



دانشگاه شاهرود

دانشکده علوم پایه

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست‌شناسی گرایش ژنتیک

بررسی پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن p53 در زنان مبتلا به سرطان سینه در
استان آذربایجان شرقی با سیستم تکثیر متزلزل جهش‌ها (ARMS)

استادان راهنما:

دکتر راضیه پوراحمد

دکتر محمدعلی حسین پور فیضی

استادان مشاور:

مهندس ناصر پولادی

دکتر بهناز صفار

پژوهشگر:

ریحانه روانبخش گاوگانی

بهمن ماه ۱۳۸۹



دانشگاه شاهرود

دانشکده علوم پایه

پایان نامه خانم ریحانه روانبخش گاوگانی جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی گرایش ژنتیک با عنوان: بررسی بررسی پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن p53 در زنان مبتلا به سرطان سینه در استان آذربایجان شرقی با سیستم تکثیر متزلزل جهش‌ها (ARMS)

در تاریخ ۸۹/۱۱/۱۹ با حضور هیات داوران زیر بررسی و با نمره عالی مورد تصویب نهایی قرار گرفت.

۱. استاد راهنمای پایان نامه دکتر راضیه پوراحمد با مرتبه علمی استادیار امضاء

۲. استاد راهنمای پایان نامه دکتر محمدعلی حسین پورفیضی با مرتبه علمی استادتمام امضاء

۳. استاد مشاور پایان نامه مهندس ناصر پولادی با مرتبه علمی مربی امضاء

۴. استاد مشاور پایان نامه دکتر بهناز صفار با مرتبه علمی استادیار امضاء

۵. استاد داور داخلی گروه دکتر علی محمد احدی با مرتبه علمی استادیار امضاء

۶. استاد داور خارجی گروه دکتر هاشم زاده با مرتبه علمی استاد تمام امضاء

دکتر سمنانی

معاون پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشکده علوم پایه

تقدیم به

روان پاک دانشمند و ارسته، پدر ارجمندم

و

مادر مهربان و دلسوزم

کوهران بی‌همتای عالم، سازگان آسمان مروت و وفا، آنانکه روزگار درازی را در پروریدن من گذرانده اند و من مرکز نمی توانم به آن سان که سزاوار منزلت آنان است سوگندم را دریا بزم و مرکز نمی توانم حق

خداشن را آن چنان که باید به جای آورم

خواهرانم و برادر عزیزم

که چنانچه عمرم لبریز از صفا و صمیمیت و مهربانی آنهاست.

تقدیر و سپاس

منت خدای را که مرا فرصت داد تا بجویم، بیایم و جراتم داد تا بنویسم. الهی به توفیق و ارشاد خود تائیم کن و به نیت پاک و سخن پسندیده و کار شایسته یاری ام ده و سلامت دل‌های ما را در یاد عظمت و بزرگی ات، و آسایش تن ما را در شکر نعمت و نیروی زبانمان را در توصیف عطایت قرار ده.

بزرگترین افتخار شاگردی کوچک، به جای آوردن حق شاگردی است، سپاس و تقدیر بی کران از محضر اساتید بزرگوار و گرامی، جناب آقای دکتر محمد علی حسین پور فیضی و سرکار خانم دکتر راضیه پوراحمد، که بسیار چیزها که در طول تجربیات و کوشش‌های مداوم سالیان عمر آموخته بودند، با سعه صدر و رایگان به من هدیه کردند و مرا راهنما و معلم علم و اخلاق بودند تا علم را با ایمان و عمل پیوند بزنم. از اساتید مشاور پایان نامه، جناب آقای مهندس ناصر پولادی و سرکار خانم دکتر بهناز صفار بسیار سپاسگزارم که مرا از راهنمایی‌های بی دریغ خود در رسیدن به مقصد، بهره مند نمودند و مرا در انجام و گردآوری این پایان نامه یاری نمودند.

از مدیریت محترم گروه ژنتیک، جناب آقای علی محمد احدی که حق استادی بر گردن اینجانب داشته و افتخار کسب علم و ادب را در محضرشان داشته ام، و همچنین زحمت داوری و بازخوانی این پایان نامه را تقبل نموده و موجب پربار شدن آن شده اند تشکر می‌نمایم، و از جناب آقای دکتر هاشم زاده نیز که زحمت داوری پایان نامه را تقبل نموده اند کمال سپاس و تشکر را دارم.

همچنین از معاونت محترم تحصیلات تکمیلی، جناب آقای دکتر سمنانی و نیز نماینده تحصیلات تکمیلی، جناب آقای دکتر شایان پور، نهایت تشکر و قدردانی را می‌نمایم.

مراتب سپاس و قدردانی خود را بر محضر اساتید محترم، آقایان دکتر عمادی، مبینی و سرکار خانم دکتر آیت و دیگر اساتید دوره کارشناسی ارشد تقدیم می‌نمایم و از زحمات بی دریغ ایشان بسیار سپاسگزارم.

از جناب آقای دکتر وحید منتظری، جراح محترم بخش توراکس به دلیل در اختیار قرار دادن نمونه‌های سرطانی و همچنین از سرکار خانم دکتر حلیمی پاتولوژیست محترم تشکر و قدردانی می‌نمایم.

از همراهی اساتید و دوستان عزیزم در آزمایشگاه رادیوبیولوژی دانشگاه تبریز، خانم‌ها مهندس آذرفام، خدایی، خانی، رجحان نژاد، قنبریان، شیری و تقی زاده و آقایان حقی و عمرانی بی نهایت سپاسگزارم.

از دوستان و همکلاسی‌های گرامی ام در دانشگاه شهرکرد، خانم‌ها محمدی، مخبریان، ایلخانی زاده، شریفی راد و اسدی بسیار قدردانی می‌نمایم.

و به روان پاک پدرم درود می‌فرستم و بوسه می‌زنم بر دستان مادر مهربانم که والاترین انگیزه زندگی ام بودند و لحظه‌ای از همراهی من غافل نبودند و زندگی ام را مدیون ایشان هستم و همچنین از خواهرانم و برادر عزیزم که در طول پایان نامه مرا همراه بودند، کمال سپاس و تشکر را دارم.

و در پایان بسیار سپاسگزارم از بیمارانی، که سخاوتمندانه اجازه دادند از مازاد نمونه‌های توموری آنها در این پروژه استفاده کنیم و تمامی عزیزانی که مرا در انجام این پژوهش یاری دادند و اسامی آنها ذکر نشده است.

