بسم الله الرحمن الرحیم

مدیریت تحصیلات تکمیلی
دانشکده علوم پایه
گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی- ژنتیک

تعیین چند شکلی ژن *CYP1B1* در نمونه های تومور راست روده در استان سیستان و بلوچستان

اساتید راهنما:
دکتر احمد راشکی
دکتر جلیل مهرزاد

اساتید مشاور:
دکتر عباس بهاری
دکتر فرزانه خادم ثامنی

تهیه و تدوین:
حسین رفیق دوست

بهمن ۹۳

تقدیم به :

پدر و مادر عزیز و مهربانم

که در سختی‌ها و دشواری‌های زندگی، همواره یاوری دلسوز و فداکار

و پشتیبانی محکم و مطمئن برایم بوده‌اند

سپاسگزاری :

از استاد گرامیم جناب آقای دکتر راشکی بسیار سپاسگذارم چرا که بدون راهنماییهای ایشان تامین این پایان نامه بسیار مشکل مینمود.

از جناب آقای دکتر بهاری و به ویژه جناب آقای دکتر مهرزاد به دلیل یاریها و راهنماییهای بی چشمداشت ایشان که بسیاری از سختیها را برایم آسانتر نمودند، سپاسگذارم.

جا دارد از استاد محترم و دلسوز، سرکار خانم دکتر فرزانه خادم ثامنی که در کمال سعه صدر، از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند، کمال تشکر و قدردانی را به عمل آورم.

بر خود لازم می دانم از زحمات و تلاشهای ارزشمند استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر **خزائی** که در این مدت کمک شایانی به اینجانب نمودند تشکر و قدردانی نمایم.

همچنین در اینجا از همکاری سرکار خانم مهندس مالکی که بودن در کنارشان یکی دیگر از مراحل تحصیل را به خوبی برایم رقم زد، تشکر می کنم.

چکیده

امروزه ابتلا به انواع مختلف سرطان از جمله مخاطرات اصلی حیات بشری به شمار می‌آید. یکی از انواع این بیماری سرطان کولورکتال (CRC) است. در این مطالعه ارتباط ژنتیکی ژن سیتوکروم p450 به نام *CYP1B1* را با سرطان کولورکتال در نمونه‌های به دست آمده از تومورهای سرطانی منطقه سیستان و بلوچستان مورد ارزیابی قرارداده شده است. در این تحقیق با هدف یافتن پلی مورفیسم در ژن *CYP1B1* در بیماران سرطان روده بزرگ، ابتدا تعداد ۳۰ نمونه بافت پارافینه‌ی از آرشیو بیمارستان امیرالمومنین زاهدان و آزمایشگاه تشخیص طبی دانش تهیه گردید. DNA ژنومی با استفاده از کیت مخصوص استخراج گردید. DNA استخراج شده با استفاده از پرایمرها اختصاصی دارای سایت برشی به جهت کلونینگ ، این ژن به طول ۱۶۵۸ صورت پذیرفت و سپس برای توالی یابی و مشاهده‌ی SNP های احتمالی به شرکت ماکروژن کره فرستاده شد.

در نهایت با توجه به نتایج به دست آمده و عدم اختلاف در توالی به دست آمده با توالی رفرنس پلی مورفیسمی مشاهده نشد.

کلمات کلیدی : سرطان روده، چند شکلی، *CYP1B1*

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول: مقدمه و کلیات ۱
۱-۱- مقدمه ۲
۱-۲- اهداف ۲
۱-۳- سرطان ۳
۱-۴- اهمیت سرطان روده بزرگ انسان ۴
۱-۵- خانواده سیتوکروم P450 ..... ۱۲
۱-۶- ژن *CYP1B1* ۱۲
فصل دوم: مروری بر تحقیقات گذشته ۱۴
۲-۱- سرطان روده بزرگ ۱۵
فصل سوم: مواد و روش ها ۱۹
۳-۱- مواد و روش ها ۲۰
۳-۱-۱- تهیه نمونه های بافت پارافینه سرطان روده بزرگ انسان ۲۰
۳-۲- محلول های مورد استفاده ۲۰
۳-۲-۱ طرز تهیه محلولها و بافرهای مورد نیاز در الکتروفورز ژل آگارز ۲۰
۳-۲-۲ محلول EDTA ۲۰
۳-۲-۳ بافر الکتروفورز TBE (۵x) ۲۱
۳-۲-۴- محلول اتیدیوم برماید (۱۰ mg/ml) ۲۱
۳-۲-۵ بافر سنگین کننده (type III-6x) ۲۱
۳-۲-۶ طرز تهیه بافر TE ۲۱
۳-۳- طرز تهیه محلولهای مورد استفاده در کلونینگ ۲۱
۳-۳-۱- کلرید کلسیم ۱۰۰ میلی مولار ۲۱
۳-۳-۲- محلول غلیظ آنتی بیوتیک آمپیسیلین: ۲۲
۳-۳-۳ محیط کشت باکتری Louri Broth(LB)مایع ۲۲
۳-۳-۴- محیط کشت LB جامد ۲۳
۳-۴- استخراج DNA ۲۳

