

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



به نام خدا مشور اخلاق پژوهش

بایدی از خداوند بماند و اعتماد به این که عالم محضر خداست و مولود به نظر بر اعمال انسان و به منظور پاس داشت مقام بلند دانش و پژوهش و نظر به اهمیت جایگاه دانشگاه اسلامی فرسنگ و تمدن بشری، نادانشجویان و اصحاب بیعت علمی و اندامی دانشگاه آزاد اسلامی تسبیح می کردیم اصول زیر را در انجام فعالیت های پژوهشی مد نظر قرار داده و از آن تخطی نکنیم:

- ۱- اصل برائت؛ التزام بر برائت جویی از هرگونه فکری غیر بر خیزای و اعلام موضع نسبت به کسانی که حوزه علم و پژوهش را به مثابه ای غیر علمی می آید.
- ۲- اصل رعایت انصاف و عدالت؛ تمهید به اینست که از هرگونه جانب داری غیر علمی و مخالفت از اموال، بهیمنیت و سب و استیفاء.
- ۳- اصل ترویج؛ تمهید به رواج دانش و امانت نتایج تحقیقات و انتقال آن به بکارگران علمی و دانشجویان به غیر از مولودی که منع قانونی دارد.
- ۴- اصل احترام؛ تمهید به رعایت حریم و حرمت و احترام تحقیقات و رعایت جانب تعدد و خودداری از هرگونه حرمت شکنی.
- ۵- اصل رعایت حقوق؛ التزام بر رعایت کامل حقوق پژوهشگران و پژوهشگران انسان، حیوان و نبات و سایر مایه جان حق.
- ۶- اصل رازداری؛ تمهید به سیاست از اسرار و اطلاعات محرمانه افراد، سازمان ها و کشور و کلیه افراد و نهادهای مرتبط با تحقیق.
- ۷- اصل حقیقت جویی؛ تلاش در راستای پی جویی حقیقت و وفاداری به آن و دوری از هرگونه پنهان سازی حقیقت.
- ۸- اصل مالکیت بادی و مسئوب؛ تمهید به رعایت کامل حقوق بادی و مسئوبی دانشگاه و کلیه بکارگران پژوهش.
- ۹- اصل منافع ملی؛ تمهید به رعایت مصالح ملی و در نظر داشتن و پیشبرد توسعه کشور در کلیه مراحل پژوهش.



دانشگاه آزاد اسلامی

واحد دامغان

دانشکده علوم پایه

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک

گرایش: زیست شناسی

عنوان:

**بررسی فراوانی جهش ژنهای $RASA_1$ ، $BRAFV600E$ و
 $RASA_1$ در نمونه های توموری و خون محیطی بیماران مبتلا به
سرطان تخمدان با استفاده از تکنیک Real Time PCR**

استاد راهنما:

دکتر مجید مجرد

استاد مشاور:

دکتر مسعودیان

ارائه دهنده:

امید نجاتی

شماره پایان نامه: ۳۳۷۹۱۶

بهمن ماه ۱۳۹۶

«حق هرگونه انتشار و بهره برداری از نتایج این پایان نامه برای دانشگاه آزاد دامغان محفوظ است»



تعهد نامه اصالت رساله یا پایان نامه

اینجانب امید نجاتی دانش آموخته مقطع کارشناسی ارشد ناپیوسته / دکترای حرفه ای / دکترای تخصصی در رشته ژنتیک که در تاریخ ۱۳۹۶/۱۱/۸ از پایان نامه / رساله خود تحت عنوان : بررسی فراوانی جهش ژنهای RAS1 و RAS11، BRAFV600E در نمونه های توموری و خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان تخمدان با استفاده از تکنیک Real Time PCR با کسب نمره و درجه دفاع نموده ام بدینوسیله متعهد می شوم :

