بسم الله الرحمن الرحیم

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

خانم مهدیه سلیمی رشته ژنتیک پزشکی رساله دکتری خود را با عنوان: « بررسی ارتباط بیان ژنهای ATM ، Cyclin D1 و شکستهای دو رشته ای DNA با تکثیر ژن HER2 در تومورهای داکتال کارسینومای سرطان سینه » در تاریخ ۱۳۹۰/۱۲/۲۰ 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 راهنما	دکتر حسین مزدارانی	
استاد مشاور	دکتر کیوان مجید زاده	
استاد مشاور	دکتر محمود طولانی	
استاد ناظر	دکتر مهدی فروزنده مقدم	
استاد ناظر	دکترشیرین شهبازی	
استاد ناظر	دکتر جواد توکلی بزاز	
استاد ناظر	دکتر مهرداد بهمنش	
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 آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ۴- 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 ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ 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 **مهدیه سلیمی** دانشجوی رشته **ژنتیک پزشکی** ورودی سال تحصیلی **۸۶** 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

تاریخ ۹۱/۲/۴

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 **جناب آقای دکتر حسین مزدارانی** ، مشاوره **جناب آقای دکتر کیوان مجیدزاده و جناب آقای دکتر محمود طولانی** 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 ۴ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : 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 ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب **مهدیه سلیمی** دانشجوی رشته **ژنتیک پزشکی** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضا

۹۱/۲/۱۴

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

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

عنوان

بررسی ارتباط بیان ژنهای *ATM*، *Cyclin D1* و شکست‌های دو رشته‌ای DNA با تکثیر ژن *HER2* در تومورهای داکتال کارسینومای سرطان سینه

نگارش

مهدیه سلیمی

استاد راهنما

دکتر حسین مزدارانی

اساتید مشاور

دکتر کیوان مجیدزاده

دکتر محمود طولانی

زمستان ۱۳۹۰

تقدیم به:

پدر و مادر مهربان و گرانقدرم

که همواره عزیزترین آموزگارانم بوده و به من درس انسانیت و آزادگی اموختند. حمایت و دعای خیر آنان پشتوانه و سرمایه گرانقدر زندگیم بوده و هست که هر سختی را برایم آسان می‌نماید.

همسر فداکارم

که همواره مشوق و پشتیبانم بوده است.

و دختر عزیزم ملودی

تشکر و قدردانی:

- از زحمات بی‌شائبه، راهنمایی‌های ارزنده و حمایت‌های بی‌دریغ استاد راهنمای گرانقدرم جناب آقای دکتر حسین مزدارانی کمال تشکر و امتنان را دارم. بی‌شک انجام این پایان نامه بدون حمایت‌های ایشان مقدور نبود.
- از زحمات بی شائبه جناب آقای دکتر کیوان مجید زاده و جناب آقای دکتر محمود طولانی اساتید مشاور ارزشمندم بی‌نهایت سپاسگزارم.
- از پرسنل محترم مرکز تحقیقات بیماری‌های پستان، خصوصا سرکار خانمها رضوان اسمعیلی و نسرین عبدلی
- بخش پاتولوژی بیمارستانهای شریعتی و امام خمینی خصوصا سرکار خانم عظیمی
- بخش پرتو درمانی انستیتو پرتوپزشکی نوین و بیمارستان امام خمینی
- دوستان و همراهان عزیزم سرکار خانمها دکتر پگاه قرائیان و دکتر مرجان یغمایی
- و تمامی عزیزانی که از نمونه‌های بافتی آنان در این پایان نامه استفاده کردم.

چکیده:

پروتئین کیناز ATM نقش مهمی در حفظ تمامیت ژنوم از طریق فعال کردن زنجیره واکنش‌های بیوشیمیایی که به فعال کردن نقاط کنترلی چرخه سلولی و ترمیم اسیبDNA می‌انجامد، ایفا می‌کند. سایکلین D1 در تنظیم مرحله G1 چرخه سلولی نقش دارد. مطالعات تجربی و بالینی دخالت آنها را در ترنسفورماسیون و توسعه تومور پیشنهاد می‌کند. توجهات زیاد به دقت روش‌های سنجش HER-2 مبین اهمیت روزافزون وضعیت HER-2 در مدیریت بیماران مبتلا به سرطان سینه می‌باشد. در این تحقیق بررسی ژن HER-2 با استفاده از روش PRINS (Primed *in situ* labeling) که تلفیقی از روش PCR و FISH می‌باشد در مقایسه با تکنیک FISH انجام شد. ارتباط احتمالی بیان در سطح RNA ژنهای ATM و سایکلین D1 در تومورهای داکتال کارسینوما و بافت نرمال مجاور تومور در مقایسه با بافت نرمال پستانی با استفاده از تکنیک Real-Time PCR با استفاده از پروب Taq man مورد بررسی قرار گرفت. همچنین ارتباط بیان ژنهای ATM و سایکلین D1 در تومورهای داکتال کارسینوما در مراحل II و III و نیز ارتباط میزان آسیب‌های DSB باقیمانده القا شده توسط پرتو گاما با استفاده از سنجش γH2AX با تکثیر ژن HER-2 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سایکلین D1 در ۵۱/۴ درصد از تومورهای سینه افزایش بیان دارد حال انکه ATM در ۵۰ درصد از نمونه‌های توموری در مقایسه با بافت‌های مجاور نرمال و نیز گروه کنترل کاهش بیان را نشان داد ($P\leq0.01$). بیان سایکلین D1 در بافت‌های نرمال مجاور تومور و گروه کنترل نرمال تفاوت معنی داری را نشان نداد در حالیکه میزان بیان ATM در بافت نرمال مجاور تومور بیان کمتری نسبت به گروه کنترل نرمال داشت ($P\leq0.01$).افزایش بیان سایکلین D1 با بیان گیرنده‌های استروژن و/یا پروژسترون مرتبط بود در حالیکه کاهش بیان ان بیشتر در تومورهای +HER-2 واجد تکثیر ژن HER-2 دیده شد.کاهش بیان ATM بیشتر در گروه تومورهای سه گانه منفی(- ER-, PR- , HER2) مشاهده گردید. همخوانی دو تکنیک PRINS و FISH در تعیین وضعیت تکثیر ژن HER-2 ۱۰۰٪ محاسبه گردید (۲۷:۲۷). میزان DSB باقیمانده در گروه واجد تکثیر ژن HER-2 در مقایسه با گروه هم ارز فاقد ان بطرز معنی داری کاهش یافت که این امر برحساسیت کم آنها به پرتو گاما دلالت دارد. استفاده از روش سنجش γH2AX در ارزیابی DSB ممکن است جهت پیش بینی حساسیت پرتوی توموری در افراد کارا باشد. همچنین نتایج ما مبین آن است که کاهش بیان ATM و اختلال در بیان سایکلین D1 ممکن است در توسعه و / یا پیشرفت بدخیمی کارسینومای پستان دخالت داشته باشد. PRINS یک تکنیک قابل اعتماد و تکرار پذیر بوده و می‌تواند به عنوان یکی دیگر از روشهای سنجش وضعیت HER-2 درتومورهای پستانیFFPE بکار رود.

واژگان کلیدی: سایکلین D1، ATM، γH2AX، DSB، تابش پرتو، PRINS، HER-2 و داکتال کارسینومای سینه.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱. تاریخچه سرطان سینه ۲

۱-۲. علائم و نشانه‌های سرطان سینه ۳

۱-۳. اپیدمیولوژی سرطان سینه ۴

۱-۳-۱. سرطان سینه در ایران ۵

۱-۴. پاتوفیزیولوژی سرطان سینه ۵

۱-۵. عوامل خطر یا ریسک فاکتورهای سرطان سینه ۶

۱-۶. تشخیص بیماری سرطان سینه ۸

۱-۷. انواع سرطان سینه ۹

۱-۸. رده بندی سرطان سینه ۱۰

۱-۹. غربالگری سرطان سینه ۱۲

۱-۱۰. پیشگیری از ابتلا به سرطان سینه ۱۳

۱-۱۱. اقدامات درمانی سرطان سینه ۱۳

۱-۱۱-۱. جراحی ۱۴

۱-۱۱-۲. درمانهای دارویی ۱۵

۱-۱۱-۲-۱. درمان انسداد هورمونی ۱۵

۱-۱۱-۲-۲. شیمی درمانی ۱۵

۱-۱۱-۲-۳. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ۱۶

۱-۱۱-۳. تشعشع ۱۶

۱-۱۲. پیش اگهی سرطان سینه ۱۷

۱-۱۳. سرطان سینه از منظر روانشناسی ۱۹

۱-۱۴. آسیب DNA و سرطان سینه ۱۹

۱-۱۵. فرایند ترمیم آسیب DNA و نقش آن در ایجاد سرطان ۲۲
۱-۱۵-۱. مکانیسم‌های ترمیم DNA ۲۳
۱-۱۶. سایکلین D1 و سرطان سینه ۲۴
۱-۱۷. ATM و سرطان سینه ۲۷
۱-۱۸. HER-2/neu و سرطان سینه ۳۰
۱-۱۸-۱. روش‌های سنجش HER-2 ۳۲
۱-۱۸-۲. تکنیک PRINS جهت سنجش HER-2 ۳۳
۱-۱۹. ضرورت انجام تحقیق ۳۵
۱-۲۰. فرضیات ۳۶
۱-۲۱. اهداف ۳۶