۳-۵- تعیین کیفیت DNA ۲۴
۳-۶- PCR برای تکثیر ژن CYP1B1 ..... ۲۴
۳-۷- بهینه سازی شرایط PCR ۲۵
۳-۸- باکتری مورد استفاده ۲۵
۳-۹- کیتهای استفاده شده در این تحقیق ۲۶
۳-۹-۱- کیت استخراج DNA از ژل (Gel Purification Kit) شرکت Bioneer ۲۶
۳-۹-۲- کیت استخراج پلاسمید در مقیاس کم (Mini Prep Kit) شرکت Bioneer ۲۶
۳-۹-۳- کیت Clean up(PCR Purification Kit) شرکت Bioneer ۲۷
۳-۱۰- ذخیره باکتری ۲۸
۳-۱۱- کلونینگ در وکتور pIRES2 ..... ۲۸
۳-۱۱-۱- انجام واکنش الحاق محصول PCR با پلاسمید PIRES2-AcGFP1 ..... ۲۸
۳-۱۲- ترانسفورماسیون محصول الحاق به باکتری E. coli DH5α ۲۹
۳-۱۲-۱- مستعد کردن باکتری E. coli DH5α ۲۹
۳-۱۳- ترانسفورماسیون ۳۰
۳-۱۴- انتخاب کلون ۳۰
فصل چهارم: نتایج و بحث ۳۱
۴-۱- نتایج ۳۲
۴-۲- بحث ۳۸
منابع ۴۳
ضمیمه الف: نمونه هایی از نتایج توالی یابی بدست آمده ۴۸

فهرست اشکال

عنوان صفحه

شکل ۱-۱ نمای شماتیک از ژن .*CYP1B1* ۱۳
شکل ۱-۴ نمونه هایی از DNA بدست آمده از بافتهای پارافینه سرطان روده بزرگ..... ۳۳
شکل ۲-۴ نمونه محصول PCR مرتبط با قطعه تکثیر شده *CYP1B1*..... ۳۴
شکل ۳-۴ نمای شماتیک وکتور بیانی به منظور کلون *CYP1B1* در آن. ۳۵
شکل ۴-۴ پرایمرهای بکار رفته برای تکثیر ژن *CYP1B1* در نمونه های DNA..... ۳۵
شکل ۵-۴ باندهای مربوط به پلاسمید pIRES2 قبل و بعد از اضافه کردن قطعه insert ۳۶
شکل ۶-۴ قسمت های انتخاب شده از نمونه توالی شده شماره دو ۳۷
شکل ۷-۴ توالی یابی ژن *CYP1B1* در نمونه بافت سرطان ۳۸

فهرست جداول

عنوان صفحه

جدول ۱-۲ مقالاتی که تا سال ۲۰۱۴ در رابطه با ارتباط دو سیتوکروم P450 شامل *CYP1B1* و *CYP1A2* با سرطان روده بزرگ ۱۷
جدول ۱-۳ محلول EDTA (pH=۸ و 0.5 M) ۲۰
جدول ۲-۳ بافر الکتروفورز TBE (۵x) ۲۰
جدول ۳-۳ بافر سنگین کننده (type III-6x) ۲۱
جدول ۴-۳ طرز تهیه بافر TE ۲۱
جدول ۵-۳ محیط کشت باکتری LB مایع ۲۲
جدول ۶-۳ محیط کشت باکتری LB جامد ۲۳
جدول ۷-۳ مواد لازم برای PCR ۲۴
جدول ۸-۳ برنامه PCR ۲۴
جدول ۹-۳ موارد استفاده در واکنش الحاق محصول PCR با پلاسمید PIRES2-AcGFP1 ..... ۲۸
جدول ۱-۴ فهرست تغییرات در توالی نوکلئوتیدهای ژن *CYP1B1* ۳۷

فصل اول:

مقدمه و کلیات

۱-۱- مقدمه

امروزه ابتلا به انواع مختلف سرطان ها از جمله مخاطرات اصلی حیات بشری به شمار می آید. یکی از انواع این بیماری سرطان کولون و رکتال Colorectal cancer است که رده سوم یا چهارم ابتلا را در ایران و آسیا دارد.