چکیده:

سرطان سینه شایع ترین سرطان در زنان جهان است و یک سوم از زنان سرطانی به این نوع سرطان مبتلا هستند. سرطان سینه با تغییرات ژنتیکی مانند جهش در ژنهای سرطان زا و ژن های سرکوبگر تومور مرتبط است. از مهمترین ژنهای سرکوبگر تومور درگیر در سرطان، ژن p53 می باشد. این ژن نقش مهمی در پایداری ژنومی دارد. موتاسیون در ژن p53، شایع ترین رویداد در سرطان های انسانی می باشد، و جهش این ژن در ۴۶-۱۶٪ از سرطان- های سینه دیده می شود. علاوه بر جهش، پلی مورفیسم های p53 به عنوان عامل خطر ساز برای ایجاد سرطان در نظر گرفته شده است. تغییرات نژادی و جغرافیایی در عملکرد پلی مورفیسم های ژن TP53 دخیل است. حداقل ۳۷ پلی مورفیسم در این ژن کشف شده است، که به طور معمول یکی از متداولترین آن ها پلی مورفیسم G به C در کدون ۷۲ می باشد. این پلی مورفیسم با افزایش خطر ابتلا به سرطان های زیادی از جمله سرطان های ریه، نازوفارنکس، دهان، پروستات و کولورکتال ارتباط دارد و شاید بتوان آن را به عنوان مارکر مستعد کننده به سرطان سینه در نظر گرفت. هدف از این تحقیق، بررسی پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن p53 در بیماران مبتلا به سرطان سینه در زنان استان آذربایجان شرقی بود.

در مطالعه موردی- شاهدی، ۱۲۶ بیمار مبتلا به سرطان سینه در گروههای سنی متفاوت و از هر دو نوع مهاجم و درجا و ۹۹ فرد سالم بعنوان کنترل از آذربایجان شرقی جمع آوری شدند. پس از استخراج DNA از خون این افراد، ژنوتیپ های مختلف کدون ۷۲ از ژن p53، با استفاده از سیستم تکثیر متزلزل جهش ها تعیین شدند و برای تأیید نتایج، توالی یابی DNA انجام گرفت. همچنین اگزون ۴ ژن p53، از لحاظ حضور جهش های احتمالی، توسط تکنیک بررسی تغییرات ساختاری تک رشته ای، مورد بررسی قرار گرفت. موارد مشکوک به حضور جهش، با استفاده از تکنیک توالی یابی DNA، بررسی شدند.

در گروه کنترل توزیع ژنوتیپی پلی مورفیسم ژن p53 برای ژنوتیپ های Arg/Pro، Arg/Arg، Pro/Pro، به ترتیب ۳/۳۰٪، ۵/۵۰٪، ۱۹/۲٪ بود. توزیع ژنوتیپ در گروه های سرطانی نیز به ترتیب ۴/۴۴ درصد، ۹/۳۴ درصد و ۶/۲۰ درصد بود. تفاوت معنی داری بین توزیع ژنوتیپ Arg/Arg ($p=0/04$) و Arg/Pro ($p=0/02$) در گروه کنترل و سرطانی دیده شد ($P<0/05$).

علاوه بر این، در بررسی حضور جهش های احتمالی در اگزون ۴ ژن p53، جهش چندگانه در یک بیمار یافت شد، که تا کنون گزارش نشده بود.

پژوهش حاضر نشان می دهد که پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن P53 یک عامل مستعدکننده برای ابتلاء به سرطان سینه در زنان آذربایجان شرقی می باشد، ولی برای تعیین نقش این پلی مورفیسم در خطر ابتلا به سرطان سینه لازم است مطالعات بیشتری صورت پذیرد.

واژگان کلیدی: پلی مورفیسم، ژن P53، سرطان سینه، مطالعه موردی-شاهد

فهرست مطالب

	عنوان	شماره صفحه
	مقدمه	
	فصل اول-ساختار پستان و بیماری های آن	
۹	۱-۱-مقدمه	
۹	۲-۱- جنین شناسی پستان	
۱۰	۳-۱- آناتومی پستان	
۱۰	۴-۱- ساختمان پستان	
۱۲	۵-۱- اختلالات و بیماری های پستان	
۱۲	۱-۵-۱- اختلالات التهابی و عفونی پستان	
۱۲	۲-۵-۱- اختلالات و بیماری های خوش خیم شایع پستان	
۱۳	۱-۲-۵-۱- تغییرات فیبروکیستیک	
۱۳	۲-۲-۵-۱- فیبروآدنوم	
۱۳	۳-۲-۵-۱- گشادی مجرا و التهاب اطراف مجاری	
۱۴	۴-۲-۵-۱- هایپرپلازی آتی پیک اپی تلیال	
۱۴	۵-۲-۵-۱- پاپیلوم داخل مجرای	
۱۴	۳-۵-۱- بیماری های بدخیم پستان (سرطان سینه)	
۱۴	۱-۳-۵-۱- اپیدمیولوژی سرطان سینه	
۱۷	۲-۳-۵-۱- سیر طبیعی سرطان سینه	
۱۸	۳-۳-۵-۱- طبقه بندی سرطان سینه	
۲۶	۴-۳-۵-۱- مرحله بندی تومور	
۲۷	۵-۳-۵-۱- فاکتور های خطر سرطان سینه	
۳۰	۶-۳-۵-۱- روش های تشخیصی عمده در سرطان سینه	
۳۰	۷-۳-۵-۱- چگونه می توان سرطان سینه را درمان کرد؟	
۳۱	۶-۱- ژنتیک سرطان سینه	
۳۱	۱-۶-۱- انکو ژن ها	
۳۳	۲-۶-۱- ژن های سرکوب گر تومور	
۳۳	۱-۲-۶-۱- BRCA1	
۳۵	۲-۲-۶-۱- BRCA2	
۳۶	۳-۲-۶-۱- p53	
	فصل دوم-مواد و روش ها	
۵۱	۱-۲- مشخصات تجهیزات و لوازم مورد استفاده	

