بسم الله الرحمن الرحيم

٢٠١٩٩

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
تحویل مدارک

دانشگاه تهران

دانشکده علوم

۱۳۸۰ /۱۲/ ۲۲

بررسی جهش در اگزونهای ۱و۲ 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

۴،۱۶۹

اساتید مشاور:

آقای دکتر مرتضی عطری و آقای دکتر مرتضی هاشم زاده

پایان نامه برای دریافت کارشناسی ارشد

دررشته زیست شناسی سلولی ومولکولی

بهمن ماه ۱۳۸۰

• بسمه تعالی

• اداره تحصیلات تکمیلی دانشگاه

• احتراما" باطلاع میرساند که جلسه دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد ~~خانم~~ آقای سعید هاشمی بزچلویی

• 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

• درتاریخ ۸۰/۱۱/۱۳ 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 تائید قرار دارد .

• هیات داوران براساس

سمت	نام ونام خانوادگی	مرتبه دانشگاهی	دانشگاه	امضاء
۱- استاد راهنما مشترک	خانم دکترشیده منتصرکوهساری	۱-استادیار	تهران	
	خانم دکتر پروین مهدی پور	۲-دانشیار	تهران	
۲- استاد مشاور	آقای دکتر مرتضی عطری	دانشیار	تهران	
۳-استاد مشاور	آقای دکتر مرتضی هاشم زاده	استادیار	تهران	
۳-استاد داور	آقای دکترمهدی زمانی	دانشیار	تهران	
۴- نماینده تحصیلات تکمیلی	آقای دکترطاهرنژاد ستاری	استادیار	تهران	

۸۰/۱۱/۱۳

سرپرست تحصیلات تکمیلی
دکتر طاهر نژادستاری

مدیرگروه
دکتر حمید فهیمی
۸۰/۱۲/۱۰

سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده
ازطرف دکتر رسول اخروی

دانشکده علوم
آموزش تحصیلات تکمیلی

چکیده

سرطان کولورکتال یکی از مهم رین بیماری ها می باشد که در جهان باعث مرگ می شود وآدنوکارسینومای روده بزگ دومین سرطان در سراسر جهان بوده و سابقه فامیلی یک خطر قوی برای رشد و توسعه بیماری است. . ژن k-ras از ژن های پیش آگهی دهنده این سرطان بوده وو در حدود ٤٠ درصد افراد دارای سزطان 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 آدنو کارسینوما 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 ۱و۲ ژن k-ras با روش PCR-SSCP صورت گرفت و بوسیله دستگاه UVP آنالیز شد. ارتباط درجه تمایز ، متاستاز به غدد لنفی ، اندازه تومور وسن بیماران با سرطان کولورکتال بررسی شد وهیچ 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 وبرادران 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 وتجربیات

فراوانی از ایشان کسب نموده ام.