- ۱- این پایان نامه / رساله حاصل تحقیق و پژوهش انجام شده توسط اینجانب بوده و در مواردی که از دستاوردهای علمی و پژوهشی دیگران (اعم از پایان نامه ، کتاب ، مقاله و ...) استفاده نموده ام ، مطابق ضوابط و رویه موجود ، نام منبع مورد استفاده و سایر مشخصات آن را در فهرست مربوطه ذکر و درج کرده ام .
- ۲- این پایان نامه / رساله قبلاً برای دریافت هیچ مدرک تحصیلی (هم در سطح پایین تر یا بالاتر) در سایر دانشگاهها و مؤسسات آموزش عالی ارائه نشده است .
- ۳- چنانچه بعد از فراغت از تحصیل ، قصد استفاده و هرگونه بهره برداری اعم از چاپ کتاب ، ثبت اختراع و ... از این پایان نامه داشته باشم ، از حوزه معاونت پژوهشی واحد مجوزهای مربوطه را اخذ نمایم .
- ۴- چنانچه در هر مقطعی زمانی خلاف موارد فوق ثابت شود ، عواقب ناشی از آن را می پذیرم و واحد دانشگاهی مجاز است با اینجانب مطابق ضوابط و مقررات رفتار نموده و در صورت ابطال مدرک تحصیلی ام هیچگونه ادعایی نخواهم داشت .

نام و نام خانوادگی :

امید نجاتی

تاریخ و امضاء

شکرگذار خدایی هستم که آفرید
جهان را، انسان را، عقل را، علم را و عشق را

پاسکدار، همسر گرامیم
کسی که برای من در زندگی مهربانی و حمایت کردن را به ارمان آورد...

پاسکدار استاد بزرگوارم دکتر مجید مجرد
کسی که نه تنها علم، بلکه انسانیت را به من آموخت

به من آموخت زندگی لذت بردن و لبخند زدن است، نه در لحظات شیرین، که در سخت ترین لحظات...

به من آموخت گاهی برای ماورای مالد بکلید

و به من آموخت زندگی بازی نامن هست،

بستگی دارد تو چقدر ایمان داشته باشی....

پاسکدار استادی مشاورم، استادی و پرسنل محترم گروه ژنتیک دانشگاه علوم پزشکی مشهد
آزمایشگاه مرکزی و مرکز تحقیقات ژنتیک پزشکی

ح

تقدیم به

فرزندان دلبندم که در سختی ها و دشواری های زندگی همواره پشتیبانی محکم برایم بوده اند.

فهرست مطالب

چکیده.....

فصل اول: مقدمه

- 1-1-1 پیشگفتار..... ۱
- ۲-۱ کلیات..... ۲
- ۲-۱-۱ سرطان تخمدان..... ۲
- ۲-۲-۱ میزان شیوع سرطان تخمدان..... ۳
- ۲-۲-۱-۱ میزان شیوع سرطان تخمدان در ایران..... ۳
- ۲-۲-۳-۱ عوامل مستعد کننده سرطان تخمدان..... ۴
- ۲-۲-۴-۱ اژن های درگیر در سرطان تخمدان..... ۵
- ۲-۲-۵-۱ آناتومی بافت تخمدان..... ۷
- ۲-۵-۱-۱ هیستوپاتولوژی و تقسیم بندی کلی سرطان تخمدان..... ۸
- ۲-۲-۶-۱ چگونگی آغاز و پیشرفت سرطان تخمدان..... ۹
- ۲-۲-۷-۱ طبقه بندی سرطان تخمدان..... ۱۲
- ۲-۷-۱-۱ طبقه بندی سرطان تخمدان بر مبنای وضعیت بافت شناسی..... ۱۳
- ۲-۷-۲-۱ طبقه بندی سرطان براساس درجه (گرید) سرطان..... ۱۳
- ۲-۲-۸-۱ اعلام سرطان تخمدان..... ۱۶
- ۲-۲-۹-۱ تشخیص سرطان تخمدان:..... ۱۷
- ۲-۹-۱-۱ معاینه فیزیکی..... ۱۷
- ۲-۹-۲-۱ آزمایش خون..... ۱۸
- ۲-۹-۳-۱ سونوگرافی..... ۱۸
- ۲-۱۰-۱ اساس مولکولی و ژنی سرطان اپی تلیال تخمدان..... ۲۰
- ۲-۱۰-۱-۱ خانواده ژنی KRAS..... ۲۲
- ۲-۱۰-۱-۱-۱ اژن RASA1..... ۲۲
- ۲-۱۰-۱-۲-۱ اژن RASA1..... ۲۴
- ۲-۱۱-۱ خانواده ژنی BRAF..... ۲۵

