دانشگاه سیستان و بلوچستان
تحصیلات تکمیلی

پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی - گرایش ژنتیک

عنوان:

بررسی بیان ژن MMP2 دربیماران مبتلا به گلیوبلاستوما

استاد راهنما:

دکتر درمحمد کردی تمندانی

استاد مشاور:

دکتر فرشید اربابی

تحقیق و نگارش:

فرناز خدائی

(این پایان نامه از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه سیستان و بلوچستان بهره مند شده است)

بهمن ۱۳۹۲

بسمه تعالی

این پایان نامه با عنوان **بررسی بیان ژن MMP2 در بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما** قسمتی از برنامه آموزشی دوره کارشناسی ارشد ژنتیک توسط دانشجو فرناز خدائی با راهنمایی استاد پایان نامه دکتر درمحمد کردی تمندانی تهیه شده است. استفاده از مطالب آن به منظور اهداف آموزشی با ذکر مرجع و اطلاع کتبی به حوزه تحصیلات تکمیلی دانشگاه سیستان و بلوچستان مجاز می باشد.

فرناز خدائی

این پایان نامه ..... واحد درسی شناخته می شود و در تاریخ ..... توسط هیئت داوران بررسی و درجه ..... به آن تعلق گرفت.

	نام و نام خانوادگی	**امضاء**	**تاریخ**
استاد راهنما:	دکتر درمحمد کردی تمندانی		
استاد مشاور:	دکتر فرشید اربابی		
داور ۱:	دکتر محمد حسین سنگتراش		
داور ۲:	دکتر محسن طاهری		
نماینده تحصیلات تکمیلی:	دکتر علی‌رضا عینعلی		

تعهدنامه اصالت اثر

اینجانب فرناز خدائی تعهد می کنم که مطالب مندرج در این پایان نامه حاصل کار پژوهشی اینجانب است و به دستاوردهای پژوهشی دیگران که در این نوشته از آن استفاده شده است مطابق مقـــررات ارجاع گردیده است. این پایان نامه پیش از این برای احراز هیچ مدرک هم سطح یا بالاتر ارائه نشـــده است.

کلیه حقوق مادی و معنوی این اثر متعلق به دانشگاه سیستان و بلوچستان می باشد.

نام و نام خانوادگی دانشجو: فرناز خدائی

امضاء

تقدیم به **پدر** و **مادر** عزیزم که،

لحظات ناب باور بودن،

لذت و غرور دانستن،

جسارت خواستن،

عظمت رسیدن

و تمام تجربه های یکتا و زیبای زندگیم،

مدیون **حضور سبز** آنهاست.

سپاسگزاری

سپاس خدای را که سخنوران، در ستودن او بمانند و شمارندگان، شمردن نعمت‌های او ندانند و کوشندگان، حق او را گزاردن نتوانند .

سپاس‌گزارم از پدر و مادر عزیزم، این دو معلم بزرگوارم، که همواره بر کوتاهی و درشتی من، قلم عفو کشیده و کریمانه از کنار غفلت‌هایم گذشته‌اند و در تمام عرصه‌های زندگی یار و یاوری بی چشم‌داشت برای من بوده‌اند؛

از استاد با کمالات و شایسته؛ جناب آقای دکتر درمحمد کردی تمندانی، که در کمال سعه‌ی صدر، با حسن خلق و فروتنی، از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی این رساله را بر عهده گرفتند؛

از استاد صبور، جناب آقای دکتر فرشید اربابی، که زحمت مشاوره‌ی این رساله را در حالی متقبل شدند که بدون مساعدت ایشان، این پروژه به نتیجه مطلوب نمی‌رسید.

از استادان فرزانه و دلسوز؛ جناب آقایان دکتر محمد حسین سنگتراش و دکتر محسن طاهری که زحمت داوری این رساله را متقبل شدند، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

سپاس‌گزارم از همکلاسی گرامی‌ام آقای مهدی ابراهیمی به خاطر کمک‌های بی دریغ ایشان.

از سایر دوستان عزیزم که در این راه مرا حمایت کردند، ممنون و سپاس‌گزارم. همیشه قدرشناس خوبی‌های این عزیزان هستم.

