

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه تهران

دانشکده علوم

۱۳۸۰ / ۱۲ / ۲۲

بررسی جهش در اگزونهای ۱ و ۲ ژن k-ras  
با روش غیررادیواکتیو PCR-SSCP در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال

نگارش:

سعید هاشمی بزچلویی

016815

اساتید راهنما:

سرکار خانم دکتر شیده منتصر کوهساری

و سرکار خانم دکتر پروین مهدی پور

۴۰۱۶۹

اساتید مشاور:

آقای دکتر مرتضی عطری و آقای دکتر مرتضی هاشم زاده

پایان نامه برای دریافت کارشناسی ارشد

دورشته زیست شناسی سلولی و مولکولی

بهمن ماه ۱۳۸۰

• بسمه تعالی

• اداره تحصیلات تکمیلی دانشگاه

• احتراماً باطلاع میرساند که جلسه دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد ~~علوم~~ سعید هاشمی بزچلویی

آقای

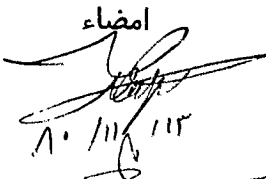
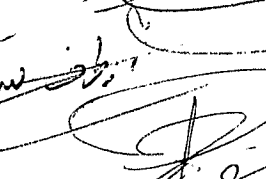
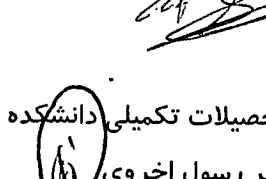
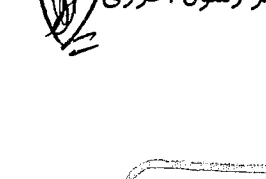
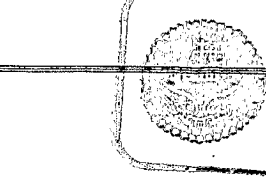
• تحت عنوان: بررسی جهش دراگزون های ۲ و ۱ ژن K-ras در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال با

روش غیر رادیو اکتیو PCR-SSCP

• در تاریخ ۱۳/۱۱/۸۰ درمحل دانشکده علوم دانشگاه تهران برگزار گردید.

هیات داوران براساس کیفیت پایان نامه، استماع دفاعیه و نحوه پاسخ به سئوالات، پایان نامه ایشان را برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی سلولی - مولکولی معادل با ۸ (هشت) واحد با نمره ۱۹/۵ (نورده ونیم) با درجه عالی مورد تأیید قرار دارد.

• هیات داوران براساس

سمت	نام و نام خانوادگی	مرتبه دانشگاهی	دانشگاه	امضاء
۱- استاد راهنما مشترک	خانم دکتر شیده منتصر کوهساری	۱- استادیار	تهران	
۲- استاد مشاور	خانم دکتر پروین مهدی پور	۲- دانشیار	تهران	
۳- استاد مشاور	آقای دکتر مرتضی عطری	دانشیار	تهران	
۳- استاد داور	آقای دکتر مرتضی هاشم زاده	استادیار	تهران	
۴- نماینده تحصیلات تکمیلی	آقای دکتر طاهر نژاد ستاری	استادیار	تهران	

سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده

از طرف دکتر رسول اخروی

مدیر گروه

دکتر حمید فهمی

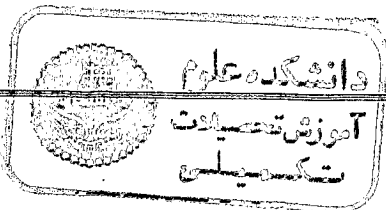


۱۳۸۰/۱۶/۱۴

سرپرست تحصیلات تکمیلی

دکتر طاهر نژاد ستاری





## چکیده

سرطان کولورکتال یکی از مهم رین بیماری ها می باشد که در جهان باعث مرگ می شود و آدنوکارسینومای روده بزرگ دومین سرطان در سراسر جهان بوده و سابقه فامیلی یک خطر قوی برای رشد و توسعه بیماری است. ژن *k-ras* ژن های پیش آگهی دهنده این سرطان بوده و در حدود ۴۰ درصد افراد دارای سرطان کولورکتال دارای جهش در کدون ۱۲ این ژن هستند. ولی وجود جهش در این ژن دلیل بر ایجاد سرطان نیست بلکه باید تغییراتی در ژن های دیگری صورت گیرد تا منجر به سرطان شود. در این بررسی ۲۱ نمونه از بافت آدنوکارسینوما از ۲۱ بیمار ( ۲۱ خانواده ) مبتلا به سرطان کولورکتال بررسی شد، که حداقل یکی از اعضای خانواده خود مبتلا به سرطان بودند. تشخیص جهش در اگزون ۱ و ۲ ژن *k-ras* با روش PCR-SSCP صورت گرفت و بوسیله دستگاه UVP آنالیز شد. ارتباط درجه تمایز ، متاستاز به غدد لنفی ، اندازه تومور و سن بیماران با سرطان کولورکتال بررسی شد و هیچ ارتباط معنی داری مشاهده نشد ( $P>0.05$ ). در این مطالعه ، ۳۸ درصد (۸/۲۱) در اگزون ۱ ژن فوق دارای تغییر باند مشکوک به جهش مشاهده شد و در مورد اگزون ۲ مورد خاصی مشاهده نشد