فصل دوم: مروری بر مطالعات انجام شده

- ۲-۱-۱ مروری بر مطالعات انجام شده..... ۲۹

فصل سوم: روش کار

- ۳-۱ روش کار..... ۳۵
- ۳-۱-۱ مواد مورد استفاده در مطالعه..... ۳۶

- ۳۷-۲-۱ تعیین حجم نمونه: ۳۷
- ۳۷-۱-۳ نمونه گیری و جمع آوری نمونه های مناسب: ۳۷
- ۳۷-۱-۴ استخراج DNA از بافت ۳۷
- ۴۳-۱-۵ تایید کیفیت DNA استخراج شده ۴۳
- ۴۴-۱-۶-۱ باندهای مربوط به هر پرایمر: ۴۴

۴-۱ نتایج

- ۵۵-۱-۱ نتیجه ی بررسی فراوانی جهش سه ژن در سه گروه با گروه کنترل ۵۵

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

- ۵۹-۱ بحث و نتیجه گیری ۵۹
- ۶۱-۲ پیشنهادات ۶۱



فهرست اشکال

- شکل ۱-۱-۱-۱ تومور تخمدان و تجمع مایع آسیت در مراحل پیشرفته سرطان تخمدان ۲
- شکل ۱-۱-۲-۱ درصد ابتلا به سرطان های شایع در جهان براساس جنسیت ۳
- شکل ۱-۱-۳-۱ نمودار درصد ابتلا به سرطان های شایع زنان در ایران ۴
- شکل ۱-۱-۴-۱ شیوع بروز سرطان تخمدان در سنین مختلف ۵
- شکل ۱-۱-۵-۱ سرطان تخمدان به لحاظ عوامل ژنتیکی و ژن های شایع دخیل در نوع ارثی آن ۶
- شکل ۱-۱-۶-۱ جدول سایر ژن های درگیر در سرطان تخمدان همراه با فراوانی جهش و بیان آنها ۷
- شکل ۱-۱-۷-۱ آناتومی و ساختار بافت تخمدان ۸
- شکل ۱-۱-۸-۱ شیوع و تقسیم بندی انواع سرطن تخمدان از لحاظ هیستوپاتولوژیک ۹
- شکل ۱-۱-۹-۱ الگوی پیشرفت در سرطان تخمدان ۱۰
- شکل ۱-۱-۱۰-۱ الگوی پیشرفت و تکاملی سرطان تخمدان تیپ I و II ۱۱
- شکل ۱-۱-۱۱-۱ الگوهای انتشار سرطان تخمدان ۱۲
- شکل ۱-۱-۱۱-۱ الگوی هیستوپاتولوژیک انواع سرطان تخمدان ۱۳
- شکل ۱-۱-۱۲-۱ سرطان تخمدان با گرید IA ۱۴
- شکل ۱-۱-۱۳-۱ سرطان تخمدان با گرید IIB ۱۵
- شکل ۱-۱-۱۴-۱ سرطان تخمدان با گرید IIC ۱۵
- شکل ۱-۱-۱۵-۱ سرطان تخمدان با گرید IV ۱۶
- جدول (۱-۲) شماره مارکرها و روش های تشخیصی سرطان تخمدان ۱۹
- شکل ۱-۱-۱۶-۱ نمودار الگوریتمی مراحل تشخیص سرطان تخمدان ۲۰
- شکل ۱-۱-۱۷-۱ نمودار تقسیم بندی انواع سرطان اپی تلیال تخمدان و ژن های دخیل در آنها ۲۱
- شکل ۱-۱-۱۸-۱ مسیر سیگنالینگ خانواده ژنی KRAS و BRAF ۲۲
- شکل ۱-۱-۱۹-۱ کروموزوم ۵ و موقعیت ژن RASA1 بر روی آن ۲۴
- شکل ۱-۱-۲۰-۱ کروموزوم شماره ۱۲ و موقعیت ژن RASA1 ۲۵
- شکل ۱-۱-۲۱-۱ کروموزوم شماره ۷ و موقعیت ژن BRAF ۲۶
- جدول ۱-۲ یافته های بدست آمده از بررسی راشل و همکاران برای ژن BRAFV600E ۳۱
- شکل ۱-۲-۱ جهش های شایع ژنی سرطان تخمدان در کشورهای غربی ۳۲
- شکل ۱-۳-۱ نمونه های توموری بیماران ۳۸
- شکل ۲-۳ نمونه برداری از بافت ۳۸
- شکل ۳-۳-۳-۳ تانک ازت (نیتروژن مایع) ۳۸
- شکل ۳-۳-۴ بافت منجد و کوبیده شده ۳۸
- شکل ۳-۳-۵ کیت استخراج DNA از بافت شرکت پارس توس ۳۹