چکیده:

ماتریکس متالوپروتئیناز۲ [1](MMP2) یک پروتئیناز وابسته به Zn می‌باشد که با تخریب اجزای ماتریکس خارج سلولی [2](ECM)، تهاجم و متاستاز سلول سرطانی را فراهم می‌سازد، همچنین با خاصیت رگ‌زائی خود باعث غذا و اکسیژن رسانی به بافت سرطانی و در نتیجه رشد تومور می‌شود. هدف از این مطالعه، بررسی میزان بیان این ژن در بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی‌فرم [3](GBM) می‌باشد. بیان این ژن بر روی ۵۰ نمونه‌ی بافتی پارافینه آزمایش شد که ۲۵ نمونه‌ی گلیوبلاستوما بعنوان گروه بیمار و ۲۵ نمونه‌ی آستروسیتومای[4] درجه پایین (۱و۲) بعنوان گروه کنترل انتخاب شدند. این آزمایش توسط تکنیک Real-time PCR انجام شد. نتایج حاصل نشان دادند که بیان این ژن در گروه بیمار به‌طور معنی داری افزایش یافته است (P=0.003).

کلمات کلیدی: : گلیوبلاستوما- متالوپروتئیناز- بیان

[1]- matrix metalloproteinase 2
[2]- Extra cellular matrix
[3]- glioblastoma multiforme
[4]- astrocytoma

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه ۱

۱-۱- مقدمه ۲

فصل دوم: مروری بر منابع **۴**

۲-۱- زیست شناسی سرطان ۵

۲-۱-۱- انواع سرطان ۵

۲-۱-۲- ژن های دخیل در ایجاد سرطان ۶

۲-۱-۳- عوامل موثر در ایجاد سرطان ۷

۲-۲- مرور اجمالی بر آناتومی و عملکرد مغز ۷

۲-۲-۱- انواع سلولهای عصبی ۸

۲-۳- سرطان مغز ۹

۲-۳- ۱- گلیوما ۱۰

۲-۳-۲- انواع گلیوما ۱۰

۲-۳-۳- گلیوبلاستوما مولتی فرم (GBM) ۱۱

۲-۴- ماتریکس متالو پروتئینازها ۱۱

۲-۴-۱- ژن MMP2 ..... ۱۳

۲-۵- مسیر سیگنالی ترشح MMP2 ..... ۱۳

۲-۶- تاریخچه ی گلیوما ۱۵

۲-۷- اپیدمیولوژی گلیوما ۱۵

۲-۸- علائم و نشانه های بروز GBM ۱۶

۲-۹- ریسک فاکتورها ۱۷

۲-۱۰- تست های تشخیصی ۱۷
۲-۱۱- روشهای درمان ۱۸
فصل سوم: مواد و روش ها ۲۰
۳-۱- مشخصات کلی نمونه های مورد مطالعه و نحوه ی جمع آوری آن ها ۲۱
۳-۲- دستگاه ها و وسایل مورد نیاز ۲۱
۳-۳- استخراج DNA از نمونه های پارافینی به روش فنل - کلروفرم ۲۱
۳-۴- ارزیابی کمی و کیفی DNA ۲۱
۳-۵- روش استخراج RNA ۲۲
۳-۵- ۱ -استخراج RNA از نمونه های پارافینی با استفاده از کیت سیناژن ۲۳
۳-6- اندازه گیری کیفیت RNA ۲۳
۳-6-۱- با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ۲۳
۳-6-۲- با استفاده از ژل الکتروفورز ۲۳
۳-7- روش تبدیل RNA به cDNA ۲۳
۳-7-۱- تبدیل RNA به cDNA با استفاده از کیت Vivantis ۲۴
۳-8- بررسی بیان ژن با استفاده از دستگاه Real-time PCR ۲۴
۳-8-۱- مراحل انجام Real-time PCR ۲۵
فصل چهارم: نتایج ۲۷
۴-1- نتایج Real-time PCR ۲۸
فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری و ارائه ی پیشنهادات ۳۲
۵-۱- بحث ۳۳
۵-۲- نتیجه گیری ۳۵
۵-۳- ارائه ی پیشنهادات ۳۵
مراجع ۳۷
پیوست ها ۴۰
پیوست۱: دستگاه ها و وسایل مورد نیاز ۴۱