فصل دوم: مواد و روش‌ها ۳۷

۲-۱. مواد و وسائل مورد نیاز ۳۸
۲-۲. آماده سازی محلول‌ها و بافرها ۴۰
۲-۲-۱. تهیه ژل ۰/۸ درصد اگارز ۴۰
۲-۲-۲. روش تهیه TBE 10X ۴۱
۲-۲-۳. طرز تهیه SSC 20 × ۴۱
۲-۲-۴. طرز تهیه HCl ۰/۲ نرمال ۴۱
۲-۲-۵. طرز تهیه محلول ایزوتیوسیانات ۱ مولار ۴۱
۲-۲-۶. طرز تهیه بافر سیترات ۴۱
۲-۲-۷. طرز تهیه محلول PBS ۴۲
۲-۲-۸. ساخت محیط کشت RPMI- ۱۶۴۰ ۴۲
۲-۲-۹. طرز تهیه لام‌های پوشش داده شده با پلی – ال- لایزین ۴۲
۲-۳. طرح مطالعه ۴۲
۲-۴. نمونه‌های مورد آزمایش ۴۳

۲-۵. روش جمع‌آوری نمونه ۴۳
۲-۶. سنجش بیان ژنهای ATM و سایکلین D1 ..... ۴۴
۲-۶-۱. استخراج RNA از بافت ۴۴
۲-۶-۱-۱. روش الکتروفورز کردن نمونه RNA بر روی ژل اگارز ۰/۸ درصد ۴۵
۲-۶-۱-۲. ظهور باندهای RNA بر روی ژل ۴۵
۲-۶-۳. تیمار RNA جهت حذف DNA ژنومی ۴۶
۲-۶-۴. سنتز cDNA از RNA استخراج شده از بافت ۴۶
۲-۶-۴. طراحی و تهیه پرایمر و پروب جهت تکثیر ژن‌های ATM، Cyclin D1 و بتا اکتین (به عنوان کنترل داخلی) ۴۸
۲-۶-۵. انجام Real-Time PCR جهت تهیه منحنی استاندارد ۴۹
۲-۶-۶. سنجش میزان بیان ژنهای ATM، CCND1 و بتا اکتین با استفاده از تکنیک Real-Time PCR ۵۱
۲-۶-۷. کمی کردن میزان بیان ژنها ۵۲
۲-۶-۸. بررسی معنی دار بودن اماری اطلاعات ۵۳
۲-۷. پروتکول FISH بر روی بافت تومور سینه ۵۳
۲-۷-۱. تشخیص هضم کمتر از حد مناسب بافت ۵۵
۲-۷-۲. نحوه ارزیابی و شمارش لامهای حاصل از رنگ امیزی FISH ۵۸
۲-۸. روش انجام تکنیک PRINS بر روی بافت ۵۸
۲-۸-۱. طراحی پرایمرهای PRINS ۶۱
۲-۸-۲. نحوه ارزیابی و شمارش لامهای حاصل از تکنیک PRINS ۶۳
۲-۸-۳. بررسی اماری داده‌های حاصل از تکنیک‌های PRINS و FISH ۶۳
۲-۹. سنجش میزان شکست‌های دو رشته‌ای DNA القا شده توسط پرتو گاما با استفاده از تکنیک سنجش H2Axγ ۶۴
۲-۹-۱. نمونه گیری و طراحی روش کار ۶۴
۲-۹-۲. تهیه بلوک‌های پارافینه از بافت ۶۴

۲-۹-۳. برش و انتقال به لام بافت‌های پارافینه ۶۵
۲-۹-۴. روش انجام سنجش γH2AX ۶۵
۲-۹-۵. بررسی و کمی کردن foci یا کانونهای فلورسانس ۶۶
۲-۹-۶. بررسی اماری داده‌های حاصل از تکنیک γH2AX ۶۶