شکل ۳-۶	هموژن کردن بافت با استفاده از سرنگ	۳۹
شکل ۳-۷	تیوپ های حاوی DNA استخراج شده از بافت	۴۰
جدول ۳-۹	برنامه ی دمایی در واکنش Real-time PCR	۵۲
شکل ۴-۱	منحنی تکثیر در یک Run واکنش Real-time PCR	۵۵
شکل ۴-۲	منحنی تکثیر در یک Run واکنش Real-time PCR	۵۶
شکل ۴-۳	منحنی تکثیر در یک Run واکنش Real-time PCR	۵۷



فهرست جداول

جدول ۱-۱	انواع مسیر تومورزایی ، فراوانی و نوع پیش سازهای تیپ I و II	۱۱
جدول (۲-۱)	شماره مارکرها و روش های تشخیصی سرطان تخمدان	۱۹
جدول ۱-۳	اساس مولکولی و پیش سازی تومورهایی مسیر تیپ I و II	۲۱
جدول ۱-۲	یافته های بدست آمده از بررسی راشل و همکاران برای ژن BRAFV600E	۳۱
جدول ۱-۳	لیست ترکیبات و محلول های شیمیایی مورد استفاده	۳۶
جدول ۲-۳	فهرست کیت های مورد استفاده	۳۶
جدول ۳-۳	مستر میکس ها و پرایمرهای مورد استفاده	۳۶
جدول ۴-۳	ترکیبات مورد استفاده در واکنش PCR	۴۴
جدول ۵-۳	برنامه ی زمانی مورد استفاده در واکنش PCR	۴۴
جدول ۷-۳	برنامه ی دمایی مورد استفاده در واکنش Real-time PCR	۵۱
جدول ۸-۳	ترکیبات مورد استفاده در واکنش Real-time PCR	۵۲
جدول ۹-۳	برنامه ی دمایی در واکنش Real-time PCR	۵۲