پیوست۲: روش استخراج DNA از بافت پارافینه ۴۱
پیوست۳: مقادیر نسبت A260 به A280 و تعیین خلوص نمونه های DNA ۴۳
پیوست۴: مراحل و مواد مورد نیاز برای انجام الکتروفورز ۴۴
پیوست۵: روش استخراج RNA ۴۵
پیوست۶: مقادیر نسبت A260 به A280 و تعیین خلوص نمونه های RNA ۴۷
پیوست۷: نحوه ی تبدیل RNA به cDNA با استفاده از کیت Vivantis ۴۷

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۳-۱. غلظت مورد استفاده برای واکنش Real time PCR ۲۶

جدول ۳-۲. پرایمرهای طراحی شده برای انجام Real time PCR ۲۶

جدول ۳-۳. برنامه دمایی Real time PCR ۲۶

جدول ۴-۱. مقایسه ی میزان بیان ژن MMP2 بین نمونه های توموری و کنترل ۲۸

فهرست شکل‌ها

عنوان

صفحه

شکل ۲-۱. بخشهای مختلف مغز ۸

شکل ۲-۲. انواع سلولهای مغزی ۹

شکل ۲-۳. مغز یک بیمار مبتلا به گلیوبلاستوما ۱۱

شکل ۲-۴. لوکوس MMP2 . ..... ۱۳

شکل ۲-۵. مسیر سیگنالی ترشح MMP2 ..... ۱۴

شکل ۳-۱. ارزیابی کیفی DNAاستخراج شده ، روی ژل آگارز۱٪ ۲۲

شکل ۳-۲. آنالیز ژل الکتروفورز RNA تام ۲۳

شکل ۴-۱- منحنی تکثیری ژن RNA 18s در نمونه‌های کنترل ۲۹

شکل ۴-۲. منحنی تکثیری ژن RNA 18s در نمونه‌های گلیوبلاستوما ۲۹

شکل ۴-۳. منحنی تکثیری ژن MMP2 در نمونه‌های کنترل ۳۰

شکل ۴-۴- منحنی تکثیری ژن MMP2 در نمونه‌های گلیوبلاستوما ۳۰

شکل ۴-۵. نمونه‌ای از منحنی دمای ذوب ۳۱

فهرست علائم

علامت	نشانه
nm	نانومتر
µl	میکرولیتر
ml	میلی لیتر
nM	نانو مولار
µM	میکرو مولار
mM	میلی مولار
bp	جفت باز
rpm	دور در دقیقه

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه

گلیومای بدخیم، متداول‌ترین و بیش‌ترین نوع تومورهای اولیه‌ی مغز می‌باشد. خطرناک‌ترین و مرگبارترین آن‌ها گلیویلاستوما مولتی‌فرم (GBM)[1] می‌باشد که ۱۵ درصد کل تومورهای اولیه‌ی مغز را شامل می‌شود. بقای متوسط بیماران بعد از درمان‌های چندگانه (جراحی، شیمی‌درمانی و پرتودرمانی) در حدود ۱۵ ماه می‌باشد[۱]. این تومور سومین عامل مرگ بر اثر سرطان در جهان بوده و نرخ شیوع آن روز به روز افزایش می‌یابد. شیوع GBM در مردان بیش‌تر از زنان (حدود ۱/۵ برابر)، در سفید پوستان بیشتر از سایر نژادها و در افراد بالای ۶۵ سال، ۱۱ برابر بیشتر از افراد جوان می‌باشد. ۷۰ درصد مرگ‌ها بر اثر سرطان در بیماران بالای ۷۰ سال رخ می‌دهد[۲].

علیرغم ثبت تومورهای اولیه‌ی بدخیم سیستم عصبی مرکزی (CNS)[2] ایران در NCR[3]، اطلاعات جامعی درباره‌ی شیوع این تومورها در ایران وجود ندارد. مطالعات انجام شده‌ی اخیر نشان داده‌اند که شیوع آن‌ها در جهان ۲/۷۴ در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر در سال بوده و نرخ تبدیل تومورهای خوش‌خیم به بدخیم ۱/۰۷ می‌باشد[۳]. براساس مطالعات انجام شده توسط سرطان‌شناسان و ویروس‌شناسان، سایتومگالو ویروس انسانی (HCMV)[4] در شکل‌گیری گلیومای بدخیم به عنوان واسطه، نقش دارد[۴].