۵۳	۲-۲- مواد مورد استفاده
۵۵	۳-۲- نمونه گیری
۵۶	۴-۲- استخراج DNA ژنومی
۵۶	۱-۴-۲- مواد لازم جهت استخراج DNA از خون کامل
۵۷	۲-۴-۲- استخراج DNA به روش پروتئیناز K (نمک اشباع) از خون
۵۸	۳-۴-۲- تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده
۵۹	۱-۳-۴-۲- روش اسپکتروفتومتری
۵۹	۲-۳-۴-۲- روش الکتروفورز روی ژل آگارز
۵۹	۵-۲- بررسی پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن p53
۶۰	۱-۵-۲- انجام PCR
۶۴	۲-۵-۲- سیستم تکثیر متزلزل جهش ها
۶۴	۱-۲-۵-۲- بهینه کردن PCR
۶۶	۲-۲-۵-۲- بافر های مورد نیاز در الکتروفورز
۶۷	۳-۲-۵-۲- تهیه ی ژل آگارز ۲ درصد و الکتروفورز محصولات PCR
۶۷	۴-۲-۵-۲- عکسبرداری از ژل
۶۸	۳-۵-۲- بررسی تغییرات ساختاری تک رشته ای (SSCP)
۶۸	۱-۳-۵-۲- تکنیک PCR-SSCP
۶۸	۲-۳-۵-۲- عوامل موثر بر SSCP
۶۹	۳-۳-۵-۲- تهیه ی بافر بارگذاری
۶۹	۴-۳-۵-۲- تهیه ی ژل آکریل آمید ۱۰ درصد
۷۰	۵-۳-۵-۲- الکتروفورز به روش SSCP
۷۰	۶-۳-۵-۲- رنگ آمیزی ژل به روش نترات نقره
۷۱	۷-۳-۵-۲- تفسیر نتایج SSCP
۷۱	۶-۲- تعیین توالی
۷۱	۷-۲- شیوه ی تجزیه و تحلیل داده ها

فصل سوم-نتایج

۷۲	۱-۳- مشخصات کلی بیماران مورد بررسی
۷۳	۲-۳- مشخصات کلی افراد سالم مورد بررسی
۷۳	۳-۳- تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراج شده
۷۳	۴-۳- بررسی نتایج حاصل از PCR-ARMS
۷۴	۵-۳- بررسی نتایج حاصل از PCR-SSCP
۷۶	۶-۳- توالی یابی
۷۹	۷-۳- نتایج به دست آمده در این مطالعه

فصل چهارم-بحث و نتیجه گیری

۹۰	۱-۴- اهمیت مطالعه ی سرطان سینه
۹۱	۲-۴- مشکلات تشخیصی سرطان سینه
۹۱	۳-۴- تفسیر نتایج حاصله و اهمیت آنها
۹۶	۴-۴- نتیجه گیری
۹۶	۵-۴- پیشنهادات

مقدمه :

سرطان چیست؟

سرطان، اختلال در کنترل رشد و تمایز سلولی می باشد. تعداد زیادی از سلول های بدن در طول زندگی رفتار و عمل طبیعی دارند. با توجه به فراوانی جهش ها، انتظار اشتباهاتی در هر ژن می رود که میلیون ها بار در طی زندگی اتفاق می افتد، و لذا مکانیسم های تنظیم سلولی باید واجد روند های تصحیح کننده مؤثر باشند. بروز سرطان پیامد عملکرد سلول ها می باشد. در نتیجه سرطان می تواند به علت اختلال در کنترل رشد و تمایز و عدم ایجاد تعادل صحیح بین سلول های بدن در طی زندگی، اتفاق بیافتد. سلول های سرطانی در یک زمان، به طور غیر عادی رشد کرده و به مناطق نابجای بدن مهاجرت می کنند که نشان دهنده اختلال در عملکرد و روند سلولی می باشد [۱]. سرطان شامل بیش از ۲۰۰ بیماری مختلف می باشد که در مجموع حدود یک چهارم مرگ و میر را در کشورهای صنعتی غرب به خود اختصاص می دهد. بروز و مرگ و میر اکثر سرطان ها با افزایش سن افزایش می یابند [۱].

سرطان های با منشاء اپی تلیال، کارسینوما نامیده می شود که شایع ترین نوع سرطان محسوب می شوند. این سرطان از نظر میزان بروز و مرگ ناشی از آن حائز اهمیت می باشند. از جمله آنها می توان سرطان ریه و روده بزرگ (کلون و رکتوم) در هر دو جنس (مرد و زن) و سرطان سینه در زنان و سرطان پروستات در مردان را اشاره کرد [۲].

در گذشته ویروس ها و مواجهه با عوامل محیطی چون تابش های یون ساز را در بیشتر سرطان ها، دخیل می دانستند. امروز معلوم شده است که یکی از علت های بنیادی، جهش های ژنی است. هر عامل سرطان-زایی، با ایجاد جهش عمل می کند. جهش های منتهی به سرطان، بر ژنهایی تأثیر می گذارند که مسئول تکثیر سلولی و سایر فعالیت های بنیادی سلول است. با ایجاد تغییر، رشد کنترل نشده آغاز می شود و تومور پدید می آید [۱]. علاوه بر جهش، عامل دیگر بروز سرطان پلی مورفیسم های ژنتیکی می باشد پلی مورفیسم اشاره به وجود تفاوت آلی در یک جایگاه ژنی دارد [۳]. این پلی مورفیسم ها عامل تفاوت افراد در داشتن صفات منحصر به فرد می باشد، و عامل استعداد افراد به بیماری، فراوانی سرطان در یک جمعیت، سن بروز سرطان در یک فرد یا پاسخ به درمان سرطان ها و همچنین برهمکنش با جهش های شناخته شده مستعد کننده بیماری می باشد [۴].

هفت علامت آگاه کننده که توسط انجمن سرطان امریکا بیان شده است، عبارتند از:

۱. تغییرات عادات دفع ادرار و مدفوع، سرطان پروستات، مثانه یا رکتوم را مطرح می کند.
۲. زخمی که التیام نمی یابد، ممکن است نشان از سرطان پوست و دهان باشد.
۳. خونریزی یا ترشح غیر معمول، می تواند از سرطان مثانه، دهانه رحم، ریه و رکتوم خبر دهد.
۴. توده یا سفتی در پستان ممکن است با سرطان سینه همراه باشد.
۵. سوء هاضمه یا مشکل بلع می تواند علامتی از سرطان معده، لوزالمعده، مری و حلق باشد.
۶. تغییر تازه در خال یا زگیل
۷. سرفه یا گرفتگی صدا، سرطان ریه و حنجره را مطرح می کند [۵].