چکیده

سرطان تخمدان چهارمین سرطان شایع و شایع ترین علت مرگ ناشی از سرطانهای ژینکولوژیک است، که نوع اپی تلیال آن ششمین سرطان شایع در زنان است. هرچند که عوامل اتیولوژیک ایجادکننده سرطان تخمدان بخوبی شناخته شده نمی باشند اما پیش سازهای ژنتیکی همچون تغییر در مسیر ژنهای BRAF / KRAS که منجر به جهش در مسیر تیپ I تکامل زیستی سرطان تخمدان می گردند، به ویژه در سلولهای سوماتیک حائز اهمیت و بررسی می باشند سرطان تخمدان یکی از مباحث عمده در حیطه جراحی است که نیاز به درمان جدی و غالباً پیچیده دارد. این سرطان نسبت به سایر موارد بیماری در بین همه بدخیمی های دستگاه تناسلی زنان از بالاترین موارد مرگ و میر برخوردار است. در این تحقیق از خانواده ژنی KRAS دو ژن های $RASA_1$ و $RASAI_1$ که کننده پروتئین و از اجزا اصلی مسیر تیروزین کیناز RAS / MAPK می باشند مورد مطالعه قرار می گیرد. جهش های نقطه ای شایع در این ژن ها عملکرد GTPase را از بین برده و در نتیجه منجر به از دست رفتن توانایی غیرفعال سازی پروتئین توسط خود می گردند.

روش کار: در این مطالعه ی مورد-شاهدی، ۲۵ نمونه تومور تخمدان و ۲۵ نمونه خون بیماران مبتلا به سرطان تخمدان که تحت عمل جراحی قرار گرفته بودند و ۵۰ نمونه خون از افراد زن سالم و ۵ نمونه بافت نرمال از تخمدان بعنوان شاهد را مورد مطالعه قرار دادیم. سپس استخراج DNA برای تمامی نمونه ها انجام شد و در نهایت فراوانی جهش ژن های $RASA_1$ ، $RASAI_1$ و BRAFV600E با تکنیک Quantitative Real-time PCR بررسی گردید.

نتایج: بعد از تحلیل نتایج به دست آمده از تکنیک Real-time PCR به روش نسبی بر روی نمونه بافت توموری و خون گروه بیمار مبتلا به سرطان تخمدان بودند و نمونه بافت نرمال بعنوان شاهد و خون گروه افراد زن سالم از لحاظ ابتلا به کانسر تخمدان، هیچ جهشی در دو ژن $RASA_1$ و $RASAI_1$ در نمونه های تومور و نمونه های خون آنان دیده نشد، در مورد ژن BRAFV600E در یافت تومورال جهشی یافت نشد ولی در خون این گروه ۲ نفر واجد این جهش بودند (۸٪) در خون گروه افراد سالم هم هیچ جهشی از این سه ژن مشاهده نگردید.

نتیجه گیری: می توان نتیجه گیری کرد با توجه به عدم وجود فراوانی جهش در ژن های $RASA_1$ ، $RASAI_1$ و BRAFV600E علیرغم وجود این جهش ها در سایر تومورها پتانسیل معرفی شدن به عنوان اهداف تحقیقاتی در مطالعات کشف بیومارکر به منظور تشخیص زودهنگام وقوع متاستاز در بیماران مبتلا به سرطان تخمدان را دارا نمی باشند. اما در خصوص ژن BRAFV600E وجود جهش در نمونه خون ۲ نفر از افراد مبتلا و شیوع ۸٪ آن توصیه به تحقیق و بررسی بیشتر در این مورد بعنوان یک روش کمتر تهاجمی و زودهنگام در تشخیص مراحل ابتدایی سرطان می گردد. باتوجه به شیوع این نوع سرطان، اهمیت تشخیص اولیه آن و پیگیری درمان متمرکز شده و مشخص شدن فراوانی و شیوع جهش این ژن در خون این افراد در این تحقیق نتایج حاصله می تواند کمک شایانی در جهت تشخیص زود هنگام، انتخاب درمانهای و دستورالعمل درمان مبتنی بر شرایط هر فرد (individualized treatment) را در زمینه کانسر تخمدان ارائه داد.