۱-۲- اهداف

هدف از این تحقیق به دست آوردن تنوع آللی *CYP1B* در نمونه های ژن سیتوکروم P450 می باشد. سیتوکروم P450 در ایجاد تومور کولورکتال موثر است. پروتئین های این ژن از دو جنبه درایجاد تومورها حائز اهمیت هستند. نقش اول آنها به دلیل خاصیت مونواکسیژنازی است که تقریبا تمامی زنوبیوتیک‌ها مسیر متابولیسم‌شان از طریق اکسیداسیون با این پروتئین‌ها است و اکسید شدن برخی از آنها مانند بیوتین و آفلاتوکسین باعث فعال شدن و صدمه به DNA و متعاقب آن توموری شدن سلول است. از طرف دیگر این سوپرخانواده‌ی پروتئینی مسئول اصلی متابولیسم دارو از جمله داروهای ضد سرطان است. بنابراین هر گونه جهش و تنوع در ژن این پروتئین‌ها می‌تواند هم در ایجاد و توسعه تومور دخالت نموده و هم مراحل درمان را تحت تاثیر قرار دهد. هدف نهایی این مطالعه یافتن ژنوتیپ خاصی در ژن *CYP1B1* در پروتئین سیتوکروم P450 در نمونه‌های به دست آمده از انواع مختلف تومور کولورکتال در مقایسه با توالی موجود در دیتابیس جهانی این ژن است. همچنین هدف دیگر این تحقیق مقایسه نتایج در منطقه مورد آزمایش با سایر گزارشگرهای دیگر مناطق ایران و دیتابیس جهانی است.

در همین راستا در آزمایش حاضر ما به دنبال یافتن این ارتباط در نمونه های بافت پارافینه سرطان روده بزرگ در استان سیستان و بلوچستان هستیم. بر طبق بیشترین و بهترین مطالعات انجام شده، تاکنون بر روی نمونه های بافت پارافینه این سرطان و ارتباط آن با توالی *CYP1B1* تحقیقی صورت نپذیرفته است.

۳-۱- سرطان

اصطلاح سرطان به تومور هایی اطلاق می شود که می توانند به بافت های مجاور خود که از سلول های سالم تشکیل شده اند حمله کنند. توانایی مهاجرت و هجوم سلول‌های توموری عامل طبقه بندی تومورها به دو دسته خوش خیم و بد خیم است. اگر یک تومور بدخیم به یک رگ خونی یا لنفی برسد می‌تواند متاستاز دهد و در بافت دورتری رشد کند. نئوپلاسم[1] (که معنی تحت اللفظی آن رشد جدید است)، شکل غیر طبیعی رشد سلول ها است و تومور، نئوپلاسمی است که با وضعیت بیمارگونه همراه است. تومورها، بیماری‌هایی هستند که در آنها جمعیتی از سلول های به لحاظ ژنتیکی هم خانواده توانایی رشد ناهنجار را کسب می کنند (نخعی سیستانی و همکاران، ۱۳۸۹).

دانش کنونی از مکانسیم های سرطان پیشنهاد کننده‌ی این مطلب است که علت ایجاد همه‌ی سرطان‌ها ناشی از هر دو عامل محیطی و ژنتیکی است (Clapp *et al*., 2005). عوامل ژنتیکی، هورمونی و ویروسی روی سرطان تاثیر می‌گذارند. باقی ماندن تغییراتی مانند آسیب بافتی، تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی (مثل جهش، از دست دادن هتروزیگوسیتی و متیلاسیون پروموتور) و تغییرات ترانسکریپتوم (مثل التهاب و مسیرهای آپاپتوز) در دراز مدت منجر به فعال شدن مسیرها و عملکردهای سلولی نابجا (به عنوان مثال: عدم تنظیم تکثیر و آپاپتوز) گشته، در نهایت منجر به تغییرات پیش‌سرطانی می‌گردد. در نتیجه‌ی اضافه شدن تغییراتی مانند: رگزایی و تهاجم سرطان پیشرفته و متاستاز ایجاد شود. بسیاری از تغییرات مولکولی سرطان در مراحل پیشرفته بیماری نیز رخ می‌دهد (Roy *et al*.,2008). سرطان به وسیله تغییر در انکوژن‌ها، ژن‌های سرکوبگر تومور و ژن‌های micro RNA ایجاد می‌شود. یک تغییر ژنتیکی به ندرت برای توسعه یک تومور بدخیم کافی است. بیشتر شواهد به یک فرایند چند مرحله‌ای از تغییرات پی در پی در انکوژن‌های

[1] Neoplasm

مختلف، ژن‌های سرکوبگر تومور، یا ژن‌های microRNA در سلول های سرطانی اشاره دارند (Croce, 2008).