فصل سوم: نتایج و یافته‌ها ۶۸
۳-۱. خصوصیات دموگرافیک نمونه‌های بافت توموری داکتال کارسینومای بررسی شده در این پروژه ۶۹
۳-۲. نتایج حاصل از سنجش بیان ژنهای Cyclin D1 و ATM ۷۰
۳-۲-۱. نتایج حاصل از سنجش بیان ژن Cyclin D1 (CCND1) ۷۰
۳-۲-۲. نتایج سنجش بیان ژن ATM ۷۳
۳-۲-۳. نتایج بررسی وضعیت بیان ژنهای ATM و سایکلین D1 در ارتباط با وضعیت ER، PR و HER2 ..... ۷۶
۳-۲-۴. بررسی ارتباط میانگین بیان ژنهای سایکلین D1 و ATM با توجه به تفاوت وضعیت تومور و بیماری و وضعیت منوپاز بیماران ۷۸
۳-۳. نتایج سنجش وضعیت ژن HER2 با استفاده از تکنیک PRINS ۷۸
۳-۳-۱. نتایج بررسی وضعیت سانترومر کروموزوم ۱۷ با استفاده از تکنیک PRINS ۸۰
۳-۴. نتایج بررسی ارتباط تکثیر ژن HER-2 با بیان ژنهای ATM و سایکلین D1 ..... ۸۱
۳-۵. نتایج ارزیابی کارایی تکنیک PRINS در تعیین وضعیت تکثیر ژن HER-2 با استفاده از تکنیک FISH ۸۲
۳-۶. نتایج حاصل از سنجش میزان DSB باقیمانده القایی با استفاده از سنجش γH2AX ۸۶

فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۹۳
۴-۱. بحث و نتیجه‌گیری ۹۴
۴-۲. پیشنهادها ۱۰۹

فهرست منابع و مأخذ ۱۱۰
چکیده انگلیسی ۱۳۲

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول (۲-۱) توالی پرایمرها و پروب‌های استفاده شده در واکنش Real-Time PCR طراحی شده با استفاده از نرم افزار Primer express ورژن ۳ ..... ۴۹

جدول (۲-۲) توالی پرایمرهای استفاده شده در تکنیک PRINS. پرایمرهای HER-2 توسط نرم افزار پرایمر اکسپرس، ورژن ۳ طراحی شد. پرایمر سانترومر کروموزوم ۱۷ قبلا توسط Coullinو همکارانش در سال ۱۹۹۲ استفاده شده بود. ۶۲

جدول (۳-۱) خصوصیات دموگرافیک تومورهای داکتال کارسینومای بررسی شده ۷۰

جدول (۳-۲) میزان بیان و وضعیت بیان ژن سایکلین D1 ..... ۷۱

جدول (۳-۳) میزان بیان و وضعیت بیان ژن ATM ۷۴

جدول (۳-۴) میانگین میزان بیان ژنهای ATM و CCND1 نرمالایز شده با بتا اکتین در مقایسه با گروه کنترل در وضعیت‌های مختلف تومور و وضعیت منوپاز ۷۷

جدول (۳-۵) نتایج بررسی تعداد کپی ژن HER-2 و سانترومر کروموزوم ۱۷ و نرخ نسبت تعداد کپی ژن HER-2 به سانترومر کروموزوم ۱۷ ..... ۸۰

جدول (۳-۶) مقایسه میزان بیان ATM و CCND1 در دو گروه واجد و فاقد تکثیر ژن HER-2 ..... ۸۲

جدول (۳-۷) نتایج حاصل از تعیین وضعیت ژن HER-2 و سانترومر کروموزوم ۱۷ با استفاده از تکنیک‌های PRINS و FISH ۸۳

جدول (۳-۸) مقایسه وضعیت ژن HER-2 بر مبنای نرخ نسبت HER-2/CEN-17 با استفاده از تکنیک‌های PRINS و FISH ۸۴

جدول (۳-۹) مقایسه نتایج بررسی وضعیت HER-2 با استفاده از روش IHC و PRINS در نمونه‌های کنترل مثبت و منفی ۸۴

جدول (۳-۱۰) مقایسه نتایج بررسی وضعیت HER-2 با استفاده از روش IHC و FISH در نمونه‌های کنترل مثبت و منفی ۸۴

جدول (۳-۱۱) مقایسه بررسی وضعیت انوزومی کروموزوم ۱۷ توسط دو تکنیک FISH و PRINS در ۲۱ نمونه IHC 2+..... ۸۶