به یاد پدر عزیز

و تقدیم به مادر مهربانم

که هر چه دارم از محبت پدر و دعای خیر مادر است

و تقدیم به خواهران و برادران بزرگوارم

که مورد محبتشان بوده ام

با تشکر فراوان

از سرکار خانم دکتر منتصر کوهساری و سرکار خانم دکتر مهدی پور

که راهنمایی مرا در انجام پایان نامه بر عهده داشته و تجربیات

فراوانی از ایشان کسب نموده ام.

مرکز اطلاعات و آرکای دیجیتال  
تیم مدیریت

و با تشکر از جناب آقای دکتر عطری و آقای دکتر هاشم زاده که با

وجود مشغله فراوان نهایت همکاری را در انجام این پایان نامه

مبذول داشتند و مشاوره اینجانب را پذیرفتند تشکر می کنم

با تشکر از همکاران و دوستان آزمایشگاه

آقای امید رضا فریدانی

آقای سید سعید حسینی اصل

آقای ناصر پولادی

خانم نصاری زاده

آقای محمد طباطبایی فر



## فصل اول: مقدمه

۱	۱- کلیات
۲	۲- طبقه بندی تومورها
۱۰	۳- کالبد شناسی روده بزرگ
۱۴	۴- بافت شناسی روده بزرگ
۱۶	۵- تومور های روده بزرگ و راست روده
۲۴	۶- تغییرات ژنتیک در سرطان کولورکتال
۲۸	۷- عوامل تغذیه ای موثر در سرطان کولورکتال
	<b>فصل دوم: مواد و روشها</b>
۳۲	۸- طرز تهیه بافر ها و محلول ها
۳۲	۹- طرز تهیه محلول EDTA
۳۲	۱۰- طرز تهیه محلول SDS
۳۳	۱۱- طرز تهیه استات سه مولار
۳۴	۱۲- طرز تهیه SSC
۳۴	۱۳- طرز تهیه تریس یک مولار
۳۵	۱۴- طرز اشباع فنل
۳۷	۱۵- طرز تهیه بافر لیز کننده
۳۷	۱۶- تهیه اکریل امید ۳۰ درصد
۳۸	۱۷- بافر های الکتروفورز
۴۰	۱۹- مراحل استخراج DNA از خون
۴۲	۲۰- طرز استخراج DNA از بافت
۴۳	۲۱- مراحل استخراج DNA از بافت پارانفینه

۴۴	۲۲- طرز استخراج DNA از آگارز
۴۶	۲۳- بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراجی
۴۶	۲۴- روش الکتروفورز DNA بر روی ژل آگارز
۴۶	۲۵- روش اسپکتوفتومتری
۴۷	۲۶- PCR
۴۹	۲۷- مهار کننده ها و تشدید کننده های PCR
۵۲	۲۸- بهینه سازی واکنش PCR
۵۹	۲۹- طرز تهیه ژل آگارز
۶۱	۳۰- طرز تهیه ژل اکریل آمید و پلی اکریل آمید
۶۳	۳۱- روشهای غربالگری جهش
۶۳	۳۲- شکست Rnase
۶۴	۳۳- آزمون پروتئین ناقص (PTT)
۶۴	۳۴- برش شیمیایی جفت شدگی ناجور
۶۵	۳۵- تجزیه و تحلیل هترو دو بلکس (HA)
۶۵	۳۶- شکست آنزیمی جفت شدگی ناجور
۶۶	۳۷- تعیین توالی بوسیله فلئورسانسی
۶۶	۳۸- چند شکلی فضایی تک رشته (SSCP)
۶۸	۳۹- متغییرهای ژل SSCP
۷۱	۴۰- RNA SSCP
۷۳	۴۱- روش های انجام PCR
	<b>فصل سوم: نتایج</b>
۸۱	۴۲- نتایج حاصل از استخراج

۸۷	۴۳- نتایج حاصل از PCR
	فصل چهارم : بحث
۹۵	۴۴- کلیات
۱۰۰	۴۵- بررسی مقایسه ای بر روی ژن k-ras
۱۰۷	۴۶- ارتباط جهش با سن بیماران
۱۰۹	۴۷- ارتباط جهش با درجه تمایز بافتی
۱۱۱	۴۸- ارتباط جهش با اندازه تومور
۱۱۲	۴۹- ارتباط جهش با درگیری با غدد لنفاوی
۱۱۴	۵۰- منابع

# فصل اول

مقدمه

## ۱-۱- کلیات

تاریخچه سرطان<sup>۱</sup> مربوط به زمانهای بسیار قدیم می باشد. به طوری که حتی قبل از تاریخ نیز وجود داشته است. پدر علم پزشکی، بقراط (۴۶۰-۳۷۰ قبل از میلاد) اولین کسی بود که نام سرطان را بنا نهاد و این وجه تسمیه به علت شباهت نحوه گسترش تهاجمی سرطان به بافتهای اطراف، به شکل پای خرچنگ می باشد، اما شناخت واقعی سرطان از اواخر قرن نوزدهم آغاز گردید.