برداشت کامل تومور بهترین راه برای کنترل موضعی GBM می‌باشد ولی درمان باید با رادیودرمانی و شیمی‌درماتی با تموزولامید نیز ادامه یابد[۵]. چون GBM تهاجم بالایی دارد، به همین علت عود بیماری پس از برداشت کامل تومور توسط جراحی، قطعی می‌باشد[۶]. علاوه‌براین، سد خونی- مغزی[5] (BBB)، نفوذ داروهای مورد استفاده در شیمی‌درمانی را به سیستم عصبی مرکزی، به صورت قابل توجهی محدود می‌کند[۷].

ماتریکس متالوپروتئیناز۲ (MMP2)[6]، یک آنزیم کلیدی درگیر در تهاجم سلول‌های توموری می‌باشد که به صورت پروتئین ترشحی، به فضای ماتریکس خارج سلولی ترشح شده و به وسیله‌ی برش و تجزیه‌ی پروتئین‌های آن از جمله کلاژن، وتخریب آن موجبات تهاجم و متاستاز سلول سرطانی را فراهم می‌آورد.

1- glioblastoma multiforme
2- central nerve system
3- national cancer rejistry
4- human cytomegalo virus
5- blood-brain barrier
6- matrix metalloproteinase 2

در بروز این تومور عوامل متعددی از جمله عوامل ژنتیکی، اپی ژنتیکی، محیطی و ژنهای مختلف دخیل‌اند. در این سرطان نیز مانند اغلب سرطان‌ها افزایش بیان، علت اصلی ایجاد تومور می‌باشد. ما برای اثبات این امر ابتدا RNAی نمونه‌های پارافینه‌ی بیمار و کنترل را استخراج کردیم، سپس آن‌ها را تبدیل به cDNA کردیم و بعد از آن میزان بیان ژن MMP2 را با استفاده از دستگاه Real-time PCR و با استفاده از روش CYBER GREEN بررسی کردیم.

فصل دوم

مرور منابع

۲-۱- زیست شناسی سرطان

بدن انسان از سلول‌هایی تشکیل شده است که در کنار هم بافت‌هایی مانند ماهیچه، استخوان و پوست را می‌سازند. اغلب سلول‌های طبیعی بدن در پاسخ به تحریکاتی که از داخل و خارج بدن به آن ها وارد می‌شود، رشد و تولید مثل می‌کنند و در نهایت می‌میرند. اگر این فرایند همواره در مسیر تعادلی خود باقی بماند، بدن سالم مانده و عملکرد طبیعی خود را حفظ می‌کند[۸]، اما در سرطان سرعت تکثیر و تمایز سلولی دچار اختلال می‌شودکه می‌تواند در هر بافتی از بدن و در هر سنی رخ دهد. یک سلول طبیعی ممکن است بدون هیچ دلیل واضحی به یک سلول سرطانی تبدیل شود، ولی در بسیاری از موارد، تبدیل در اثر مواجهه‌ی مکرر با مواد سرطان‌زا مانند الکل، دخانیات و موادی از این قبیل صورت می‌گیرد[۹].

جهش یا تغییر در DNA سلول اتفاق می‌افتد. وقتی DNA یک سلول تغییر می‌کند، آن سلول در مقایسه با سلول‌های مجاور خود تفاوت یافته و دیگر کار یک سلول طبیعی بدن را انجام نمی‌دهد. به عبارتی دیگر، سلول تغییر یافته، از دستورها و علائم داخلی که دیگر سلول‌ها تحت کنترل آن‌ها هستند، پیروی نکرده و به صورت خودسرانه عمل می‌نماید. این سلول جهش یافته، طی تقسیمات سلولی مکرر، توانایی تشکیل توده ای از سلول-ها که تومور نامیده می‌شود، را دارد. گاهی این تومورها خوش‌خیم بوده و رشد نمی‌کنند، ولی در صورتی که سلول‌های توموری رشد کرده، تقسیم شوند و سلول‌های طبیعی مجاورشان را از بین ببرند و به نقاط دیگر بدن هم مهاجرت کنند (متاستاز)، بدخیم نامیده می‌شوند که تنها این تومورها به عنوان سرطان در نظر گرفته می-شوند[10] با رشد بیشتر و بزرگتر شدن تومورها، مواد غذایی و اکسیژن به سلول‌های سالم نمی‌رسد و با پیشرفت سرطان، سلول‌های سالم بیشتری از بین رفته و در نتیجه، عملکرد و سلامت بیمار به خطر می‌افتد، که می‌تواند در نهایت به مرگ فرد منجر شود[۱۱].