جدول (۳-۱۲) نتایج حاصل از سنجش γH2AX در بررسی میزان DSB القایی در گروههای توموری داکتال کارسینومای واجد و فاقد تکثیر HER-2 با بیان طبیعی یا کاهش یافته ژن ATM و گروه بافت نرمال مجاور تومور و گروه های کنترل T: تومور N_{adj}: بافت نرمال مجاور تومور، C: بافت نرمال فرد سالم، sham control: نمونه‌های بافت تحت تابش پرتو قرار نگرفته..... ۸۷

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل (۱-۱) شمایی از چرخه سلول و جایگاه عمل برخی از سایکلین‌ها ۲۵

شکل (۱-۲) عملکرد ATM ۲۸

شکل (۲-۱) ظهور باندهای 18S و RNA 28S ریبوزومی حاصل از الکتروفورز نمونه‌های RNA بر ژل اگارز ۰/۸٪..... ۴۶

شکل (۲-۲) منحنی استاندارد مربوط به پرایمرهای الف: سایکلین D1، ب:بتا اکتین، ج:ATM..... ۵۱

شکل (۲-۳) منحنی تکثیر مربوط به ژنهای الف: CCND1، ب: بتا اکتین ج: ATM و نمونه‌هایی از بار گذاری و تکثیر ژن هدف بصورت داپلیکیت (د، ه، و)..... ۵۲

شکل (۲-۴) الف) الگوی رنگپذیری DAPI برای نمونه بافتی با هضم انزیمی بیش از اندازه ب) رنگ امیزی DAPI برای نمونه بافتی با هضم انزیمی مناسب ج) نمونه بافتی با هضم انزیمی کم د) همراه با اوتوفلورسانس زیاد سیتوسولی و زمینه خارج سلولی..... ۵۷

شکل (۲-۵) الف، ب) سیگنالهای قرمز و سبز حاصل از تکنیک PRINS؛ ج، د) حاصل از تکنیک FISH بر روی بافت تومور سینه (سیگنال قرمز-نارنجی نمایانگر ژن HER-2 و سیگنال سبز نمایانگر سانترومر ۱۷ می‌باشد)..... ۶۲

شکل (۲-۶) کانون‌های فلورسانس γH2AX الف، ج)دو نمونه توموری پس از تابش ۴ گری پرتو گاما و پس از ۲۴ ساعت زمان ترمیم د) نمونه sham control ب) رنگ امیزی DAPI نمونه الف..... ۶۷

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار (۳-۱) بررسی نتایج سنجش بیان ژن سایکلین D1 درتومورهای داکتال کاترسینومای سینه: نتایج با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ با ژن اندوژنوس بتا اکتین نرمالایز گشته و در مقایسه با میانگین میزان بیان در بافت نرمال کنترل محاسبه گردید..... ۷۳

نمودار (۳-۲) بررسی درصد وضعیت بیان ژن ATM با استفاده از real-time PCR در تومورهای داکتال کارسینومای سینه. نتایج با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ با ژن اندوژنوس بتا اکتین نرمالایز گشته و در مقایسه با میانگین میزان بیان در بافت نرمال کنترل محاسبه گردید..... ۷۶

نمودار (۳-۳) میانگین بیان ژنهای سایکلین D1 و ATM در گروههای مختلف تومورهای داکتال کارسینوما..... ۷۸

نمودار (۳-۴) وضعیت ژن HER-2 در نمونه های بافتی داکتال کارسینومای سینه با استفاده از تکنیک PRINS..... ۷۹

نمودار (۳-۵) وضعیت انوزومی نمونه‌های بافتی داکتال کارسینومای سینه..... ۸۱

نمودار (۳-۶) مقایسه وضعیت تکثیر ژن HER-2 با استفاده از دو تکنیک PRINS و FISH در سه گروه IHC 0/1+، IHC 2+ و IHC 3+ برای ۲۷ نمونه مورد آزمایش..... ۸۵

نمودار (۳-۷) مقایسه نتایج حاصل از دو تکنیک PRINS و FISH در ارزیابی تعداد کپی ژن HER-2، تعداد کپی سانترومر کروموزوم ۱۷ و نیز نرخ نسبت HER-2/ CEN-17..... ۸۶

نمودار (۳-۸) میانگین تعداد foci شمارش شده در هر سلول در ده بافت تومور و نرمال مجاور توموری بیماران مبتلا به داکتال کارسینوما و ۵ بافت پستانی متعلق به افراد سالم ۲۴ ساعت پس از تابش دهی با دوز ۴ گری پرتو گاما در کنار سه نمونه sham control متشکل از یک نمونه از هرگروه که تحت تابش پرتو گاما قرار نگرفتند اما سایر مراحل را همچون نمونه های پرتو دیده طی کرده‌اند..... ۸۸

