بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه تربیت مدرس

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای علی آهنی رشته ژنتیک پزشکی رساله دکتری خود را با عنوان: « بررسی الگوی جهش های ژن RB1 در بیماران مبتلا به رتینوبلاستوما » در تاریخ ۱۳۹۰/۴/۵ ارائه کردند.

اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	امضاء
استاد راهنمای اصلی	دکتر محمد تقی اکبری	
استاد راهنمای دوم	دکتر حمیدرضا خرم خورشید	
استاد مشاور	دکتر بابک بهنام	
استاد ناظر	دکتر حسین عبدل تهرانی	
استاد ناظر	دکترجواد توکلی بزاز	
استاد ناظر	دکتر سیروس زینلی	
استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر مهرداد نوروزی نیا	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی

دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه-های مصوب انجام شود.

ماده ٤- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ٥- این آیین‌نامه در ٥ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/٤/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/٤/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **علی آهنی** دانشجوی رشته **ژنتیک پزشکی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۵** مقطع **دکتری** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

امضا علی آهنی

تاریخ ۱۳۹۰/۴/۵

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل **رساله دکتری** نگارنده در رشته **ژنتیک پزشکی** است که در سال **۱۳۹۰** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر محمد تقی اکبری و دکتر حمید رضا خرم خورشید** ، مشاوره **دکتر بابک بهنام** از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ٤ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ٥ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ٤ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ٦ : اینجانب **علی آهنی** دانشجوی رشته **ژنتیک پزشکی** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی علی آهنی

تاریخ و امضا

۱۳۹۰/۴/۵

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته ژنتیک پزشکی

عنوان

بررسی الگوی جهش‌های ژن *RB1* در بیماران مبتلا به رتینوبلاستوما

نگارش

علی آهنی

اساتید راهنما

دکتر محمد تقی اکبری

دکتر حمید رضا خرم خورشید

استاد مشاور

دکتر بابک بهنام

تابستان ۱۳۹۰

تقدیم به :

همسرم که به من یارای رفتن داد....

تشکر و قدردانی

اکنون که با یاری پروردگار مراحل انجام این پژوهش بـه اتمـام رسـیده اسـت و گـامی هـر چنـد کوچـک در راه پیشرفت علمی کشور برداشته شده است بر خود لازم می دانم تا از تمامی عزیزانی که در این راه مرا به هـر نحـو یـاری کرده اند تشکر و سپاسگزاری نمایم.

در این راستا از زحمات، نصایح و کمک های بی دریغ استاد ارجمندم جناب آقای دکتر محمد تقی اکبری کمـال تشکر را دارم، چرا که در طول این دوره از ایشان آموزه های علمی و اخلاقی بسیاری آموختم. همچنین از دیگـر اسـتاد عزیزم جناب آقای دکتر حمید رضا خرم خورشید نیز سپاسگزارم چرا که انجام این پروژه بدون یـاری وی امکـان پـذیر نبود. در ادامه از زحمات فراوان استاد مشاور گرانقدر جناب آقای دکتر بابک بهنام نیز قدردانی مـی شـود. همچنـین از هیئت محترم داوران به خاطر زحماتی که در مدت بررسی و ارزشیابی این رساله متحمل شده اند متشکرم.

همچنین از ریاست محترم پژوهشگاه ابن سینا جناب آقای دکتر محمد مهدی آخوندی و معاونت پژوهشی جناب آقای دکتر محمدرضا صادقی و اساتید گروه ژنتیک پزشکی دانشگاه تربیت مدرس خصوصاً استاد ارزشمندم جناب آقای دکتر مهرداد نوروزی نیا به دلیل فراهم آوردن بستری مناسب جهت انجام این پژوهش، سپاس گزارم.