۲-۱-۱- انواع سرطان

سرطان‌ها بر اساس سلولی که از آن منشا می‌گیرند، معمولا به سه دسته تقسیم می‌شوند

- کارسینوما[1]: منشا این نوع سرطان‌ها، سلول‌های اپی‌تلیالی است. بسیاری از سرطان‌ها از این نوع هستند که معمولاً شامل سرطان‌هایی است که از سلول‌های سازنده‌ی پوست (سرطان پوست)، یا لایه‌ی داخلی اعضا (سرطان ریه) و یا از غدد (سرطان سینه) منشا می‌گیرند.

[1]- Carcinoma

- سارکوما[1]: سرطان‌هایی که از بافت همبند مثل غضروف، ماهیچه و استخوان منشا می‌گیرند. از این رو سرطان‌های استخوان یا ماهیچه را در هر جای بدن، سارکوم می‌گویند.
- لوسمیا[2] و لنفوما[3]: سرطان‌هایی که از سلول‌های تشکیل دهنده‌ی خون و لنف منشا می‌گیرند[۱۲].

۲-۱-۲- ژن های دخیل در ایجاد سرطان

- انکوژن‌ها[4]: این ژن‌ها، در شرایط عادی، در فرستادن پیام به سلول برای تکثیر نرمال نقش دارند. اختلال و تغییر در انکوژن‌ها به تکثیر نامنظم سلول منجر می‌شود که توانایی هدایت سلول به سمت سرطانی شدن را دارد.
- ژن‌های سرکوبگر تومور[5]: این ژن‌ها پروتئین‌های خاصی را تولید می‌کنند که در شرایط عادی، وظیفه‌ی عکس انکوژن‌ها را داشته و پیام توقف تکثیر را به سلول ارسال می‌کنند. یکی از مهم‌ترین ژن‌های این گروه، که از آن به عنوان نگهبان سلول یاد شده است، P53 می‌باشد. اختلال در این ژن‌ها، توسعه‌ی سرطان را تسهیل می‌کند.
- ژن‌های خودکشی[6]: خودکشی سلول‌ها یا مرگ سلول، یکی از مهم‌ترین عوامل پیچیده‌ی سلولی است که به سلول توانایی خودکشی در شرایط غیر معمول را می‌دهد و از این طریق از شیوع تکثیر و آسیب دیدگی به سایر سلول‌ها ممانعت به عمل می‌آورد. بروز اختلال در این ژن‌ها، به سرطانی شدن سلول کمک می‌نماید.
- ژن‌های ترمیم DNA[7] : این ژن‌ها مسئول ترمیم DNA آسیب دیده و معیوب هستند که با ترشح پروتئین‌های متفاوت، زمینه‌ی ترمیم DNA آسیب دیده را فراهم می‌کنند. اختلال و تغییر در این ژن‌ها با خطر سرطانی شدن سلول همراه است[۱۳].

۲-۱-۳- عوامل موثر در ایجاد سرطان

---

[1]- Sarcoma
[2]- Leukemia
[3]- Lymphoma
[4]- Oncogenes
[5]- Tumoue suppressor genes
[6]- Suicide genes
[7]- DNA repairing genes

