

اسلامی



دانشگاه آزاد اسلامی

واحد اهر

دانشکده علوم پایه گروه زیست شناسی

پایان نامه برای دریافت درجه ی کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی سلولی و
مولکولی

گرایش ژنتیک (M.Sc)

عنوان:

**بررسی کمی فعالیت آنزیم تلومراز به روش SYBR Green RT-TRAP در بیماران
مبتلا به سرطان معده و مری در استان اردبیل در سالهای ۹۰-۹۱**

استاد راهنما:

دکتر سید سعید حسینی اصل

استاد مشاور:

دکتر سید علی رحمانی

نگارش:

فیروز نوروزی

تابستان ۱۳۹۲

تقدیم به پدرم:

کوهی استوار و حامی من در طول تمام زندگی

تقدیم به مادر عزیزتر از جانم:

چشمه زلال محبت و پاکی که تا،ستی و،ستم دوستت دارم

تقدیم به همسر مهربانم:

به پاس قدردانی از قلبی آکنده از عشق و معرفت که محیطی سرشار از سلامت و آرامش و آسایش برای من فراهم آورده است

تقدیم به دختر دلبندم آوا:

امید بخش جانم، آوای دلنواز عمرم

و تقدیم به تمام اعضای خانواده ام.

سپاس

باسپاس فراوان از استاد راهنمای فریخته ام جناب آقای دکتر حسینی اصل که در طول مدت انجام این پایان نامه از رهنمودهای علمی و اخلاقی ایشان بهره مند شدم و درگاه خداوند بزرگ

را شاکرم که افتخار نگردی ایشان را نصیبم نمود.

از استاد مشاور گرامی جناب آقای دکتر رحمانی به خاطر رهنمودهای علمی و اخلاقی ارزنده شان بسیار سپاسگزارم.

و با سپاس ویژه از کادر آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، دکتر هوشیار و تمام دوستان عزیز و احصای پرسنل آزمایشگاه ژنتیک پزشکی بیمارستان امام اردبیل که مراد انعام این پایان

نامه یاری نمودند.

فهرست مطالب

..... ۲	فصل اول:
..... ۲	کلیات
..... ۳	۱-۱ سرطان چیست؟
..... ۵	۱-۱-۲ انواع سرطان معده :
..... ۹	۱-۱-۳ میزان شیوع سرطان در ایران
..... ۱۳	۱-۲-۱ ساختار تلومر
..... ۱۴	۱-۲-۲ پروتئین های تلومر:
..... ۱۶	۱-۳-۱ تلومراز :
..... ۱۷	۱-۳-۱ ساختار تلومراز
..... ۲۰	۱-۳-۲ hTR:
..... ۲۴	۱-۳-۳ hTERT (زیر واحد کاتالیتیکی تلومراز):
..... ۲۶	۱-۳-۴ جایگاه ژن hTERT و سازماندهی آن :
..... ۲۸	۱-۳-۵ پروتئینهای متصل شونده به hTR :
..... ۲۹	۱-۳-۶ پروتئینهای متصل شونده به hTERT:
..... ۳۱	۱-۳-۷ تنظیم بیان ژن hTERT :
..... ۳۲	فصل دوم
..... ۳۲	مبانی نظری و پیشینه تحقیق
..... ۳۳	سرطان مری
..... ۳۴	سرطان مری و معده در ایران
..... ۳۴	میزان شیوع سرطان معده و مری در اردبیل:
..... ۳۴	مطالعات انجام شده در زمینه بررسی فعالیت تلومرازی بافت های سرطانی با ارجحیت معده و مری
..... ۳۷	فصل سوم

مواد و روشها

۳۷

۱-۱-۳ مواد لازم برای استخراج پروتئین (آنزیم تلومراز)

۳۸

۲-۱-۳ مواد لازم برای سنجش پروتئین به روش برادفورد:

۳۸

۳-۱-۳ مواد لازم برای سنجش TRAP assay

۳۸

پرایمرهای مورد استفاده:

۳۹

۴-۱-۳ مواد لازم جهت الکتروفورز پلی آکریل آمید (PAGE)

۴۰

۵-۱-۳ مواد لازم جهت رنگ آمیزی نیترا نقره:

۴۱

۶-۱-۳ مواد لازم برای SYBRgreen RT-TRAP assay:

۴۱

۱-۲-۳ وسایل مورد نیاز جهت نگهداری و جمع آوری نمونه ها:

۴۱

۲-۲-۳ وسایل لازم جهت استخراج پروتئین (آنزیم تلومراز)

۴۲

۳-۲-۳ وسایل لازم جهت انجام واکنش TRAP assay

۴۲

۴-۲-۳ وسایل لازم برای الکتروفورز PAGE

۴۲

۵-۲-۳ وسایل لازم جهت رنگ آمیزی نیترا نقره

۴۲

۶-۲-۳ دستگاه های مورد استفاده در این پایان نامه عبارتند از:

۴۳

روش کار

۴۳

۱-۳-۳ تهیه آب فاقد RNase (DEPC – treated)