کلمات کلیدی: سرطان تخمدان، متاستاز، ژن $RASAI_1$ ، ژن $RASA_1$ ، ژن BRAFV600E

فصل اول

مقدمه



1-1 پیشگفتار

امروزه سرطان یکی از شایع ترین و کشنده ترین بیماری هایی است که گریبان گیر نژاد بشری شده است و در بین زنان، سرطان تخمدان جایگاه ششم را به خود اختصاص داده است. این سرطان با معیارهای مختلفی مانند نوع سلولهای سرطانی، علائم بالینی، بیان یا عدم بیان تومورمارکرها و... طبقه بندی می شود. سرطان تخمدان به تنهایی سرطان کشنده ای نیست و وقوع متاستاز اصلی ترین و مهمترین عامل مرگ و میر در سرطان تخمدان است. سرطان تخمدان متاستاتیک معمولاً نسبت به درمان مقاوم می باشد و پاسخ به درمان بسیارضعیفی دارد. وجود متاستاز یکی از عوامل اصلی در تعیین مرحله بیماری سرطان تخمدان (گرید III و IV) می باشد، در حقیقت یکی از عوامل مهم و تعیین کننده ی مهلك بودن این سرطان، مرحله ی ۱ بیماری در زمان تشخیص است. نرخ زنده ماندن تا ۵ سال در بیمارانی که در مرحله ی ۳، ۳۲٪ و در مرحله ی ۴، ۱۸٪ می باشد. همچنین نرخ بقا تا ۵ سال در بیماران مبتلا به سرطان تخمدان زیر ۲۵٪ می باشد(۱).

بنابراین شناسایی بیومارکرهای اختصاصی برای تشخیص زودهنگام سرطان می تواند میزان پاسخ به درمان و در نهایت شانس بقا در بیماران را به میزان چشمگیری افزایش دهد. تحقیقات نشان داده است تغییر و جهش در مسیر ژنهای خانواده BRAF / KRAS که منجر به جهش در مسیر تیپ I تکامل زیستی سرطان تخمدان می توانند در روند ابتلا به سرطان و متاستاز نقش کلیدی ایفا می کنند. از جمله ی آنها می توان به ژن های RAS1، RAS1 و BRAFV600E اشاره کرد(۲).

در این مطالعه که یک مطالعه ی مقدماتی^۲ یا پایلوت است؛ تلاش خواهیم کرد با بررسی فراوانی جهش ژنهای BRAFV600E، RAS1 و RAS1 در نمونه های توموری و خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان تخمدان بافت نرمال به این سوال پاسخ دهیم که فراوانی جهش این سه ژن در تومورزایی و فرآیند متاستاز دچار تغییر معنادار می شوند؟ علاوه برآن با مقایسه ی میزان بیان آنها در تومور و نمونه خون آنها و مقایسه آن با خون افراد سالم و بافت نرمال (در صورت وجود اختلاف معنادار)، به دنبال این هدف خواهیم بود که یک بیومارکر شناساگر رخداد تومور در مراحل اولیه تومور (گرید I و II) و همچنین متاستاز را ارائه دهیم.

^۱ Stage

^۲ Pilot study

^۳ invasion

۲-۱ کلیات

سرطان یک گروه بزرگ از بیماری‌هایی می‌باشد که شامل رشد سلولی غیر طبیعی با پتانسیل تهاجم‌آمیز و یا گسترش به سایر نقاط بدن است. سرطان مهم‌ترین علت مرگ و میر به عنوان یک بیماری غیر واگیر در جهان محسوب می‌شود و بنابراین یک مشکل اصلی بهداشت عمومی در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه به شمار می‌رود (۳).