در انتها از تمامی اساتید، دوستان و همکاران در گروه ژنتیک پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، پژوهشگاه ابن سینا، بیمارستان حضرت رسول اکرم، بیمارستان فارابی و بیمارستان محک و همچنینی سایر عزیزانی کـه مـرا یـاری نمودنـد تشکر می نمایم و آرزوی سربلندی آنان را در تمامی مراحل زندگی دارم:

جناب آقای دکتر نجات مهدیه	سرکار خانم دکتر وثوق
جناب آقای دکتر مسعود ناصری پور	سرکار خانم دکتر قاسمی
جناب آقای کیومرث سلیمی نژاد	سرکار خانم دکتر اسدی آملی
جناب آقای دکتر فرانوش	سرکار خانم ایزدی
جناب آقای سامان محمد ظاهری	سرکار خانم دکتر ربانی
جناب آقای مصطفی منتظر ظهور	سرکار خانم عدالت خواه

قابل ذکر است که این پروژه با استفاده از حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس، پژوهشگاه ابن سینا، موسسه خیریه محک و آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر اکبری به انجام رسیده است که از تمامی این مراکز تشکر و قدردانی می شود.

با تشکر
علی آهنی
بهار ۱۳۹۰

چکیده

رتینوبلاستوما شایع‌ترین تومور جامد درون چشمی در کودکان زیر سن شش سال است که از تکثیر و رشد بی‌رویه سلول‌های نابالغ شبکیه چشم منشا می‌گیرد. جهش در هر دو نسخه ژن *RB1* مسئول شکل‌گیری این بیماری می‌باشد. اندازه ژن *RB1* بسیار بزرگ و حدود ۱۸۰ Kb بوده و شامل ۲۷ اگزون می‌باشد. تا کنون طیف وسیعی از جهش‌ها در سرتاسر این ژن گزارش شده است. اندازه بزرگ این ژن انجام بررسی‌های مولکولی را بر روی آن دشوار می‌سازد ولی از طرفی پیدا کردن جهش-ها تأثیر بسزایی در کنترل بیماری در خانواده‌های بیمار دارد. در مطالعه حاضر برای اولین‌بار در ایران طیف جهش‌های ژن *RB1* در بیماران مبتلا به رتینوبلاستوما مورد مطالعه قرار گرفته است.

به منظور شناسایی جهش‌ها در صورت موجود بودن نمونه توموری بیماران تمامی اگزون‌های ژن *RB1* با استفاده از روش تعیین توالی مستقیم بررسی شده و در بیمارانی که نمونه توموری آنها در دسترس نبوده است این بررسی‌ها بر روی نمونه خون آنها انجام شده است. در ادامه برای بررسی حذف و اضافه‌های ژنی از دو روش MLPA و کاریوتایپ استفاده شده است. روش MLPA بر روی تمامی نمونه‌ها و روش کاریوتایپ برای ۲۷ بیمار مورد استفاده قرار گرفته است. همچنین وضعیت پلی‌مورفیسم سه مارکر میکروساتلایتی پیوسته به ژن *RB1* در جمعیت عادی ایرانی مورد بررسی قرار گرفته و از این مارکرها در مراحل بعدی برای بررسی وضعیت LOH در نمونه‌های توموری استفاده شده است. علاوه بر این وضعیت متیلاسیون پروموتر ژن *RB1* در نمونه‌های توموری با استفاده از روش تیمار با بی‌سولفیت مورد بررسی قرار گرفته است. در انتها برای ۱۱ مورد از جهش‌های تکرار شونده روش‌های سریع غربالگری بر پایه ARMS-PCR طراحی شده است .

در این مطالعه در مجموع از ۱۲۱ بیمار نمونه‌گیری شده که در ۴۳ مورد از آنها علاوه بر نمونه خون، نمونه تومور بیمار نیز در دسترس بوده است. در مجموع تعداد ۹۱ جهش در بیماران شناسایی شده است که ۱۸ مورد از این جهش‌ها جدید بوده و برای اولین بار گزارش می‌شوند.