۴۳

۲-۳-۳ تهیه مواد لازم برای واکنش TRAP

۴۳

۳-۳-۳ مواردی که بایستی در سنجش TRAP assay رعایت گردند:

۴۵

۴-۳-۳ جمع آوری نمونه

۴۵

۵-۳-۳ استخراج آنزیم تلومراز از نمونه تومور بیماران

۴۶

۶-۳-۳ اندازه گیری میزان پروتئین استخراجی:

۴۶

۷-۳-۳ سنجش TRAP assay

۴۷

۸-۳-۳ تهیه ژل پلی آکریل آمید جهت بررسی محصولات سنجش TRAP assay

۴۸

۹-۳-۳ روش بستن تانک و قالبگیری ژل

۴۹

..... ۴۹	روش رنگ آمیزی نیترات نقره ۱۰-۳-۳
..... ۵۰	SYBR green RT-PCR روش ۱۱-۳-۳
..... ۵۲	نتایج
..... ۵۳	۱- Set up بر روی سل لاین :
..... ۵۴	نتایج حاصل از Set up روش SYBR Green RT-TRAP
..... ۵۵	نتایج حاصل از سنجش فعالیت تلومرازی بیماران مبتلا به سرطان معده و مری در استان اردبیل به روش TRAP Assay
..... ۵۸	نتایج حاصل از سنجش فعالیت تلومرازی در بیماران مبتلا به سرطان معده و مری در استان اردبیل به روش SYBR Green RT-TRAP Assay
..... ۶۴	فصل پنجم
..... ۶۴	بحث و نتیجه گیری
..... ۶۹	References

فهرست جداول

..... ۳۹	جدول ۱-۳: الیگونوکلئوتیدهای مورد استفاده در سنجش TRAP assay
..... ۵۳	جدول ۱-۴: سیکل دمائی روش TRAP Assay
..... ۵۴	جدول ۲-۴: برنامه دمائی PCR برای TRAP Assay
	فهرست نمودارها
..... ۶۰	نمودار ۱-۱: میزان بروز سرطان معده در نقاط مشخصی از جهان در سال ۲۰۰۸
..... ۸	نمودار ۲-۱: میزان بروز سرطان مری در جهان در سال ۲۰۰۸
..... ۵۷	نمودار ۱-۴: درصد فعالیت تلومرازی در تعداد بیماران مبتلا به سرطان معده و مری در استان اردبیل با استفاده از روش TRAP Assay
..... ۵۸	نمودار ۲-۴: بررسی فعالیت تلومرازی در بیماران مبتلا به سرطان معده و مری در استان اردبیل با استفاده از روش TRAP Assay
..... ۶۱	نمودار ۳-۴: تعداد نمونه های مثبت و منفی از لحاظ فعالیت تلومرازی در بیماران مبتلا به سرطان معده و مری در استان اردبیل با استفاده از روش SYBR Green RT-TRAP

نمودار ۴-۴: درصد میزان فعالیت تلومرازی در بیماران مبتلا به سرطان معده و مری در استان اردبیل با

استفاده از روش SYBR Green RT-TRAP ۴۲

نمودار ۵-۴: مقایسه نتایج حاصل از بررسی فعالیت تلومرازی در بیماران مبتلا به سرطان معده و مری در

استان اردبیل با دو روش ۱-TRAP Assay ۲-SYBR Green RT-TRAP Assay ۴۳

فهرست شکل ها

شکل ۱-۱: ساختار تلومر ۱۱

شکل ۲-۱: مشکل همانند سازی انتهای کروموزوم ۱۲

شکل ۳-۱: گسترش انتهای تلومری به وسیله تلومراز ۱۷

شکل ۴-۱: طرح شماتیک از میانکنش تلومراز و تلومر ۱۸

شکل ۵-۱: جایگاه کروموزومی ژن hTR بر روی کروموزوم شماره ۳ ۲۰

شکل ۶-۱: ساختار ثانویه hTR انسان ۲۳

شکل ۷-۱: جایگاه کروموزومی ژن hTERT بر روی کروموزوم شماره ۵ ۲۷

شکل ۱-۳: سنجش فعالیت تلومراز توسط روش TRAP assay ۴۸

شکل ۱-۴: ژل PAGE باندهای حاصل از فعالیت تلومرازی سل لاین AGS سرطانی که ۶ bp از هم

فاصله دارند. ۵۳

شکل ۲-۴: Set up روش SYBR Green RT-TRAP ۵۴

شکل ۳-۴: سیکل دمائی مورد استفاده در دستگاه Real Time برای SYBR GreenRT-

TRAP Assay ۵۵

شکل ۴-۴: ژل PAGE حاصل از نمونه های معده و مری دارای فعالیت تلومرازی در بیماران مبتلا به

سرطان معده و مری در استان اردبیل به روش TRAP Assay ۵۶

شکل ۵-۴: نمودار های تکثیری (Amplification Plot) نمونه های معده و مری در دستگاه

Real Time Tim ۵۹

شکل ۶-۴: CT های نمونه های معده و مری در دستگاه Real Time ۶۰

چکیده:

سرطان اندامهای گوارشی بر اساس آخرین گزارش جهانی، چهارمین سرطان شایع در دنیا بوده و میزان بقاء ۵ سال، کمتر از ۲۴٪ بوده و بعد از سرطان ریه کشنده ترین سرطان در جهان می باشد. ایران یکی از مناطق با ریسک بالا برای سرطان گوارش در جهان بوده و استانهای اردبیل و گلستان به ترتیب دارای بالاترین آمار ابتلا به سرطان معده و مری بوده و در اردبیل ۲/۵ برابر متوسط کشوری می باشد، بطوری که بیش از ۵۰٪ سرطانهای منجر به مرگ در استان اردبیل مربوط به سرطان معده و مری بوده و سالانه بین ۳۵۰ تا ۴۰۰ نفر در این استان بعلت ابتلا به این بیماری فوت میکنند. میزان بقاء برای بیماران مبتلا به سرطان معده و مری در اردبیل کمتر از ۲ سال و در سرطان مری نسبت به سرطان معده نسبتاً بیشتر و میزان ابتلا در مردان نسبت به زنان بالاتر است. تلومراز یک آنزیم DNA پلیمرز وابسته به RNA است که توالیهای DNA تلومری را سنتز می نماید. آنزیم تلومراز در اکثر سلولهای سرطانی فعال بوده و میزان فعالیت آن از لحاظ کمی و کیفی در مراحل مختلف سرطان می تواند به عنوان یک نشانگر مولکولی در تشخیص زود هنگام سرطان مطرح باشد.

مواد و روشها:

در این آزمایش از ۳۰ بیمار مبتلا به سرطانهای معده و مری در بیمارستان امام خمینی اردبیل با روش آندوسکوپی نمونه برداری انجام گردید و سپس با استفاده از بافر CHAPS پروتئین تلومراز استخراج شده، میزان پروتئین استخراجی به روش بردفورد اندازه گیری گردیده و میزان فعالیت تلومراز به صورت کیفی با روش مرسوم TRAP Assay و به صورت کمی با روش SYBR green RT-TRAP اندازه گیری گردید.

نتایج: از بین ۳۰ نمونه سرطانی مری و معده به روش SYBR Green RT-TRAP در کل ۹۰٪ (۲۷ نمونه) دارای فعالیت تلومرازی بوده و ۱۰ درصد (۳ نمونه) فاقد فعالیت تلومرازی می باشد و به روش TRAP Assay مرسوم ۷۳٪ تلومراز مثبت (۲۲ نمونه) و ۲۷٪ (۸ نمونه) تلومراز منفی می باشند.

بحث: با توجه به نتایج حاصله فعالیت تلومرازی می تواند هم به عنوان مارکر سرطانی قوی و هم به عنوان هدف در درمان بیماران مبتلا به سرطان معده و مری در استان اردبیل مطرح باشد.

واژه های کلیدی: سرطان معده و مری، تلومراز، TRAP Assay، SYBR Green RT-TRAP Assay

فصل اول:

کلیات

۱-۱ سرطان چیست؟

زمانی که سلولهای بخشی از بدن شروع به رشد خارج از کنترل می کند سرطان شروع می شود. انواع مختلفی از سرطانها وجود دارند که آغاز همه آنها به دلیل رشد خارج از کنترل سلولهای نرمال می باشد. سلولهای سرطانی رشدی متفاوت با سلولهای نرمال دارند. سلولهای سرطانی نمی میرند و به رشد ادامه داده و سلولهای غیر نرمال و اشکال جدید را بوجود می آورند (۱۹،۲۰).

سلولهای سرطانی توانایی تهاجم به دیگر اندامها را نیز دارند که سلولهای نرمال فاقد این توانایی هستند. بنابراین رشد خارج از کنترل و تهاجم به اندامهای دیگر، مواردی هستند که از یک سلول نرمال، سلولی سرطانی می سازند (۱۹).

در اکثر موارد سلولهای سرطانی بصورت تومور درمی آیند. در برخی از سرطانها (مانند لوکمیا) ندرتاً سلولهای سرطانی به شکل تومور در می آیند؛ در عوض این سلولها، خون و بافت های مشابه خون رادرگیر کرده و از طریق آنها در بافتهای دیگر گردش می کنند؛ تا جاییکه شروع به رشد کنند (۲۲).

سلولهای سرطانی معمولاً به بخشهای دیگر بدن سفر می کنند؛ و در محلی دیگر شروع به رشد کرده و به شکل تومورهای جدیدی که جایگزین بافت طبیعی است، در می آیند؛ این پروسه متاستاز نامیده می شود. متاستاز هنگامی رخ می دهد که سلولهای سرطانی به جریان خون و یا رگ های لنفی بدنما می رسند (۱۹،۲۰،۲۱،۲۲).

مطالعات نشان می دهد که در مورد اغلب سرطانها شکل زندگی و فرهنگ بیشتر از ژنتیک دخیل می باشند. در اصل کشیدن سیگار، الگوهای تغذیه و رفتارهای تناسلی به عنوان فاکتورهای اصلی ریسک برای سرطان در کشورهای غربی و عفونت ها با حشرات در کشورهای در حال توسعه شناخته می شوند