۱-۲-۱ سرطان تخمدان

سرطان تخمدان یک بیماری پیچیده و هتروژن می‌باشد که شامل چندین زیرگروه با پیامدهای بالینی مجزا است. این بیماری شایع‌ترین کارسینوما در زنان و پنجمین علت معمول مرگ و میر مرتبط با سرطان در زنان در نظر گرفته می‌شود (۴). سرطان تخمدان بالاترین مرگ و میر در تمام سرطانهای زنان را در سراسر جهان دارد. بیشتر سرطان تخمدان بیماران در یک مرحله پیشرفته (مرحله III یا IV) تشخیص داده می‌شوند که حجم زیادی از تشکیل آسیت و انتشار گسترده صفاقی را تشکیل می‌دهند. از آنجایی که در ابتدای مرحله سرطان تخمدان به طور کلی است بدون علامت، دشوار است تا این بیماری را در مرحله پیشرفته تشخیص دهد. تقریباً ۷۵ درصد از زنان مبتلا به سرطان تخمدان با بیماری پیشرفته همراه خواهند بود.

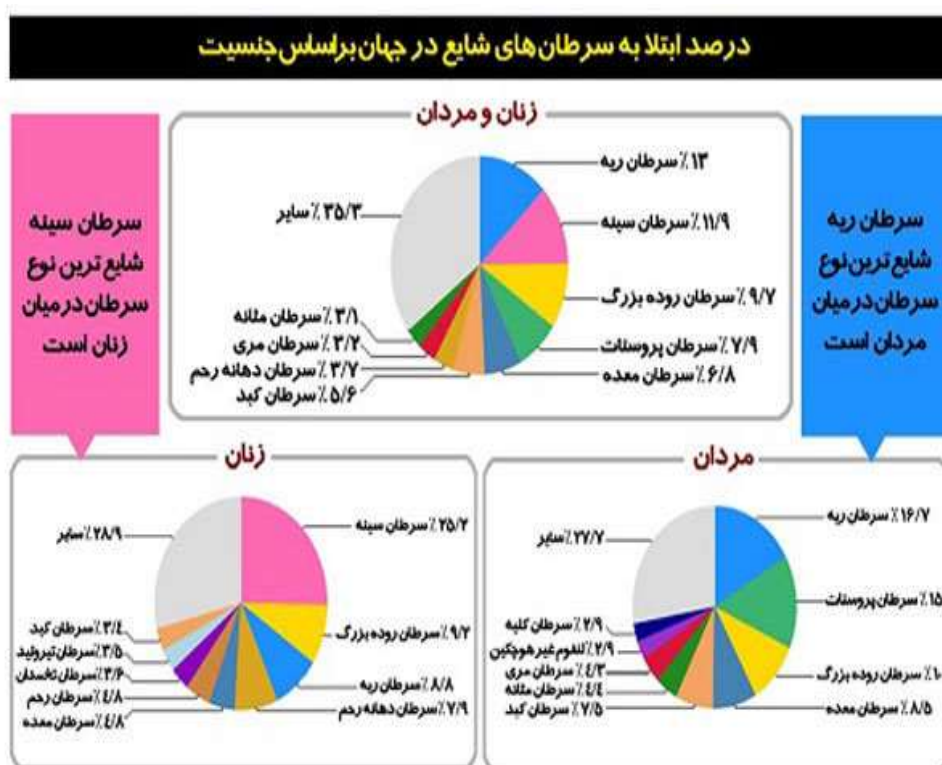


شکل ۱-۱ تومور تخمدان و تجمع مایع آسیت در مراحل پیشرفته سرطان تخمدان

همچنین یکی از مهمترین چالش‌های ما در تلاش برای درمان سرطان تخمدان باقی مانده است. مقاومت چند دارویی (Multiple drug resistance) یکی از پدیده‌هایی است که تومورهای انسانی که مقاومت در برابر یک نوع درمان را به دست می‌آورند مقاوم به چندین دارو دیگر هستند که اغلب در ساختار و حالت عملکرد بسیار متفاوت هستند.