بسیاری از دانش ما در زمینه مکانیسم های تنظیمی سلول طبیعی و نحوه ایجاد سلول سرطانی از مطالعه بر روی سلول های کشت شده بدست آمده است. در سال ۱۹۵۲ های-فلیک^۱ مشاهده کرد که سلول های پیکری طبیعی انسان در محیط های کشت، ظرفیت تقسیم محدودی داشته در مرحله ای به پیری^۲ روی می-آوردند. این نقطه را M1 می گویند [۶]. در ادامه این مرحله، درست زمانی که تصور می شود که سلول ها از بین رفته اند، تعدادی ناگهان رشد کرده و از مرحله بحرانی^۳ عبور می-کنند و تکثیر می شوند. عوامل مختلفی مانند بیان انکوژن های ویروسی یا بلوکه شدن ژنهای سرکوب گر تومور^۴، از جمله مهمترین آن ها p53، باعث به وجود آمدن سلول های نامیرای سرطانی می شود که با تلقیح به جانور آزمایشگاهی، ایجاد تومور می کند [۶].

سرطان سینه شایع ترین بدخیمی کشنده در زنان جهان است [۷]، به طوریکه یک سوم از زنان سرطانی به این نوع سرطان مبتلا هستند [۸]. در هر سال بیش از ۱۰۰۰۰۰۰ مورد جدید بیماری تشخیص داده می شود [۹]. شیوع و میزان مرگ و میر در اثر سرطان، در نژاد ها و موقعیت های جغرافیایی مختلف بسیار متفاوت است، به طوری که حداقل در آسیا به میزان ۴ برابر کمتر از آمریکای شمالی می باشد [۱۰]. در مجموع ۹۵٪ از سرطان های سینه، از بافت اپی تلیال آن منشاء می گیرد. کارسینومای سینه به دو گروه در جا^۵ و مهاجم^۶ تقسیم می شود [۱۱]. در نوع در جا، سلول های توموری فقط در مجاری یا لوبول ها وجود دارند و تهاجم به استرومای اطراف با میکروسکوپ نوری دیده نمی شود. نوع در جا خود به دو گروه لوبولار و مجرای تقسیم می شود. کارسینومای غیر مهاجم مجاری سینه، شایع ترین نوع سرطان غیر مهاجم پستان می باشد که بیشتر در سال های اولیه ی یائسگی دیده می شود. در این نوع کارسینوما، مجاری پستان درگیر بوده، اما سلول های سرطانی به بافت استرومای پستان گسترش نمی یابد. در نوع مهاجم، سلول های توموری به استرومای اطراف هجوم می برند که متاستاز و به دنبال آن مرگ بیمار رخ می دهد [۱۲]. کارسینومای مهاجم سینه به چند زیرگروه تقسیم می شود که شایع ترین نوع آن (۷۵-۸۰٪)، کارسینومای مجرای مهاجم است. این سرطان از مجاری شیری شروع شده و با گذشتن از دیواره ی مجرا، به بافت چربی پستان می رسد. در این مکان از طریق سیستم لنفاوی و عروق خونی می تواند به بخش های دیگر بدن متاستاز دهد. کارسینومای مجرای مهاجم براساس ویژگی های ساختمانی و سیتولوژیکی به سه درجه تمایز خوب یا درجه یک، تمایز متوسط یا درجه دو و تمایز ضعیف یا درجه سه تقسیم میشود [۱۳]. سرطان سینه با تغییرات ژنتیکی مانند جهش در ژنهای سرطانزا (انکوژن ها) و ژن های سرکوبگر تومور مرتبط است [۷].

ژن p53 برای اولین بار در سال ۱۹۷۹ توسط دو دانشمند به نامهای لان و کرافورد کشف شد [۱۴]. ژن p53 به عنوان مهمترین ژن سرکوبگر تومور از فرضیه دو ضربه ای نادسون پیروی می کند [۱۵]. ژن p53 دارای ۱۱ اگزون [۱۶]، به طول ۲۰ کیلوباز و سه ناحیه عملکردی می باشد: ۱- یک ناحیه اسیدی در N-ترمینال (کدون های ۱۰۱-۱)، که خود این ناحیه شامل دو دومین اصلی است، یکی دومین اسیدی فعال

1 . Hay-Flick

2 . Senescence

3 . Crisis Phase

4 . Tumor suppressor genes

5 . In situ

6 . Invasive

کننده رونویسی (کدون های ۴۲-۱) و دیگری دومین غنی از پرولین (کدون های ۹۷-۶۳) ۲ - ناحیه مرکزی^۱ متصل شونده به مرکز DNA (کدون های ۲۹۹-۱۰۲): این ناحیه یک پروموتور دارای موتیف مورد توافق^۲ را که از دو قطعه ۱۰ جفت بازی تشکیل شده است و توسط ۱۳-۰ جفت باز از هم جدا می شوند را شناسایی می کند. این ناحیه در طی تکامل شدیداً حفاظت شده می باشد. همچنین این ناحیه همولوگ ترین ناحیه بین خانواده های P53 از جمله P63 و P73 می باشد. ۳- ناحیه C- ترمینال بازی (کدون های ۳۹۳-۲۹۳): این ناحیه در تترامریزاسیون و تنظیم فعالیت P53 درگیر است. این ناحیه شامل سه منطقه میشود: منطقه اول شامل سه سیگنال جایابی هسته ای^۳ می باشد، منطقه دوم شامل دومین تترامریزاسیون بوده و منطقه سوم ناحیه تنظیم کننده منفی می باشد. این ناحیه ممکن است از اتصال DNA به ناحیه مرکزی پروتئین P53 جلوگیری کند [۱۷]. طول پروتئین کد شده توسط این ژن، ۳۹۳ اسید آمینه می باشد، این پروتئین به عنوان یک پروتئین هسته ای دارای هر دو سیگنال جایابی هسته ای و خارج کننده از هسته^۴ می باشد که آن را به پروتئین شاتل تبدیل کرده است [۱۵]. عملکرد طبیعی این پروتئین محافظت از ژنوم در مقابل صدمات وارده و استرس های گوناگون نظیر ژنوتوکسیک ها و یا عوامل دیگری نظیر هیپوکسی (کمبود اکسیژن)، حذف نوکلئوتیدی، فعال شدن انکوژن ها و به هم خوردن نظم میکروتوبول ها می باشد [۱۷].

ژن p53 دارای ۹ ایزوفرم می باشد [۱۸]، که این ایزوفرم ها حاصل استفاده از چندین پروموتور و فرایند پیرایش های متناوب^۵ این ژن، و همچنین استفاده از جایگاه های شروع ترجمه داخلی میباشد [۱۴].