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
تهیه کننده

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

فهرست

صفحه

فصل اول: مقدمه

۱ـکلیات ۱

۲ـطبقه بندی تومورها ۲

۳ـکالبد شناسی روده بزرگ ۱۰

٤ـ بافت شناسی روده بزرگ ۱٤

٥ـ تومور های روده بزرگ و راست روده ۱٦

٦ـ تغییرات ژنتیک در سرطان کولورکتال ۲٤

۷ـ عوامل تغذیه ای موثر در سرطان کولورکتال ۲۸

فصل دوم : مواد و روشها

۸ـ طرز تهیه بافر ها و محلول ها ۳۲

۹ ـ طرز تهیه محلول EDTA ۳۲

۱۰ـ طرز تهیه محلول SDS ۳۲

۱۱ـ طرز تهیه استات سه مولار ۳۳

۱۲ـ طرز تهیه SSC ۳٤

۱۳ـ طرز تهیه تریس یک مولار ۳٤

۱٤ـ طرز اشباع فنل ۳٥

۱٥ـ طرز تهیه بافر لیز کننده ۳۷

۱٦ـ تهیه اکریل امید ۳۰ درصد ۳۷

۱۷ـ بافرهای الکتروفورز ۳۸

۱۹ـ مراحل استخراج DNAاز خون ٤۰

۲۰ـ طرز استخراج DNA از بافت ٤۲

۲۱ـ مراحل استخراج DNAاز بافت پارافینه ٤۳

فهرست	صفحه

۲۲- طرز استخراج DNA از آگارز	٤٤
۲۳- بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراجی	٤٦
۲٤- روش الکتروفورز DNA بر روی ژل آگارز	٤٦
۲٥- روش اسپکتوفتومتری	٤٦
۲٦- PCR	٤٧
۲۷- مهار کننده ها و تشدید کننده های PCR	٤٩
۲۸- بهینه سازی واکنش PCR	٥۲
۲۹- طرز تهیه ژل آگارز	٥۹
۳۰- طرز تهیه ژل اکریل آمید و پلی اکریل آمید	٦۱
۳۱- روشهای غربالگری جهش	٦۳
۳۲- شکست Rnase	٦۳
۳۳- آزمونپروتئین ناقص(PTT)	٦٤
۳٤- برش شیمیایی جفت شدگی ناجور	٦٤
۳٥- تجزیه وتحلیل هترودوبلکس (HA)	٦٥
۳٦- شکست آنزیمی جفت شدگی ناجور	٦٥
۳۷- تعیین توالی بوسیله فلئورسانسی	٦٦
۳۸- چند شکلی فضایی تک رشته (SSCP)	٦٦
۳۹- متغییرهای ژل SSCP	٦۸
٤۰- RNA SSCP	۷۱
٤۱- روش های انجام PCR	۷۳
فصل سوم: نتایج	
٤۲- نتایج حاصل از استخراج	۸۱

صفحه

فهرست

۴۳- نتایج حاصل از PCR ۸۷

فصل چهارم : بحث

۴۴- کلیات ۹۵

۴۵- بررسی مقایسه ای بر روی ژن k-ras ۱۰۰

۴۶- ارتباط جهش با سن بیماران ۱۰۷

۴۷- ارتباط جهش با درجه تمایز بافتی ۱۰۹

۴۸- ارتباط جهش با اندازه تومور ۱۱۱

۴۹- ارتباط جهش با درگیری با غدد لنفاوی ۱۱۲

۵۰- منابع ۱۱۴

فصل اول

مقدمه

۱-۱- کلیات

تاریخچه سرطان[1] مربوط به زمانهای بسیار قدیم می‌باشد. به طوری که حتی قبل از تاریخ نیز وجود داشته است. پدر علم پزشکی، بقراط (٤٦٠-٣٧٠ 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 می‌باشد، اما شناخت واقعی سرطان از اواخر قرن نوزدهم آغاز گردید.

سرطان یکی از ترسناکترین تشخیص‌ها در راستای بالینی و درمانی است و واژه‌ای عمومی برای تعریف طیف وسیعی از بیماریهایی است که با رشد کنترل نشده جمعیتی از سلول‌ها مشخص می‌شوند. سرطان بر واحد اساسی حیات در بدن، یعنی سلول اثر می‌گذارد. سلولهای ناهنجار می‌توانند ابتدا از یک سلول طبیعی مشتق شوند که منشاء آن می‌تواند از هر جای بدن باشد و خاصیت تکثیر بی‌رویه را به نسل‌های بعدی سلول منتقل کنند. سلولهای متنوع بدن انسان به طور طبیعی رشد کرده و تقسیم می‌شوند و وظایف خاصی را انجام می‌دهند و رشد و تقسیم آنها تحت مکانیسم‌های تنظیمی ویژه است. اما گاهی از این فرایند منحرف می‌شود و سلول‌ها قدرت تقسیم شدن را حتی هنگام عدم نیاز به سلولهای جدید حفظ می‌کنند

---

۱ Cancer در لاتین به معنای خرچنگ می‌باشد.

و یک توده اضافی به نام تومور یا نئوپلاسم[1] تشکیل می‌دهند و برخلاف سلولهای طبیعی و آسیب‌دیده در اثر بیماری‌های عفونی، سلولهای سرطانی از نظر استانداردهای معمولی کاملاً سالم می‌باشند(٤ و٣).

تومورها از سلولهای در حال تکثیر و استرومای بافت پیوندی دربرگیرنده آنها تشکیل می‌شوند(٦).

۲-۱- طبقه‌بندی تومورها

تومورها را می‌توان براساس استقرار در محل جدید به ترتیب به تومورهای اولیه و ثانویه تقسیم کرد. همچنین براساس نشانه‌های بالینی تومورها به دو نوع خوش‌خیم و بدخیم طبقه‌بندی می‌شوند.

تومورهای اولیه شامل جمعیتی از سلولها می‌باشند که رشد تراریخت[2] شده دارند. بدین معنی که به علت وجود جهش در ژنهای خاص می‌توانند با روشی که سلولهای طبیعی قادر به انجام آن نمی‌باشند. به طور مکرر تقسیم شوند. همزمان با تکثیر سلولهای تراریخت شده، تومور اولیه نیز بزرگ می‌شود و حداقل در مراحل نخست، سلولها در نقطه‌ای که تومور در ابتدا رشد کرده است باقی می‌مانند و بدین علت تومور اولیه نامیده می‌شود(٥).

---

۱ نئوپلاسم به معنی new form، شکل جدید می‌باشد.

2 Transformed

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[1] خواهند بود. تومورهای خوش‌خیم در محلی که ایجاد شده‌اند باقی می‌مانند. تومورها از لحاظ رنگ، ساختار و استحکام تمایل به متمایز 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 (٤ و ۱). عموماً

[1] Benign Tumor