سرطان یکی از ترسناکترین تشخیصها در راستای بالینی و درمانی است و واژه ای عمومی برای تعریف طیف وسیعی از بیماریهایی است که با رشد کنترل نشده جمعیتی از سلولها مشخص می شوند. سرطان بر واحد اساسی حیات در بدن، یعنی سلول اثر می گذارد. سلولهای ناهنجار می توانند ابتدا از یک سلول طبیعی مشتق شوند که منشاء آن می تواند از هر جای بدن باشد و خاصیت تکثیر بی رویه را به نسل های بعدی سلول منتقل کنند. سلولهای متنوع بدن انسان به طور طبیعی رشد کرده و تقسیم می شوند و وظایف خاصی را انجام می دهند و رشد و تقسیم آنها تحت مکانیسم های تنظیمی ویژه است. اما گاهی از این فرایند منحرف می شود و سلولها قدرت تقسیم شدن را حتی هنگام عدم نیاز به سلولهای جدید حفظ می کنند

۱ Cancer در لاتین به معنای خرچنگ می باشد.

و یک توده اضافی به نام تومور یا نئوپلاسم<sup>۱</sup> تشکیل می دهند و برخلاف سلولهای طبیعی و آسیب دیده در اثر بیماری های عفونی، سلولهای سرطانی از نظر استانداردهای معمولی کاملاً سالم می باشند (۴ و ۳).

تومورها از سلولهای در حال تکثیر و استرومای بافت پیوندی دربرگیرنده آنها تشکیل می شوند (۶).

## ۲-۱- طبقه بندی تومورها

تومورها را می توان براساس استقرار در محل جدید به ترتیب به تومورهای اولیه و ثانویه تقسیم کرد. همچنین براساس نشانه های بالینی تومورها به دو نوع خوش خیم و بدخیم طبقه بندی می شوند.

تومورهای اولیه شامل جمعیتی از سلولها می باشند که رشد تراریخت<sup>۲</sup> شده دارند. بدین معنی که به علت وجود جهش در ژنهای خاص می توانند با روشی که سلولهای طبیعی قادر به انجام آن نمی باشند. به طور مکرر تقسیم شوند. همزمان با تکثیر سلولهای تراریخت شده، تومور اولیه نیز بزرگ می شود و حداقل در مراحل نخست، سلولها در نقطه ای که تومور در ابتدا رشد کرده است باقی می مانند و بدین علت تومور اولیه نامیده می شود (۵).

<sup>۱</sup> نئوپلاسم به معنی new form، شکل جدید می باشد.

تومورهای ثانویه از طریق هجوم مستقیم از محل اولیه به بافت‌های اطراف یا به وسیله متاستاز از راه سیستم گردش خون، لنف یا حفره‌های بدن به نقاط دورتری مهاجرت کرده و رشدکننده برخی از سلولهای تومور، درون بافتها و اندامها رشد کرده و همزمان در اعمال طبیعی سلولها اختلال ایجاد می‌کنند.

فرایند انتشار وسیع سلولهای تومور در نقاط دوردست بدن، متاستاز نام دارد که مشکلات شدید درمانی ایجاد می‌کنند. مرگ بیماران سرطانی اغلب در نتیجه ویران شدن اندامهای زنده در نقاط ثانویه یا ضعف عمومی و عفونت و یا آسیب به سیستم ایمنی می‌باشد. تومورهایی که در نقاط ثانویه ایجاد می‌شوند به نام تومورهای ثانویه معروف هستند (۷ و ۵ و ۱).

هنگامی که یک توده سلولی تراریخت شده رشد نشان دهد، تومور یا نئوپلاسم ایجاد شده است که معمولاً حاوی یک میلیارد سلول می‌باشد. اگر این سلولها در یک توده تجمع یابند خوش‌خیم<sup>۱</sup> خواهند بود. تومورهای خوش‌خیم در محلی که ایجاد شده‌اند باقی می‌مانند. تومورها از لحاظ رنگ، ساختار و استحکام تمایل به تمایز شدن از بافت اصلی دارند. تومورهای خوش‌خیم معمولاً نمایی گرد یا بیضوی دارند و غالباً به وسیله یک کپسول کلاژنی احاطه می‌شوند و معمولاً به بافت‌های اطراف تراوش نمی‌کنند و حاشیه‌ای کاملاً مشخص دارند (۴ و ۱). عموماً

<sup>۱</sup> Benign Tumor