جهش در ژن p53، شایع ترین رویداد در سرطان های انسانی می باشد [۸]، به طوری که جهش این ژن در ۴۶-۱۶٪ از سرطان های سینه دیده می شود [۱۹]. بیش از ۹۰٪ جهش های این ژن در اگزون های ۹-۵ رخ می دهد که این اگزون ها کدکننده دومین متصل شونده به DNA می باشند [۸]. بیشتر جهش های ژن P53 از نوع بدمعنی^۶ و تغییر قاب خواندن^۷ می باشد [۳]، به طوری که ۹۷٪ از جهش های بدمعنی در توالی کدکننده دومین مرکزی رخ می دهد [۱۵]. علاوه بر جهش، پلی مورفیسم های p53 به عنوان عامل خطر ساز برای ایجاد سرطان در نظر گرفته شده است. پلی مورفیسم ژنتیکی p53 ممکن است تعیین کننده حساسیت افراد در سرطان هایی مانند سینه، کلورکتال، ریه و نازوفارنژیال باشد [۱۹]. تغییرات نژادی و جغرافیایی در عملکرد پلی مورفیسم ژن TP53 دخیل است. حداقل ۳۷ پلی مورفیسم در این ژن کشف شده است [۲۰]، که به طور معمول یکی از متداولترین آن در کدون ۷۲ موجود در اگزون ۴ قرار دارد [۲۱]. اگزون ۴ اسید آمینه های ۱۲۵-۳۳ را کد می کند [۱۶]. پلی مورفیسم کدون ۷۲ کد کننده اسید آمینه آرژنین (CGC: Arg) و یا پرولین (CCC: Pro) می باشد [۲۱].

در سال ۲۰۰۵، نوما و همکاران ارتباط معنی داری بین ژنوتیپ p53 و خطر ابتلاء به سرطان سینه پیدا نکردند ولی نشان دادند که بین پلی مورفیسم کدون ۷۲ (Arg/Arg) ژن p53 با سرطان سینه گیرنده استروژن مثبت (ER+) به ویژه در زنان یائسه ارتباط وجود دارد [۳].

1 . core

2 . Consensus

3 . NLS: Nuclear Localization Signal

4 . NES: Nuclear export signal

5 . alternative splicing

6 . missence

7 . frameshift

بویرا و همکاران در سال ۲۰۰۳ ارتباط معنی داری بین ژنوتیپ Arg/Arg در کدون ۷۲ ژن P53 و سرطان سینه در بیماران ترک گزارش کردند [۲۳]. به طور مشابهی، لاگرد و همکاران در سال ۲۰۰۲ گزارش کردند که آلل Arg در کدون ۷۲ ژن p53، باعث رشد زیاد سلول های کارسینومای سینه در جمعیت نروژ می باشد [۲۷].

در سال ۲۰۰۰، پاپاداکیس و همکاران ژنوتیپ Arg/Arg در ژن p53 را به عنوان فاکتور خطر سرطان سینه در جمعیت مصر گزارش کردند [۲۸]. در مطالعات دیگری، تومیسکا و همکاران در سال ۲۰۰۵ هیچ ارتباط معنی داری را بین واریانت های کدون ۷۲ ژن p53 و خطر ابتلاء به سرطان سینه مشاهده نکردند [۲۹]. کالمیا و همکاران در سال ۲۰۰۵ ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم Arg/Arg ژن p53 با سرطان سینه در جمعیت شمال مصر گزارش کردند [۷].

مطالعات صورت گرفته در ایران روی پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن p53 با سرطان سینه در اصفهان [۱۹] و در شمال ایران [۸] هیچ ارتباط معنی داری را بین این پلی مورفیسم و سرطان سینه نشان نداد.

مطالعات دریدن موجود زنده (*In vivo*) نشان می دهد که استعداد تغییرشکل وابسته به پاپیلوماویروس انسانی (HPV)، در هموزیگوت های آرژنین ۷ برابر هتروزیگوت های Arg/pro می باشد، زیرا انکوپروتئین E6 در HPV بیشتر تمایل دارد که پروتئین p53 دارای آلل Arg/Arg را غیرفعال کند تا پروتئین دارای آلل پرولین را [۳۰].

علاوه بر مطالعات پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن p53 در سرطان سینه، ارتباط این پلی مورفیسم در سرطان های دیگر نیز بررسی شده است. در سال ۲۰۰۵ جین و همکاران در جمعیت هند گزارش کردند که ژنوتیپ Arg/Pro در کدون ۷۲ ژن p53 نسبت به ژنوتیپ Arg/Arg، مرتبط با پیشرفت زودرس سرطان ریه می باشد [۳۱].

مطالعه دیگری در جمعیت هند در سال ۲۰۰۵ توسط دو دانشمند بنام های بهتاکاریا و سنگوپتا روی سرطان سرویکال وابسته به HPV نشان داد که ارتباط معنی داری بین هموزیگوت پرولین در موقعیت کدون ۷۲ ژن p53 با این سرطان وجود دارد [۳۲].

کوشیک و همکاران در سال ۲۰۰۵ ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم کدون ۷۲ (Arg/Arg) ژن p53 و خطر ابتلاء به نئوپلازی اینترا اپی تلیال کشف کردند [۳۳].

با توجه به افزایش سرطان پستان در چند دهه ی اخیر، بیماری های پستان و تشخیص به موقع آنها از اهمیت ویژه ای برخوردار خواهد بود. به طوری که امروزه نیمی از زنان به خاطر بیماری پستان خود، با پزشک مشورت می کنند و حدود ۲۵ درصد از خانم ها در نهایت تحت بیوپسی قرار می گیرند.

همچنین با توجه به اینکه سرطان پستان شایع ترین بدخیمی در میان زنان جهان و اولین علت مرگ زنان ۴۴ - ۴۰ ساله می باشد، اهمیت اقدامات تشخیصی زودرس و حتی غربالگری های دوره ای بیش از پیش روشن می شود.

نکته ی مهم این است که سرطان پستان یک بیماری هتروژن می باشد و طبقه بندی های موجود، تمام انواع این بیماری را پوشش نمی دهند. از این رو نیاز به یک مارکر مولکولی قوی (مختص یک انواع بیماری) و سریع و حساس با ویژگی بالا ضروری می نماید [۲۲]. در ایران نیز با وجود اینکه سرطان پستان در میان زنان ایرانی رایج می باشد، مطالعات اپیدمیولوژی کمی در مورد فاکتورهای خطر این بیماری در ایران انجام گرفته است.