یک ژن سرکوب کننده‌ی تومور نوعی ژن است که به وسیله‌ی جهش‌های حذف عملکرد[1] ایجاد می‌شود. ژن‌های سرکوب کننده‌ی تومور فرایندهای اصلی مسؤول حفظ بخش‌های پایدار بافتی را کنترل می‌کنند. این فرایندها شامل حفظ تمامیت ژنتیکی[2]، پیشرفت چرخه‌ی سلولی، تمایز، بر همکنش‌های سلولی و مرگ می‌باشند. غیر فعال شدن این ژن‌ها موجب حذف هموستازی بافتی می‌شود که مشخصه‌ی یک تومور در حال گسترش است (نخعی سیستانی و همکاران، ۱۳۸۹).

یافتن ژن‌های سرکوبگر به دلیل مشکل بودن برپایی روشی برای مشاهده‌ی یک اثر منفی، دشوار می‌باشد. وجود ژن های سرکوبگر در اوائل سال ۱۹۷۰ توسط Knudson پیش بینی شده بود (Ponder, 1992). بر اساس فرضیه‌ی دو ضربه‌ای سرطان‌زایی Knudson، جهش در هر دو آلل مادری و پدری، برای غیر فعال کردن عملکرد ژن سرکوب گر تومور نیاز است. نتیجه‌ی غیر فعال شدن این ژنها بی‌ثباتی در ژنوم و افزایش نرخ جهش در ژن‌هاست (Knudson, 1971).

۴-۱- اهمیت سرطان روده بزرگ انسان

سرطان کولون و رکتوم را سرطان کولورکتال گویند (Kang *et al.*, 2011). بررسی‌های انجام شده حاکی از این است که در صورت شناسایی سرطان کولورکتال در مراحل ابتدایی، شانس بهبودی کامل مبتلایان به این بدخیمی در حدود ۹۰٪ می‌باشد ولی در صورتی که تشخیص و درمان این سرطان تعویق ایجاد شود بدخیمی وارد مراحل پیشرفته و غیرقابل درمان خود می‌شود (Ma *et al* ., 2009). سرطان‌های تهاجمی که محدود به درون دیواره کولون هستند (گره‌های متاستازی تومور)، قابل درمان بوده، اما اگر درمان نشوند، آنها به گره‌های لنفی انتشار یافته و سپس به محل‌های دورتر متاستاز می‌یابند (Sanford and Bertagnolli., 2009). این سرطان می‌تواند به

[1] Loss-of-function mutation
[2] Genetic integrity

گره‌های لنفی، کبد، ریه، پرده صفاق، تخمدان‌ها و مغز گسترش و متاستاز داشته باشد (Blomqvist *et al.*, 1997). در مراحل ۱و۲ سرطان کولورکتال امکان درمان این سرطان با عمل جراحی وجود دارد ولی همچنان احتمال بهبودی در مرحله ۴ بسیار ضعیف است (Ma *et al.*, 2009). سرطان کولورکتال به دو شکل عمده وجود دارد: سرطان کولورکتال پراکنده یا خودبه‌خودی (sporadic) و سرطان کولورکتال موروثی (Kang *et al.*, 2011).

خطر مبتلا شدن به سرطان کولورکتال در طول زندگی در حدود ۶٪ برآورد شده است. متاسفانه سرطان کولورکتال تا رسیدن به مراحل پیشرفته بیماری شناسایی نمی‌شود و این سرطان پروگنوز بسیار پایینی دارد (Ma *et al.*, 2009).

روده بزرگ از دریچه‌ی ایلئوسکال روده‌ی کوچک تا آنوس گسترش یافته است و شامل: آپاندیس، کولون، رکتوم و کانال آنال می‌باشد. بنا به موقعیت، کولون به قسمتهای مختلف تقسیم شده است: سکوم، کولون صعودی، زاویه‌ی کبدی، کولون عرضی، زاویه‌ی طحالی، کولون نزولی، و کولون سیگموئید (میبدی و همکاران، ۱۳۸۲ و ACS., 2012).