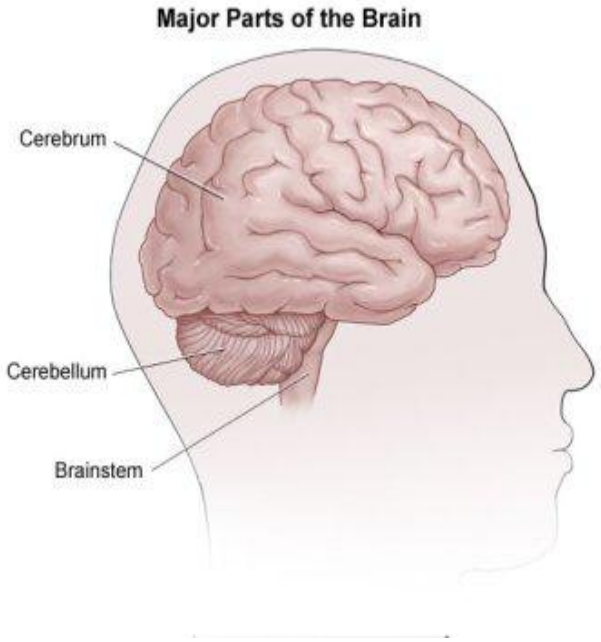
- عوامل فیزیکی: این عوامل به ویژه شامل اشعه‌ی ماورای بنفش (نور آفتاب) و پرتوهای یونیزه کننده (تصویربرداری تشخیصی و انفجارات اتمی) می باشند.
- عوامل شیمیایی: موادی نظیر آهن، نیکل، کروم، آرسنیک، هیدروکربورها، آروماتیک، قطران، پنبه نسوز، بعضی از رنگ‌ها، حشره کش‌ها، نگهدارنده‌های مواد غذایی مثل نیتریت، بعضی از قارچ‌ها مثل آسپرژیلوس، سیگار و ذرات معلق موجود در هوای شهرهای صنعتی و مدرن از این عوامل به شمار می‌آیند.
- عوامل ارثی: استعداد خانوادگی و آمادگی ژنتیکی، در بسیاری از سرطان‌ها به ویژه در ابتلا به سرطان‌های معده، روده‌ی بزرگ و ریه نقش دارند. بعضی اختلالات کروموزومی، مثل سندرم داون و یا منگولیسم، شانس ابتلا به سرطان خون را افزایش می‌دهند.
- عوامل ویروسی: بخصوص در سرطان‌های حلق و بینی و نوعی از سرطان خون، می تواند موثر باشد.
- سن فرد: در افراد مسن، به علت این که هم سیستم ایمنی ضعیف می‌شود و هم به مرور زمان، تغییراتی در هسته‌ی سلول‌ها حاصل می‌شود، شیوع سرطان‌ها افزایش می یابد. البته بعضی از سرطان ها، فقط در سنین پایین و برخی فقط در سنین جوانی بروز می‌کنند.
- منطقه‌ی جغرافیایی: بعضی از انواع سرطان‌ها، در یک منطقه‌ی جغرافیایی خاص، بیشتر مشاهده می‌شود. به عنوان مثال، سرطان مری در شمال ایران، سرطان معده در کشور ژاپن و سرطان پوست در نیمکره‌ی جنوبی شایع‌تر است.
- نحوه‌ی تغذیه و وضعیت فرهنگی و اقتصادی: بیشتر سرطان‌ها با شیوع بالاتری در مردان، طبقات پایین اجتماع و افراد مسن روی می‌دهند. تغذیه‌ی بد، سیستم ایمنی را تضعیف می‌کند و یک زندگی پر از جنجال و استرس نیز همین اثر را دارد[۱۴].

۲-۲- مرور اجمالی بر آناتومی و عملکرد مغز

مغز به همراه نخاع، سیستم عصبی مرکزی (CNS) رامی‌سازند که نقش آن تنظیم وکنترل تمامی فرآیندها و عملکردهای بدن می‌باشد. مغز انسان براساس آناتومی، ساختار یا فعالیت به بخش‌های مجزا تقسیم می‌شود که هرکدام فعالیت‌های خاصی را در بدن کنترل می‌کنند.

این بخش‌ها عبارتند از:

- مخ[1] که بزرگ‌ترین بخش مغز را تشکیل می‌دهد وکنترل‌کننده‌ی احساسات و تکلم میباشد.
- مخچه[2]، دومین بخش بزرگ مغز می‌باشد که کنترل حرکات ارادی و تعادل را بر عهده دارد.
- ساقه‌ی مغز[3] که مخ را به نخاع وصل می‌کند و شامل مغز میانی، پل دماغی و بصل‌النخاع می‌باشد. این بخش با حرکات غیر ارادی مانند تنفس و بلع در ارتباط می‌باشد[۱۵].



شکل ۲-۱: بخش‌های مختلف مغز

۲-۲-۱- انواع سلول های عصبی

دستگاه عصبی از ۲ نوع سلول تشکیل شده است:

- سلول‌های عصبی بنام نورون[4] که واحدهای عملی دستگاه عصبی می‌باشند.
- سلول‌های غیر عصبی بنام نوروگلیا[5] که نقش حفاظت و غذا رسانی به نورون‌ها را بر عهده دارند.

سلولهای نوروگلیا به ۴ دسته تقسیم می‌شوند:

[1]- Cerebrum
[2]- Cerebellum
[3]- Brainstem
[4]- Neuron
[5]- Neuroglia