با توجه به اینکه، تفاوت نژادی و موقعیت جغرافیایی نقش مهمی را در خطر ابتلاء به سرطان سینه دارد [۳]، و با توجه به مطالعه ی انجام گرفته توسط بویرا و همکاران که ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم Arg/Arg ژن p53 با سرطان سینه در زنان ترک پیدا کردند [۲۳] و از آنجا که بین آنها و زنان آذربایجان از نظر نژادی ارتباط نزدیکی وجود دارد و همچنین به علت عدم بررسی ارتباط این پلی مورفیسم با خطر ابتلاء به سرطان سینه در زنان استان آذربایجان شرقی، ما بر آن شدیم در این تحقیق به مطالعه ی پلی مورفیسم

کدون ۷۲ (Arg/Arg) ژن p53 به عنوان مارکر احتمالی جهت استعداد ابتلاء به سرطان سینه، با سیستم تکثیر متزلزل جهش‌ها (ARMS)، پردازیم. در این تحقیق با استفاده از این تکنیک سه گروه هموزیگوت (Arg/Arg)، (Pro/Pro) و هتروزیگوت (Arg/Pro) بر روی ژل آگارز جداسازی شدند. سپس از هر گروه چند نمونه، به منظور تأیید نتایج، توالی‌یابی شدند. همچنین آزمون ۴ از لحاظ موتاسیون احتمالی، توسط تکنیک بررسی تغییرات ساختاری تک رشته‌ای (SSCP) مورد بررسی قرار گرفت. موارد مشکوک به حضور موتاسیون با استفاده از تکنیک توالی‌یابی بررسی شدند.

فصل اول

ساختار پستان و بیماری های آن

۱-۱- مقدمه

پستان یک غده‌ی عرق تغییر شکل یافته است، که بین دومین و ششمین دنده قرار می‌گیرد. پستان جایگاه بیماری های متعدد اعم از خوش خیم و بد خیم می باشد. بیش از نیمی از زنان برخی از بیماری های خوش خیم پستان را پس از ۲۰ سالگی نشان می دهند. سرطان پستان بیشتر به حالت مزمن دیده می شود که زنان بالغ را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

۲-۱- جنین شناسی پستان

از نظر جنین شناسی، پستان یک غده عرق^۱ با تغییر شکل زیاد است، که از لایه‌ی اکتودرم منشا گرفته و سپس آلوتل ها و مجاری را تشکیل می دهد. بافت هم بندی حامی و پر عروق پستان، صرفاً از بافت مزانشیم مشتق می شود [۳۴].

در رویان، نخستین نشانه غدد پستان به صورت یک ضخامت نواری شکل در روپوست (اکتودرم) ایجاد می - گردد که خط یا تیغه پستانی نامیده می شود. در یک رویان هفت هفته ای، این خط در هر طرف بدن از ریشه اندام قدامی تا ناحیه خلفی کشیده می شود. اگرچه قسمت اعظم خط پستانی مدتی کوتاه پس از تشکیل از بین می رود، با این وجود یک بخش کوچکی از آن در ناحیه سینه ای باقی می ماند و به داخل مزانشیم زیرین خود نفوذ می کند. در این ناحیه این قسمت شانزده تا بیست و چهار شاخه تشکیل می دهد که به نوبه خود جوانه های کوچک توپری را ایجاد می کنند. در مرحله‌ی زندگی پیش از تولد، شاخه های اپی تلیالی، دارای مجرا گشته و مجاری شیری را تشکیل می دهند، در حالی که جوانه ها، مجاری کوچک واکوئل های غده پستان را می سازند [۳۵].

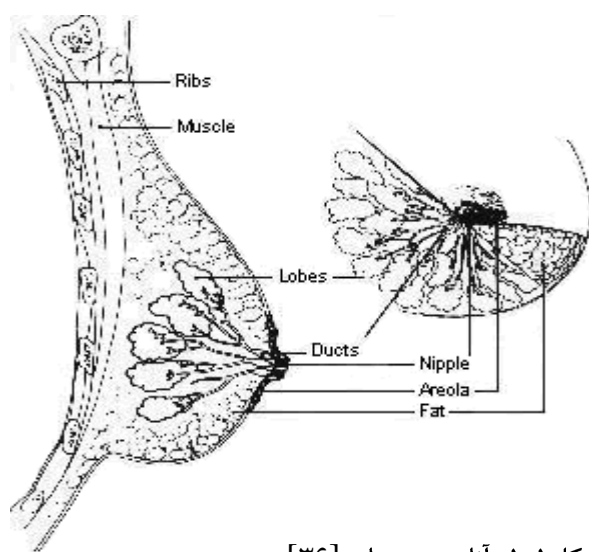
مجاری شیری ابتدا به داخل برجستگی کوچک اپی تلیالی در سطح پوست باز می شوند . کمی پس از تولد این برجستگی در نتیجه‌ی افزایش مزانشیم زیرین خود، تبدیل به نوک پستان می شود [۳۵].

¹ . sudoriferous

۱-۳- آناتومی پستان

ساختمان پستان بین دومین و ششمین دنده^۱، و بین لبه‌ی استخوان جناغ^۲ تا لبه‌ی استخوان زیر بغل^۳ کشیده شده است، و زیر عضله‌ی سینه‌ای^۴ روی قفسه‌ی سینه، قرار دارد (شکل ۱-۱). همچنین زبانه‌هایی از بافت پستان به صورت دم مانند داخل استخوان زیر بغل کشیده شده است [۳۶].

از نظر آناتومیکی و به منظور اهداف بالینی، پستان به چهار قسمت تقسیم شده است: ربع فوقانی-داخلی، فوقانی-خارجی، تحتانی-داخلی، تحتانی-خارجی. اغلب سرطان در ربع فوقانی-خارجی پستان اتفاق می‌افتد [۳۶].