کولون از انتهای ایلئوم شروع می‌شود و در پرومونتوری ساکروم، جائی که تنیاکولی‌ها حالت باند-های مشخص و مجزای خود را از دست می‌دهند، پایان می‌یابد. تنیاکولی‌ها سه نوار عضله‌ی طولی هستند که در فواصل ۱۲۰ درجه از هم در محیط کولون قرار گرفته‌اند. رکتوم در سطح پرومونتوری سارکوم جایی که سه تنیاها پخش می‌شوند و یک لایه عضلانی طولی صاف کامل تشکیل می‌دهند شروع می‌شود. رکتوم به پایین تا سطح عضلات بالا برنده‌ی مقعد ادامه پیدا می-کند و طول آن از ۱۲ تا ۱۵ سانتیمتر فرق می‌کند. کانال جراحی آنال که حدوداً ۴ سانتیمتر می-باشد، قسمت انتهایی روده‌ی بزرگ است که از بین عضلات بالا رونده‌ی مقعد عبور می‌کند و به لبه‌ی مقعد باز می‌شود (میبدی و همکاران، ۱۳۸۲).

در طول هفته‌ی چهارم حاملگی، روده‌ی اولیه که شامل پیش روده، میان روده، و پس روده می-باشد، تشکیل می‌شود. میان روده به روده کوچک (که از نقطه‌ی ورودی مجرای صفراوی شروع می‌شود) و بخشی از روده‌ی بزرگ که پیش از نقطه‌ی میانی کولون عرضی قرار گرفته تبدیل می-شود. خون این بخش از روده توسط شریان مزانتریک فوقانی تأمین می‌گردد. پس روده بخشی از روده بزرگ که پس از نقطه‌ی میانی کولون عرضی قرار گرفته نیز قسمت پرگزیمال مقعد و مجرای ادراری تناسلی تحتانی تبدیل می شود و منبع اصلی تأمین خون آن شریان مزانتریک تحتانی است. قسمت دیستال مجرای آنال خون خود را از شاخه‌های شریان پودندال داخلی به دست می-آورد و منشأ اکتودرمی دارد.

در طول هفته‌ی ششم حاملگی، میان روده به خارج از حفره‌ی شکمی منتقل می‌گردد. پیش از آنکه میان روده موقعیت نهایی خود را در حفره‌ی شکمی به دست آورد، در طول جهار هفته‌ی بعدی در خلاف جهت عقربه های ساعت حول شریان مزانتریک فوقانی ۲۷۰ درجه می‌چرخد.

انتهای پس روده به کلواک ختم می‌گردد، که در هفته‌ی ششم توسط دیواره‌ی آنورکتال به دو بخش شکمی و پشتی یعنی سینوس ادراری تناسلی و رکتوم تقسیم می‌شود. تکمیل مجرای آنال در انتهای هفته‌ی هشتم است یعنی هنگامی که غشاء نازک آنال پاره می‌شود خط دندانه‌ای[1] در قسمت تحتانی مجرای آنال مشخص کننده‌ی مرز بین پس روده‌ی اندودرمی و بافت اکتودرمی می‌باشد (میبدی و همکاران،۱۳۸۲)

دیواره روده‌ی بزرگ شامل شش لایه است: مخاط، موسکولاریس موکوزا، زیر مخاط، موسکولاریس پروپریا، چربی زیر سروزی و سروز، رکتوم نیز بافت مشابهی دارد ولی سروز ندارد. ضمائم اومنتومی حفراتی هستند که از چربی پر شده‌اند.