وضعیت پراکندگی جهش‌ها و نوع آنها در جمعیت ایرانی با سایر جمعیت‌هایی که تا کنون مورد بررسی قرار گرفته اند کاملاً یکسان است. همچنین بررسی جهش‌ها در بیماران رتینوبلاستوما تأثیر بسزائی در کاهش تعداد دفعات مراجعه خانواده به کلینیک داشته و در مواردی از آن می‌توان برای انجام تشخیص پیش از تولد و یا تشخیص‌های آینده نگر در سایر اعضای خانواده فرد بیمار استفاده نمود.

کلمات کلیدی:

رتینوبلاستوما، *RB1*، تشخیص ژنتیکی، تعیین توالی، MLPA، متیلاسیون پروموتر، میکروستلایت

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱. اپیدمیولوژی ۲

۱-۲. تظاهرات بالینی و تشخیص ۴

۱-۲-۱. علائم بالینی ۴

۱-۲-۲. پاتولوژی ۷

۱-۳. درمان ۷

۱-۳-۱. مدیریت بیماری داخل چشمی ۹

۱-۳-۲. انوکلئاسیون ۱۱

۱-۳-۳. EBRT ۱۲

۱-۳-۴. Brachytherapy ۱۳

۱-۳-۵. ترموتراپی ۱۴

۱-۳-۶. Laser Photocoagulation ۱۴

۱-۳-۷. کرایوتراپی ۱۴

۱-۳-۸. شیمی درمانی ۱۵

۱-۴. مشاوره ژنتیک در رتینوبلاستوما ۱۶

۱-۵. مسیرهای عملکردی پروتئین Rb (pRb) ۲۳

۱-۶. نقش *RB1* در تنظیم چرخه سلولی ۲۷

۱-۶-۱. نحوه غیر فعال شدن pRb در سرطان ها ۲۸

۱-۶-۲. فعالیت pRb در سایر نقاط چرخه سلولی ۲۹

۱-۶-۳. فعالیت pRb در G2/M ۲۹

۱-۶-۴. نقش pRb در حفظ پایداری ژنوم ۳۰

۱-۷. توارث ۳۱

۱-۸. وضعیت سیتوژنتیک رتینوبلاستوما ۳۲
۱-۹. تعیین نقشه و کلونینگ ژن *RB1* ۳۳
۱-۱۰. ژنتیک مولکولی رتینوبلاستوما ۳۴
۱-۱۱. طیف جهش‌ها در ژن *RB1* ۴۰
۱-۱۱-۱. جهش‌هایی که در بافت‌های نرمال افراد مبتلا مشاهده می‌شوند ۴۰
۱-۱۱-۱-۱. ناهنجاری‌های سیتوژنتیک ۴۰
۱-۱۱-۱-۲. حذف و نوآرایی‌های بزرگ در سطح DNA ۴۰
۱-۱۱-۱-۳. جهش‌های نقطه‌ای و کوچک ۴۱
۱-۱۱-۲. انواع جهش‌ها در سلولهای توموری افراد مبتلا ۴۱
۱-۱۲. وضعیت رتینوبلاستوما در ایران ۴۲

فصل دوم: مواد و روش ها ۴۵
۲-۱. جمعیت مورد مطالعه و نحوه نمونه گیری ۴۶
۲-۱-۱. معیار ورود بیماران به مطالعه ۴۶
۲-۱-۲. معیار خروج بیماران از مطالعه ۴۶
۲-۲. استخراج DNA و RNA ۴۶
۲-۲-۱. استخراج DNA از بافت های فیکس شده در فرمالین و احاطه شده با پارافین ۴۶
۲-۲-۲. استخراج DNA از خون محیطی ۴۹
۲-۲-۳. سنجش کیفیت و کمیت DNA ۴۹
۲-۲-۴. استخراج RNA از نمونه خون محیطی ۵۰
۲-۲-۵. بررسی کیفیت و کمیت RNA استخراج شده ۵۱
۲-۲-۶. سنتز cDNA ۵۲
۲-۳. PCR ۵۳