شکل ۱-۱- آناتومی پستان [۳۶]

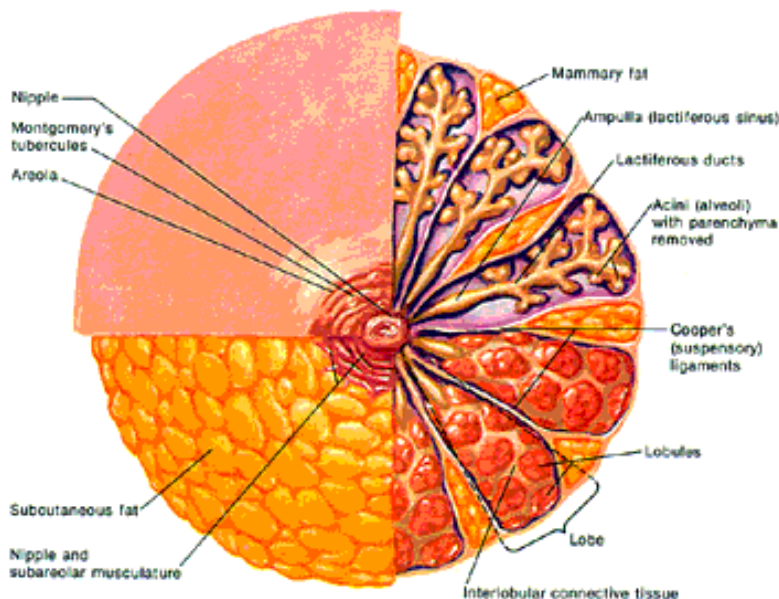
۱-۴- ساختمان پستان

در هنگام تولد پستان‌ها در هر دو جنس مشابهند و تنها دارای مجاری شیری اصلی می‌باشند که در جنس مؤنث تا هنگام بلوغ نارس می‌مانند. پس از بلوغ در پاسخ به استروژن و پروژسترون که از تخمدان‌ها ترشح می‌شود، شروع به رشد می‌کنند [۳۷].

نیمه فوقانی پستان به خصوص ربع فوقانی-خارجی، نسبت به سایر قسمت‌های آن بافت غدد بیشتری دارد. پارانیشیم پستان به ۱۵-۲۰ لوب مخروطی شکل تقسیم می‌شود، که از لوبول‌های حاوی خوشه‌های آسینی تشکیل شده‌اند، که این ساختمان‌ها به مجاری پستان ختم می‌شوند. تمام مجاری موجود در یک لوبول در یک آمپول تخلیه می‌شوند، آمپول نیز پس از باریک شدن به نوک پستان^۵ ختم می‌گردد [۳۷].

1. Rib
2. Sternal
3. Axilla
4. Pectoralis
5. Nipple

پوست پستان نازک و حاوی فولیکول های مو، غدد سباسه، و غدد عرق اکراین^۱ می باشد. استروما و بافت زیرپوستی پستان، حاوی چربی (حدود ۸۵ درصد بافت پستان را چربی تشکیل می دهد)، بافت همبندی، عروق خونی، عروق لنفی و اعصاب است (شکل ۱-۲).



شکل ۱-۲- ساختار پستان [۳۸]

اکثر عروق لنفاوی داخل پستان، به گره های لنفی زیر بغل^۲ منتهی می شوند. تعدادی از این عروق نیز به گره های بالا یا پایین ترقوه ای^۳ و گره های داخل پستانی^۴ می پیوندند [۳۶]. از آنجایی که مسیر عروق خونی و لنفاوی در پستان می تواند محل متاستازهای سرطان پستان به ویژه ریه و استخوان را توجیه کند، شناخت این مسیرها از اهمیت ویژه ای برخوردار است.

1 . Eccrine
2 . Axillary lymph
3 . Supra-or infraclavicular
4 . Intra mammary nodes

۱-۵-اختلالات و بیماری های پستان

اختلالات و بیماری های پستان در بردارنده ی محدوده ی وسیعی از ویژگی های کلینیکی و پاتولوژیکی می باشند. تومورهای خوش خیم پستان به صورت تغییر فیبروکیستیک^۱، فیبروآدنوما و واریانت ها^۲، آسیب های اسکروز^۳، آسیب های پاپیلاری^۴، بیماری تکثیر شونده اپی تلیال^۵ و شرایط التهابی^۶ گروه بندی می شوند.

بر اساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی^۷، تومورها و غدد غیر-طبیعی پستان به صورت زیر تقسیم بندی می شود [۳۴]:

دیسپلازی خوش خیم پستان، تومورهای خوش خیم یا به ظاهر خوش خیم، کارسینوما، سارکوما، کارسینوسارکوما و تومورهای طبقه بندی نشده

۱-۵-۱-اختلالات التهابی و عفونی پستان

به استثنای دوره پس از وضع حمل، عفونت های پستان نادر می باشند، و به دو دسته درونی و بیرونی تقسیم بندی می شوند. از مجموع این اختلالات می توان عفونت های باکتریایی، عفونت های قارچی، التهاب چرکی غده عرق شبکه نیپل-آرئول^۸ یا آگزایلا و بیماری موندور^۹ را نام برد. بیماری موندور، ترومبوفلیت سطحی پستان است که نوعی بیماری نادر است که معمولاً با حاملگی، تروما یا جراحی پستان توأم می باشد [۳۹].

۱-۵-۲-اختلالات و بیماری های خوش خیم شایع پستان

در تلاش برای طبقه بندی ساده ی تومورهای خوش خیم، مفهومی که بیشتر مورد توجه است، انحرافات رشد و نمو نرمال و اینولوشن (Involution: برگشت یک عضو یا اندام به اندازه ی اصلی اش پس از بزرگ شدن) می باشد. این مفهوم بدان معنی است که اکثر حالات خوش خیم می توانند به صوت اختلالات جزئی فرایندهای نرمال رشد و نمو (فیبروآدنوما و هایپرتروفی جوانی)، تغییر چرخه ای (درد پستان و ندوله شدن) و اینولوشن توضیح داده شوند. در مقابل، حالت گشادی مجرا^{۱۰} به نظر می رسد یک واقعه اولیه در نتیجه تراوش مجرا و التهاب باشد. هایپرپلازی اپی تلیال و پاپیلوماها به صورت حالات پیچیده تری در نظر گرفته می شوند، که می توانند همراه با تغییرات چرخه ای و اینولوشن باشند [۴۰ و ۴۱].

¹ . Fibrocystic change

² . Fibroadenoma and variants

³ . Sclerosing lesions

⁴ . Papillary lesions

⁵ . Epithelial proliferative disease

⁶ . Inflammatory conditions

⁷ . WHO: World Health Organization

⁸ . Nipple-areola complex

⁹ . Mondor,s Disease

¹⁰ . Duct ectasia

۱-۲-۵-۱- تغییرات فیبروکیستیک

تغییرات فیبروکیستیک طیفی از تغییرات در بافت پستان هستند، که از موارد کاملاً بدون خطر تا الگوهای همراه با افزایش خطر ایجاد کارسینوم، در تغییر است. از نظر بافتی حد واسط تغییرات کیستی و تغییرات بافتی به نام فیبروز و اسکروز می باشند [۴۲].