[1] Dentable lin

مخاط، داخلی ترین لایه‌ی روده بزرگ و رکتوم است. لایه‌ای صاف و کمرنگ که شامل ردیف منظمی از غدد است. مخاط کولورکتال مانند روده‌ی باریک نیست و فاقد ویلوس است. در عوض شامل Lieberkuhn است که حفره‌های عمیقی است که از معادل هیستولوژیکش در روده‌ی باریک، عمیق‌تر می‌باشد. روده‌ی بزرگ توسط یک لایه از اپیتلیوم استوانه‌ای پوشیده شده است. این اپیتلیوم روی غشای پایه‌ای قرار دارد که شامل مقادیر متفاوتی از موسین می‌باشد (میبدی و همکاران، ۱۳۸۲). سطح مخاط سالم روده از پیچ خوردگی‌هایی به نام غار تشکیل شده است که سطح روده بزرگ را به حداکثر می‌رسانند. این پیچ خوردگی‌ها توسط یک لایه از سلول‌های اپیتلیال گابلت ترشح‌کننده‌ی موکوس و سلول‌های نورواپیتلیال تشکیل شده است. در قسمت پایین هر غار حدود ۶-۴ سلول بنیادی وجودی دارد که سلول‌های بالغ غار از آن شکل می‌گیرند. عمدتاً در یک سوم پایینی غار تقسیم سلولی روی می‌دهد و در دو سوم بالایی، سلول‌ها متمایز شده و به سمت نوک غار حرکت کرده و در درون لومن منتشر می‌شوند. سلول‌های اپیتلیال یک غار، کلونی از سلول‌های بنیادی می‌باشند (نخعی سیستانی و همکاران، ۱۳۸۹).

موسکولاریس موکوزا لایه‌ی طولی خارجی نازک و یکپارچه‌ای است که در اطراف مخاط قرار دارند. در کولون شکمی لایه‌ی خارجی آن کلفت می‌شود و سه باند طولی با پهنایی حدود ۱۰-۵ میلیمتر به نام تنیاکولی را تشکیل می‌دهد.

زیر مخاط بین عضله‌ی حلقوی و موسکولاریس موکوزا قرار دارد. زیر مخاط قویترین لایه‌ی میکروسکوپی است. این لایه شامل شبکه‌ی وسیعی از عروق و اعصاب مایسنر است. زیر مخاط در آپاندیس به طور ناقص توسعه پیدا کرده است. موسکولاریس پروپریا شامل لایه‌ی داخلی حلقوی و لایه‌ی خارجی طولی است و از جنس عضله صاف است. مجاری لنفاوی در الگویی حلقوی و بین دو لایه‌ی عضلانی و چربی زیر سروزی قرار دارد و این از نظر کلینیکی مهم است. این ارتباطات آناتومیک در اصل نحوه‌ی گسترش زیر مخاطی کانسرهای کولونی و رکتال را توضیح می‌دهند.

سروز خارجی‌ترین لایه‌ی روده‌ی بزرگ است که یکنواخت است و این یکپارچگی بخصوص در یک سوم فوقانی رکتوم به چشم می‌خورد و در همین قسمت صفاق احشایی ساخته می‌شود. تمام لایه-های میکروسکوپیک کولون و رکتوم در تعیین مراحل بالینی و پاتولوژیک بیماریها و نحوه‌ی برخورد با آنها می‌توانند رهنمون باشند (میبدی و همکاران، ۱۳۸۲).

فاکتورهای مختلفی در تبدیل موکوس روده بزرگ به سرطان دخالت دارند. عوامل محیطی و ژنتیکی هر دو از عوامل مهم در ایجاد این بیماری هستند(Casciato and lowitz., 2001 and Ettarh, 2012). سن زیاد، رژیم غذایی سرشار از چربی و فاقد فیبر، مصرف بالای الکل، بی‌تحرکی، قرار گیری در معرض پرتوها و مصرف سیگار از جمله فاکتورهای ایجاد سرطان کولورکتال است (Kinzler and Vogelstein., 2002).

چنین فرض می‌شود که رژیم با فیبر بالا زمان ترانزیت کولون را پایین می‌آورد، و در نتیجه زمان تماس کارسینوژن‌ها با مخاط روده‌ی بزرگ را کاهش می‌دهد. به علت افزایش حجم مدفوع، غلظت کارسینوژن‌ها پایین می‌آید.

آسیب شناسی کارسینومای کولورکتال، پیچیده و چندعاملی می باشد بطوری که ژن‌های متعددی در مسیرهای ژنتیکی گوناگون در پیشرفت و توسعه آن دخالت دارند (منتظر حقیقی و همکاران، ۱۳۸۷). تجمع پیش رونده تغییرات ژنتیک و اپی ژنتیک است که منجر به تبدیل اپیتلیوم طبیعی کولون به آدنوما و پس از آن از آدنوما به کارسینوما می شود (متولی باشی و همکاران، ۱۳۸۸). از دست دادن ثبات ژنومی از طریق تسهیل دستیابی به جهش های مرتبط با تومور در توسعه‌ی سرطان روده بزرگ دخالت دارد. در این بیماری بی ثباتی ژنومی اشکال مختلفی دارد که هرکدام علل متفاوتی دارند. متداول‌ترین بی‌ثباتی ژنومی در سرطان کولورکتال بی‌ثباتی کروموزومی است که منجر به تغییرات زیادی در تعداد رونوشت و ساختار کروموزوم می‌شود. بی‌ثباتی کروموزومی مکانیسم مؤثری در فقدان فیزیکی رونوشتهای نوع وحشی ژنهای سرکوب کننده تومور مانند *APC*