۲-۴. الکتروفورز روی ژل آگاروز ۵۸
۲-۵. تعیین توالی ۶۰
۲-۶. MLPA ۶۲
۲-۶-۱. مقدمه ۶۲
۲-۶-۲. روش کار ۶۳
۲-۷. کاریوتایپ از نمونه های خون محیطی ۶۶
۲-۷-۱. کشت و تهیه گستره های متافازی ۶۶
۲-۷-۱-۱. مواد و تجهیزات لازم ۶۶
۲-۷-۱-۲. روش کار ۶۶
۲-۷-۲. نوار بندی G ۶۸
۲-۸. ژنوتایپینگ مارکرهای میکروساتلایتی ۶۹
۲-۸-۱. جمعیت مورد مطالعه و نحوه انتخاب نمونه ها ۶۹
۲-۸-۲. بهینه سازی واکنش های PCR برای مارکر ها ۷۰
۲-۸-۳. تفکیک و آنالیز قطعات ۷۰
۲-۹. بررسی LOH در نمونه های توموری ۷۲
۲-۱۰. بررسی وضعیت متیلاسیون در نمونه های توموری ۷۳
۲-۱۰-۱. محلول های مورد نیاز ۷۳
۲-۱۰-۲. روش کار ۷۳
۲-۱۰-۳. Methylation Specific PCR ۷۵
۲-۱۱. PCR-RFLP برای شناسایی سریع جهش ها ۷۶
۲-۱۲. ARMS-PCR برای شناسایی سریع جهش ها ۷۷

فصل سوم: نتایج ۸۱

۳-۱. جمعیت مورد مطالعه و نحوه نمونه گیری ۸۲
۳-۲. نتایج حاصل از PCR و تعیین توالی ۸۷
۳-۲-۱. نتایج تعیین توالی برای گروه ۱ (بیماران دارای نمونه توموری) ۸۷
۳-۲-۱-۱. نتایج بررسی های انجام شده در مورد بیمار کد ۱۱ ..... ۹۸
۳-۲-۲. نتایج تعیین توالی برای گروه ۲ و ۴ (بیماران فرم دوطرفه یا سه طرفه) ۱۰۰
۳-۲-۳. نتایج تعیین توالی برای گروه ۳ و ۵ (بیماران فرم یکطرفه) ۱۰۴
۳-۲-۴. طیف جهش های مشاهده شده ۱۰۷
۳-۲-۵. پلی مورفیسم های مشاهده شده ۱۰۹
۳-۳. MLPA ۱۱۰
۳-۴. کاریوتایپ از نمونه های خون محیطی ۱۱۴
۳-۵. ژنوتایپینگ مارکرهای میکروساتلایتی ۱۱۶
۳-۶. بررسی LOH در نمونه های توموری ۱۱۹
۳-۷. بررسی وضعیت متیلاسیون پروموتر در نمونه های توموری ۱۲۱
۳-۸. PCR-RFLP برای شناسایی سریع جهش ها ۱۲۲
۳-۹. ARMS-PCR برای شناسایی سریع جهش ها ۱۲۲

فصل چهارم: بحث، نتیجه گیری و پیشنهادها ۱۲۶
۴-۱. جمعیت مورد مطالعه ۱۲۷
۴-۲. PCR و تعیین توالی ۱۲۹
۴-۲-۱. بررسی نتایج تعیین توالی برای گروه ۱ ..... ۱۲۹
۴-۲-۲. بررسی نتایج تعیین توالی برای گروه ۲ و ۴ (بیماران فرم دوطرفه) ۱۳۳
۴-۲-۳. بررسی نتایج تعیین توالی برای گروه ۳ (بیماران فرم یکطرفه) ۱۳۵
۴-۲-۴. بررسی جهش های جدید شناسایی شده ۱۳۶