فیبروز عبارت از جمع شدن و سفت شدن بافت می باشد. در این حالت، پستان دارای کیست هایی است که توسط فیبروز و نسوج سفت، احاطه شده اند. این ضایعات معمولاً با درد و تندرns (Mastodynia): درد پستان غالباً در دوران قاعدگی) همراه بوده و اکثراً دو طرفه می باشد. این ضایعه در اثر تغییرات هورمونی ایجاد می شود و در زنان قبل از یائسگی بین سنین ۲۰ تا ۵۶ سال شایعتر است [۴۲]. در خودآزمایی پستان و گاه حتی معاینات بالینی توسط پزشک و ماموگرافی، مشکلاتی را ایجاد می کنند و اغلب تشخیص قطعی آن ها با نمونه برداری است. گاهی تغییرات فیبروتیک در استروما بدون وجود کیست به وجود می آید که تغییرات فیبروزی گفته می شود [۴۲].

۱-۲-۵-۲- فیبروآدنوم

فیبروآدنوم ها توده های متحرک، بدون درد و معمولاً منفرد هستند، اما در ۱۵-۱۰ درصد موارد می توانند متعدد هم باشند. در سنین جوانتر (زیر ۲۵ سال) شایع بوده و تحت تأثیر همان سیستم هورمونی قرار می گیرند که بر تمام بافت پستان اثر می گذارد.

از نظر مورفولوژیک توده هایی سفت به رنگ زرد مایل به سفید با مناطق نرم تر و صورتی رنگ می باشند که در بررسی میکروسکوپی از یک استرومای فیبروبلاستی شل حاوی فضاهای شبه مجرای پوشیده شده از اپیتلیوم، تشکیل شده است. به ندرت بیش از یک یا دو سانتی متر رشد می کنند و سپس در همین اندازه باقی می مانند. تشخیص قطعی فیبروآدنوما با ترکیبی از معاینه بالینی، سونوگرافی و معاینات سلولی پس از نمونه برداری با سوزن باریک^۱ انجام می شود. گاهی اوقات این تومورها ممکن است خیلی بزرگ شوند که اصطلاحاً به آنها فیبروآدنوم غول آسا گفته می شود که دچار رشد فزاینده می شوند و نیاز به اقدامات درمانی خواهند داشت [۴۲].

۱-۲-۵-۳- گشادی مجرا و التهاب اطراف مجاری

مجاری اصلی پستان در زیر هاله‌ی پستان، در جریان تحلیل و پسرفت پستان در دوران یائسگی، کوتاه و گشاد می شوند و در سنین پس از یائسگی، می تواند با علائمی مثل تو کشیدگی نوک پستان و توده قابل لمس در پستان همراه باشند. از آن جا که علائم ممکن است در سرطان های پستان نیز دیده شود، تشخیص نهایی با پزشک است [۴۲].

^۱ . FNA: Fine Needle Aspiration

۱-۵-۲-۴- هاپیر پلازی آتی پیک اپی تلپال^۱

حدود ۴-۵ درصد ضایعات خوش خیم پستان را تشکیل می دهند. معمولاً بصورت منفرد و کوچکتر از یک میلی متر هستند و به این دلیل فقط بصورت میکروسکوپی تشخیص داده می شوند. این ضایعه می تواند در هر دو نوع لوله ای و مجرای دیده شود [۴۲].

۱-۵-۲-۵- پاپیلوم داخل مجرای^۲

پاپیلوم داخل مجرای یک نوع ضایعه‌ی مجاری پستان است. اکثراً منفرد بوده و درون مجراها یا سینوس‌های شیری اصلی یافت می شوند. معمولاً قابل لمس نیست و باعث خونریزی از نوک پستان می شود. اگرچه ۸۰٪ درصد توده های پستانی خوش خیم هستند، اما در صورت کشف هر گونه توده‌ی مشکوک در پستان، باید به پزشک مراجعه شود [۴۲].

۱-۵-۳- بیماری های بدخیم پستان (سرطان سینه)

با توجه به افزایش سرطان پستان در چند دهه‌ی اخیر، بیماری های پستان و تشخیص به موقع آنها از اهمیت ویژه ای برخوردار خواهد بود. به طوری که امروزه نیمی از زنان به خاطر بیماری پستان خود با پزشک مشورت می کنند و حدود ۲۵ درصد از خانم ها در نهایت تحت بیوپسی قرار می گیرند.

در ایران نیز با وجود اینکه سرطان پستان در میان زنان ایرانی رایج می باشد، مطالعات اپیدمیولوژی کمی در مورد فاکتورهای خطر این بیماری در ایران انجام گرفته است. نرخ شیوع سرطان پستان در زنان ایرانی ۲۲ در ۱۰۰،۰۰۰ است. به طوری که در استان های مازندران (۲۳/۹)، کرمان (۱۶/۹)، گلستان (۱۵/۷)، گیلان (۱۲/۶) و در اردبیل (۷/۶) در ۱۰۰،۰۰۰ نفر می باشد. سن بیماری در ایران حداقل یک دهه جوانتر از کشورهای غربی می باشد که می تواند به علت جوان بودن ساختار جمعیتی کشور باشد [۴۳].

با توجه به اینکه، سرطان پستان شایع ترین بدخیمی در میان زنان جهان و اولین علت مرگ زنان ۴۴ - ۴۰ ساله می باشد. اهمیت اقدامات تشخیصی زودرس و حتی غربالگری های دوره ای بیش از پیش روشن می شود [۴۴].

نکته‌ی مهم این است که سرطان پستان یک بیماری هتروژن می باشد و طبقه بندی های موجود، تمام انواع این بیماری را پوشش نمی دهند. از این رو نیاز به یک مارکر مولکولی قوی (مختص یک نوع بیماری) و سریع و حساس با ویژگی بالا ضروری می باشد [۴۴].

۱-۳-۵-۱- اپیدمیولوژی سرطان سینه

سرطان سینه شایع ترین بدخیمی مهاجم در زنان جهان است (جدول ۱-۱) (۷ و ۴۵) و پس از سرطان ریه دومین سرطان شایع می باشد [۴۵]. یک سوم از زنان سرطانی به این نوع سرطان مبتلا هستند [۸]. سرطان سینه یکی از عوامل مرگ ناشی از سرطان در زنان ۴۴-۴۰ ساله است، به طوری که ۲۰٪ از مرگ

^۱ . Atypical epithelial hyperplasia

^۲ . Intraductal papilloma