و*P53* است (Sanford and Bertagnolli., 2009). افزایش سطح ویتامین D با کاهش خطر ابتلا به سرطان روده بزرگ همراه است و ویتامین D سبب کاهش تکثیر و افزایش در تمایز در سلول‌های روده بزرگ می‌شود. بنابراین ویتامین D به عنوان یک عامل مؤثر در جلوگیری از سرطان روده بزرگ از طریق مکانیسم‌های مرتبط با گیرنده ویتامین D عمل می‌کند (منتظر حقیقی و همکاران، ۱۳۸۸ و Kang *et al*., 2011.,). داده‌های حاصل از چندین مطالعه اثر متقابل بین انواع مشخص miRNA با انکوژن‌ها و ژن‌های سرکوب‌گر تومور مرتبط با تومورزایی کلونیک را اثبات کرده است. به طور مثال miR-135a و miR-135b باعث کاهش mRNA ژن *APC* و انباشته شدن βcatenin در سیتوپلاسم می‌شود. βcatenin انباشته شده به هسته انتقال می‌یابد و رونویسی از ژنهای فعال کننده‌ی چرخه‌ی سلولی را فعال می‌کند (Panarelli and Yantiss., 2011).

بیماری‌های التهابی روده نیز می توانند منجر به سرطان کولورکتال شوند (Casciato and lowitz., 2001). کولیت اولسرو یک بیماری التهابی غیر اختصاصی روده می‌باشد که هر دو جنس را گرفتار کرده، در هر سنی، با حداکثر شیوع در دهه‌های دو تا چهار می‌تواند خود نمایی کند. علت آن ناشناخته است، و هیچ داده‌ی اپیدمیولوژیک تا به حال، عامل انتقالی را مسئول بیماری نمی‌داند. از جمله وخیم‌ترین عوارض کولیت اولسرو، به وجود آمدن کارسینوم کولون و رکتوم می‌باشد. فاکتور-های شناخته شده‌ای که احتمال آن را زیاد می‌کنند شامل: شروع بیماری در کودکی، گرفتاری کل روده بزرگ، مدت بیماری بیشتر از ۱۰ سال، و التهاب دائم می‌باشند. تشخیص کارسینوم در کولیت اولسرو، از آنجا که در بیشتر موارد به صورت یک ضایعه‌ی صاف ایجاد می‌شود، سخت است. به طور شایع، چندین ضایعه پیدا می‌شوند. در حدود ۲۰ درصد بیماران در موقع تشخیص، غیر قابل درمان بوده‌اند (میبدی و همکاران، ۱۳۸۲).

نشانه‌های سرطان کولون و رکتوم غیر اختصاصی هستند. نشانه‌های کلاسیک تغییر در عادات روده‌ای و خونریزی رکتال می‌توانند اولین نشانه و علامت باشند، اما لزوماً به معنی ضایعه زود رس

نیستند، نشانه‌های درد شکمی، نفخ شکم، یبوست، و اسهال به علت انسداد نسبی روده ایجاد شده، معمولاً توسط یک کانسر نسبتاً پیشرفته حاصل می‌شود. کارسینوم رکتوم ممکن است یک احساس تخلیه ناکامل یا تنسموس ایجاد کند. کاهش وزن و اشتهای بد معمولاً از جمله علائم کانسر پیشرفته می‌باشند (میبدی و همکاران، ۱۳۸۲).

کوچکترین تومور کولورکتال که در مخاط کولون و به وسیله میکروسکوپ و یا رنگ‌آمیزی با آبی متیلن قابل مشاهده می‌باشد ACF[1] نام دارد. این زخم‌ها می‌توانند یک یا چند غار مجاور را تحت تأثیر قرار دهند. یک ACF علامت و نشانه‌ی اولیه‌ی عدم تعادل بین تولید سلول‌های جدید، بلوغ، و مرگ سلولی در یک غار می‌باشند. اولین نشانه تومور کولورکتال که به راحتی قابل مشاهده می-باشند، پولیپ است که در نتیجه رشد سلول‌ها ایجاد می‌شود و اغلب در جداره روده منتشر شده و به درون لومن روده بیرون می‌زند (نخعی سیستانی و همکاران، ۱۳۸۹). بیماری ابتدا به صورت پولیپ های خوش خیم شروع می شود که می تواند به یک آدنومای پیشرفته با درجه دیسپلازی بالا و سپس به شکل تهاجمی سرطان تکامل می یابد (Sanford and Bertagnolli., 2009).