۴-۲-۴-۱. بررسی جهش مشاهده شده در بیمار ۱۱ ..... ۱۳۶
۴-۲-۴-۲. بررسی جهش های حذف کوچک در بیماران ۱۳۹
۴-۲-۴-۳. بررسی جهش های مضاعف شدگی در بیماران ۱۴۰
۴-۲-۴-۴. بررسی واریانت هم معنی مشاهده شده در بیمار ۷ ..... ۱۴۱
۴-۲-۵. پلی مورفیسم های مشاهده شده ۱۴۲
۴-۳. کاریوتایپ از نمونه های خون محیطی ۱۴۳
۴-۴. MLPA ۱۴۴
۴-۵. طیف جهش های مشاهده شده در سایر مطالعات و مقایسه با مطالعه حاضر ۱۴۷
۴-۶. ژنوتایپینگ مارکرهای میکروساتلایتی ۱۵۰
۴-۷. بررسی LOH و متیلاسیون پروموتر در نمونه های توموری ۱۵۲
۴-۸. PCR-RFLP برای شناسایی سریع جهش ها ۱۵۴
۴-۹. ARMS-PCR برای شناسایی سریع جهش ها ۱۵۶
۴-۱۰. جمع بندی و نتیجه گیری ۱۵۷
۴-۱۱. پیشنهادها ۱۶۲
فهرست منابع ۱۶۳
چکیده انگلیسی ۱۸۰

فهرست جداول

جدول ۱-۱. فراوانی بروز رتینوبلاستوما در کشورهای مختلف ۳

جدول ۱-۲. طبقه بندی R-E برای انواع تومور های رتینوبلاستومای درون چشمی ۱۰

جدول ۱-۳. طبقه بندی بین المللی (Murphee) برای انواع رتینوبلاستوما ۱۱

جدول ۲-۱. توالی پرایمرهای لازم برای تکثیر ژن *RB1* ۵۵

جدول ۲-۲. شرایط واکنش های PCR ۵۷

جدول ۲-۳. مقادیر استفاده شده از محصول PCR در تعیین توالی ۶۱

جدول ۲-۴. پروب های مورد استفاده در واکنش های MLPA ۶۵

جدول ۲-۵. مشخصات مارکرهای مورد استفاده و توالی پرایمر آنها ۷۰

جدول ۲-۷. جهش های ژن *RB1* که با استفاده از PCR-RFLP قابل شناسایی هستند ۷۷

جدول ۲-۸. پرایمرهای مورد استفاده در ARMS PCR ۷۸

جدول ۲-۹. نحوه نام گذاری پرایمر های ARMS PCR ۸۰

جدول ۳-۱. تعداد بیماران و نوع نمونه گرفته شده از آنها ۸۲

جدول ۳-۲. میانگین سنی بیماران با توجه به نوع بیماری ۸۴

جدول ۳-۳. میانگین سنی بیماران با توجه به جنسیت ۸۴

جدول ۳-۴. لیست جهش های مشاهده شده در بیماران گروه اول ۸۷

جدول ۳-۵. لیست جهش های مشاهده شده در بیماران گروه ۲ و ۴ (فرم دوطرفه) ۱۰۰

جدول ۳-۶. جهش های نقطه ای شناسایی شده در بیماران گروه ۳ و ۵ ..... ۱۰۴

جدول ۳-۷. میانگین سن بیماران بر اساس نوع جهش آنها ۱۰۷

جدول ۳-۸. انواع ناهنجاری های ساختاری شناسایی شده بوسیله روش MLPA ۱۱۰

جدول ۳-۹. اطلاعات به دست آمده از مارکر ها میکروساتلایتی ۱۱۶

جدول ۴-۱. مقایسه میانگین سن بر حسب جنسیت و نوع بیماری ۱۲۸

فهرست نمودارها

نمودار ۳-۱. سن بیماران در زمان تشخیص (بر حسب ماه) ۸٤
نمودار ۳-۲. گروه بندی سنی بیماران بر حسب نوع بیماری ۸۵
نمودار ۳-۳. وضعیت سن بیماران در مقایسه با جنسیت..... ۸۵
نمودار ۳-۴. وضعیت سن بیماران به تفکیک نوع بیماری و جنسیت ۸٦
نمودار ۳-۵. نحوه پراکندگی جهش ها بر حسب نوع جهش و فرم بیماری ۱۰۸