نمودار (۳-۹) میانگین تعدادfoci نمایانگر میزان DSB باقیمانده در بافتهای داکتال کارسینوما با بیان نرمال و کاهش یافته ATM و بافت های نرمال پستانی ۲۴ ساعت پس از پرتودهی با دوز ۴ گری پرتو گاما در مقایسه با گروههای sham control که تحت تابش پرتو قرار نگرفتند..... ۹۰

نمودار (۳-۱۰) درصد سلولهای واجد تعداد $\leq$ ۵ foci درهر سلول متعلق به بافتهای داکتال کارسینوما با بیان نرمال و کاهش یافته ATM و بافت های نرمال پستانی ۲۴ ساعت پس از پرتودهی با دوز ۴ گری پرتو گاما در مقایسه با گروههای sham control که تحت تابش پرتو قرار نگرفتند. ۹۰

نمودار (۳-۱۱) میانگین تعدادfoci نمایانگر میزان DSB باقیمانده در بافتهای داکتال کارسینوما با تکثیر یا عدم تکثیر ژن HER-2 و بافت های نرمال پستانی ۲۴ ساعت پس از پرتودهی با دوز ۴ گری پرتو گاما در مقایسه با گروههای sham control که تحت تابش پرتو قرار نگرفتند. ۹۱

نمودار (۳-۱۲) درصد سلولهای واجد تعداد $\leq$ ۵ foci درهر سلول متعلق به بافتهای داکتال کارسینوما همراه با تکثیر یا عدم تکثیر ژن HER-2 و بافت های نرمال پستانی ۲۴ ساعت پس از پرتودهی با دوز ۴ گری پرتو گاما در مقایسه با گروههای sham control که تحت تابش پرتو قرار نگرفتند. ۹۲

فصل اول

مقدمه و

مروری برمطالعات گذشته

۱-۱. تاریخچه سرطان سینه

سرطان سینه بدلیل قابل رویت بودن بدخیمی، نوعی از سرطان است که اغلب در متون قدیمی به ان اشاره شده است. بدلیل کمتر استفاده شدن کالبد شکافی در پزشکی باستان، سرطان اندامهای داخلی کمتر مورد بررسی قرار می‌گرفت. سرطان سینه را می‌توان با لمس پوستی نیز احساس نمود و در موارد پیشرفته به ایجاد بافت‌های نکروز شده و زخم در سطح پوست می‌انجامد که از ان مایعی متعفن و تیره رنگ خارج می‌شود [۱]. قدیمی ترین توضیحات پیرامون سرطان در مصر کشف شده که تاریخ ان به حدود ۱۶۰۰ سال قبل از میلاد مسیح بر می‌گردد. ادوارد اسمیت پاپیروس ۸ مورد تومور یا زخم در سینه را گزارش نموده بود که با سوزاندن زخم یا داغ گذاشتن مداوا شده بود. در نوشته‌های مربوط به این موارد یاد شده بود که" برای این بیماری درمانی وجود ندارد" [۲]. برای قرن‌ها پزشکان موارد مشابهی را در تجربیات خود با همین نتیجه توصیف کردند. طب قدیم، از زمان یونانی‌ها تا قرن ۱۷ بر اساس هومورالیسم[1] استوار بود و این اعتقاد وجود داشت که سرطان سینه عموما در نتیجه عدم توازن مایعات بنیادی که کنترل بدن را عهده دارند ایجاد می‌شود خصوصا در نتیجه افزایش صفرای سیاه، برخی از بیماران نیز ان را تنبیه خدایی می‌دانستند [۲]. در قرن هجدهم طیف وسیعی از توضیحات پزشکی ارائه شد که از ان میان می‌توان به فقدان فعالیت جنسی، فعالیت جنسی زیاد، ایجاد جراحت فیزیکی در سینه، لخته شدن شیر در سینه، اشکال مختلف انسدادهای لیمفاتیک چه بدلایل داخلی و چه به علت استفاده از لباسهای تنگ اشاره نمود [۳] و در قرن ۱۹، یک جراح اسکاتلندی بنام جان رودمن بیان داشت ترس از سرطان علت ایجاد سرطان است و این اضطراب که همچون "ضرب المثلی" از مادر اموخته می‌شود، بصورت استعداد ابتلا به سرطان در خانواده گسترش می‌یابد [۳]. با

1- humoralism