سرطان کولورکتال در نتیجه تجمع تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیک که سلول های طبیعی اپیتلیال را به سرطان تهاجمی تبدیل می‌کند، ناشی می‌شود(Pritchard and Grady., 2011). این بیماری به عنوان یک پولیپ آدنوماتوز خوش خیم شروع می شود، که به آدنوم پیشرفته با دیسپلازی درجه‌ی بالا توسعه و پس از آن به سمت سرطان مهاجم پیشرفت می‌کند. سرطان مهاجم محدود به داخل دیواره روده بزرگ (بر اساس سیستم تومور- گره- متاستاز در مرحله I و II) قابل درمان هستند، اما در صورت عدم درمان، به گره های لنفاوی منطقه ای (مرحله III) گسترش می‌یابند و سپس به سایت های راه دور متاستاز (مرحله IV) می‌دهند (Sanford and Bertagnolli.,2009).

ژن‌هایی که در جریان توسعه‌ی سرطان کولورکتال جهش یافته‌اند شامل: ژن های سرکوبگر تومور، پروتوانکوژن‌ها، ژن‌های تعمیرکننده‌ی DNA، ژن‌های فاکتورهای رشد و گیرنده آنها، ژن‌های نقاط

[1] Aberrant crypt focus

بازررسی چرخه سلولی ، و ژن‌های مرتبط با آپوپتوز می‌باشند (Narayan and Roy., 2003). حداقل چهار نوع ناپایداری ژنومی یا اپی ژنتیک در سرطان های کولورکتال توضیح داده شده است: ۱) ناپایداری کروموزومی (CIN)، ۲) ناپایداری میکروستلایت (MSI)، فنوتیپ متیله کننده‌ی جزایر CPG (CIMP)، متیلاسیون DNA سراسری (Pritchard and Grady., 2010). رایج ترین نوع بی ثباتی ژنومی در سرطان کولورکتال بی‌ثباتی کروموزومی است، که موجب تغییرات متعدد در تعداد کپی و ساختار کروموزوم می‌شود. بی‌ثباتی کروموزومی یک مکانیسم کارآمد برای دلیل فقدان فیزیکی نوع وحشی ژن‌های سرکوبگر تومور مانند: *P53*، *APC* و *SMD4* می‌باشد. جهش‌های غیر فعال کننده‌ی ژن‌های سرکوبگر تومور و فعال شدن مسیرهای انکوژنی، از دیگر رخدادهای ژنتیکی در این سرطان می‌باشد.

سرطان کولورکتال به دو شکل عمده وجود دارد: سرطان کولورکتال خودبه‌خودی (sporadic) و سرطان کولورکتال موروثی (Kang *et al*., 2011). برآورد می‌شود که ژن‌های سرطانی در بروز حدود ۱۵ تا ۵۰٪ سرطان‌های کولورکتال نقش دارد. اساس ژنتیکی توارث ابتلا به سرطان، هنوز ناشناخته باقی‌مانده است. تنها ۳ تا ۵٪ سرطان‌های کولورکتال با نشانه‌های مشخص روی می‌دهند که جهش‌های عامل این سرطان‌ها کاملاً شناخته شده‌اند. بیشتر سرطان‌های کولورکتال که به صورت غیر توارثی ایجاد می‌شوند به سرطان‌های خودبه‌خودی معروفند (Fearnhead *et al.*, 2002). نوع خودبه‌خودی در افرادی که فاقد سابقه‌ی خانوادگی‌اند یا سابقه‌ی بسیار کمی از بیماری دارند رخ می‌دهد. تقریباً ۷۰ تا ۷۵٪ از سرطان‌های کولورکتال خودبه‌خودی هستند. سرطان کولورکتال موروثی شامل سرطان‌های خانوادگی و ارثی می‌باشد. معمولاً ۵٪ از سرطان‌های کولورکتال از نوع سرطان‌های خانوادگی است. پولیپوز آدنوماتوز خانوادگی (FAP) و سرطان کولورکتال غیر پولیپوز ارثی (HNPCC) یا Lynch syndrome دو شکل عمده‌ی سرطان کولورکتال ارثی هستند (Kang *et al*., 2011).