

نزدیک ۱۰۰ سال از مصرف داروهای ضد التهاب غیر استرویيدی مانند ایبوبوروفن و سلکوکسیب می گذرد با اینحال در سال ۱۹۷۱ بود که مشخص گردید این داروها آنزیم COX-2 را هدف می گیرند(genecards. org).



شکل ۱-۱- بر گرفته از سایت http://www. arthritis. co. za/cox. html



شکل ۲-۱- موقعیت ژن COX-2 بر روی کروموزوم شماره یک انسان.