فهرست شکل‌ها

شکل۱-۱. لوکوکوریا ۵

شکل۱-۲. وضعیت پاتولوژی رتینوبلاستوما ۹

شکل۱-۳. رده بندی انواع رتینوبلاستوما ۱۶

شکل۱-۴. چرخه تومورساپرسوری *RB1* ۲۵

شکل۱-۵. تصویر شماتیک پروتئین های pRb، E2F و E7 ..... ۲۷

شکل۲-۱. مراحل انجام آزمایش MLPA ۶۴

شکل۳-۱. جهش های بی معنی در کدون های آرژینین در بیماران گروه ۱ ..... ۸۹

شکل۳-۲. جهش های بی معنی در بیماران گروه ۱ ..... ۹۰

شکل۳-۳. حذف نقطه ای g.39532delT شناسایی شده در بیمار کد ۵ ..... ۹۱

شکل۳-۴. حذف نقطه ای g.153336delC شناسایی شده در بیمار ۸ ..... ۹۲

شکل۳-۵. حذف نقطه ای g.150034delG شناسایی شده در بیمار ۲۷ ..... ۹۳

شکل۳-۶. حذف نقطه ای g.61767delT شناسایی شده در بیمار ۳۳ ..... ۹۳

شکل۳-۷. حذف نقطه ای g.39552_39553delTA شناسایی شده در بیمار ۴۲ ..... ۹۴

شکل۳-۸. مضاعف شدگی g.59764_59765insT شناسایی شده در بیمار ۲ ..... ۹۵

شکل۳-۹. مضاعف شدگی g.153296_153305dup شناسایی شده در بیمار ۲۰ ..... ۹۶

شکل۳-۱۰. مضاعف شدگی g.70326_70327insT شناسایی شده در بیمار ۳۷ ..... ۹۷

شکل۳-۱۱. جهش هم معنی g.70220C>T شناسایی شده در بیمار ۱۱ ..... ۹۷

شکل۳-۱۲. جهش هم معنی g.153244T>C شناسایی شده در بیمار ۷ ..... ۹۸

شکل۳-۱۳. نتیجه حاصل از بررسی ساختاری cDNA بیمار کد ۱۱ ..... ۹۹

شکل۳-۱۴. حذف نقطه ای g.42017_42018delTT شناسایی شده در بیمار ۵۴ ..... ۱۰۲

شکل۳-۱۵. حذف نقطه ای g.156761delG شناسایی شده در بیمار ۹۶ ..... ۱۰۳

شکل۳-۱۶. حذف نقطه ای g.59687delC شناسایی شده در بیمار ۱۶۷ ..... ۱۰۴
شکل۳-۱۷. جهش تغییر دهنده نقطه پیرایش اینترون ۱۲ در بیمار کد ۱۴۹ ..... ۱۰۵
شکل۳-۱۸. حذف نقطه ای g.5505_5506delAG شناسایی شده در بیمار ۶۴ ..... ۱۰۶
شکل۳-۱۹. پراکنش جهش ها بر حسب نوع در طول ژن ۱۰۹
شکل۳-۲۰. موقعیت ژن *RB1* و پروب های کناری آن روی کروموزوم ۱۳ ..... ۱۱۱
شکل۳-۲۱. حذف تمام ژنی مشاهده شده در نمونه خون و تومور بیمار کد ۱۲ ..... ۱۱۲
شکل۳-۲۲. نتایج MLPA بر روی نمونه بیماران ۱۱۳
شکل۳-۲۳. کاریوتایپ تهیه شده از بیمار کد ۵۴ ..... ۱۱۴
شکل۳-۲۴. کاریوتایپ تهیه شده از بیمار کد ۶۳ ..... ۱۱۵
شکل۳-۲۵. کاریوتایپ تهیه شده از بیمار کد ۸۶ ..... ۱۱۵
شکل۳-۲۶. تفکیک قطعات مختلف مارکر D13S153 بر روی ژل آکریل آمید ۱۲٪ ۱۱۷
شکل۳-۲۷. تفکیک قطعات مختلف مارکر D13S128 بر روی ژل آکریل آمید ۱۲٪ ۱۱۷
شکل۳-۲۸. آنالیز لینکاژ در خانواده بیمار کد ۲۰۰ ..... ۱۱۸
شکل۳-۲۹. بررسی LOH در نمونه های بیماران با استفاده از مارکر D13S153 ..... ۱۱۹
شکل۳-۳۰. بررسی LOH در نمونه های بیماران با استفاده از مارکر D13S156 ..... ۱۲۰
شکل۳-۳۱. بررسی LOH در نمونه های بیماران با استفاده از مارکر D13S128 ..... ۱۲۰
شکل۳-۳۲. واکنش MS-PCR بر روی نمونه های توموری تیمار شده با سدیم بی سولفیت ۱۲۱
شکل۳-۳۳. واکنش ARMS PCR برای جهش R320X ۱۲۳
شکل۳-۳۴. واکنش ARMS PCR برای جهش R556X ۱۲۳
شکل۳-۳۵. واکنش ARMS PCR برای جهش R579X ۱۲۴
شکل۳-۳۶. واکنش ARMS PCR برای جهش R445X ۱۲۴
شکل۳-۳۷. واکنش ARMS PCR برای جهش R445X ۱۲۵
شکل۴-۱. الگوریتم مربوط به نحوه بررسی ژنتیکی بیماران رتینوبلاستومای فرم دوطرفه..... ۱۶۰

شکل۴-۲. الگوریتم مربوط به نحوه بررسی ژنتیکی بیماران رتینوبلاستومای فرم یکطرفه..... ۱۶۱

فصل اول

مقدمه و

مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱. اپیدمیولوژی

رتینوبلاستوما شایع ترین تومور چشمی در کودکان است که تقریباً با فراوانی ۱ در ۱۸۰۰۰ ، کودکان زیر شش سال را درگیر می کند [۱]. فراوانی بیماری در کشورهای در حال توسعه تا حدی بالاتر می باشد و در کشورهای آمریکای مرکزی و جنوبی فراوانی بالاتری نیز مشاهده می شود به نحوی که رتینوبلاستوما در این نواحی یکی از شایع ترین تومورهای جامد[1] کودکان می باشد (جدول ۱-۱) [۲]. دلیل این فراوانی بالا در این نواحی مشخص نیست. در این زمینه وضعیت ضعیف تر اقتصادی اجتماعی و وجود ویروس پاپیلومای انسانی در بافتهای توموری تا حدی موثر به نظر می رسند [۳]. مطالعاتی وجود دارد که نشان دهنده افزایش میزان برخی بیماریها از جمله رتینوبلاستوما در بین کودکان حاصل از IVF است ولی مطالعات دیگری که اخیراً انجام شده اند و جامعه آماری بزرگتری را شامل می شوند چنین موضوعی را اثبات نمی کنند [۴]. حدود ۸۰٪ از بیماران رتینوبلاستوما در سنین زیر سه سال تشخیص داده می شوند و همچنین بروز بیماری در بین کودکان بالاتر از شش سال بسیار نادر است.کودکانی که فرم دو طرفه بیماری را نشان می دهند ۳۰ تا ۴۵٪ از کل جمعیت بیماران را تشکیل می دهند و همچنین سن بروز بیماری در آنها کمتر می باشد (بین ۱۴ تا ۱۶ ماهگی) در حالیکه سن تشخیص برای بیماران فرم یکطرفه بالاتر و حدود ۲۹ تا ۳۰ ماهگی می باشد [۵, ۶] حدود ۲۰٪ از کودکانی که با فرم دو طرفه شناسایی می شوند دارای سابقه خانوادگی بیماری نیز هستند.

[1] Solid Tumor