۲-۲-۱ میزان شیوع سرطان تخمدان

سرطان تخمدان، چهارمین سرطان شایع و شایع ترین علت مرگ ناشی از سرطانهای ژینکولوژیک است، که نوع اپی تلیال آن ششمین سرطان شایع در زنان است. در بین انواع کانسر تخمدان سرطان اپی تلیال تخمدان ۹۰٪ بدخیمی های تخمدان و ۱/۴ بدخیمی های تناسلی زنان را تشکیل می دهد. خطر مرگ ناشی از سرطان تخمدان ۱۰٪ است، سالانه حدود ۲۴۰۰۰۰ نفر در دنیا مبتلا به این نوع سرطان می شوند.

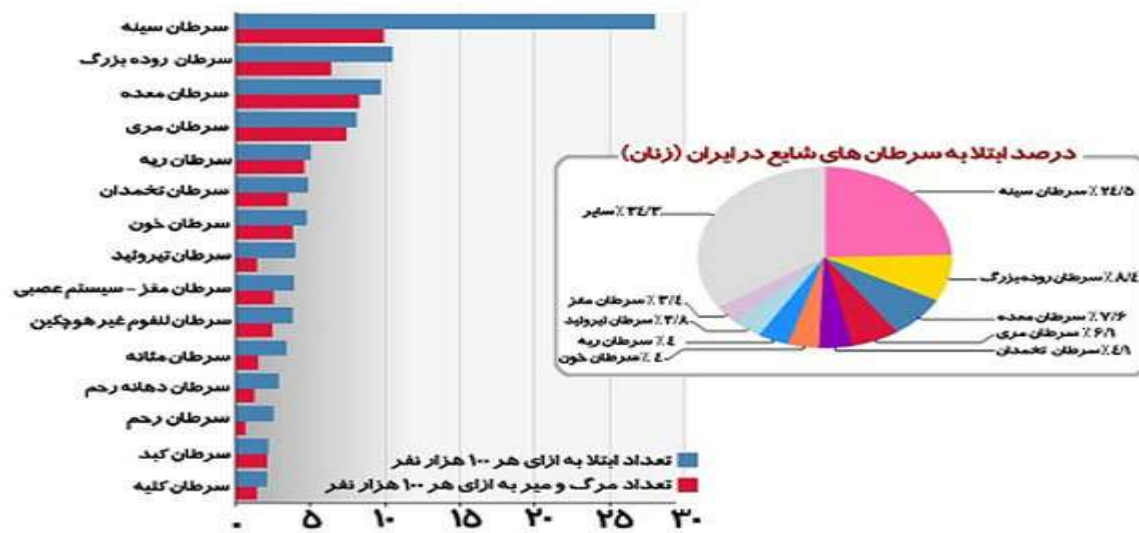


شکل ۱-۲ درصد ابتلا به سرطان های شایع در جهان براساس جنسیت

۲-۲-۱-۱ میزان شیوع سرطان تخمدان در ایران

سرطان یکی از مشکلات اصلی سلامت عمومی در ایران است و سومین علت مرگ پس از بیماری قلبی عروق کرونر و تصادف در نظر گرفته می شود (۱۰). سرطان تخمدان نیز همچون سایر سرطان ها در ایران از سال ۱۹۹۹ طبق داده های ثبت سرطان ایران، افزایش یافته است (۱۱، ۱۲). و تخمین زده شده که تعداد سالانه موارد جدید مبتلا به اغلب سرطان ها از سال ۲۰۰۸ تا ۲۰۳۰ دو برابر خواهد شد (۱۳). طبق داده های ثبت شده در سال ۲۰۰۸ تعداد کل زنان مبتلا به سرطان پستان، ۸۶۱۶ مورد گزارش شده است (۱۴). در ایران سرطان پستان ۲۱،۴ درصد از کل بدخیمی های زنان را به خود اختصاص داده است (۱۵) و در سال ۱۳۸۸ حدود ۰،۸۷ درصد از کل علت مرگ ها در گروه های سنی ۴۹-۱۵ سال و

۰/۹۹ درصد از کل علت مرگ ها در گروه های سنی ۶۹-۵۰ سال مربوط به سرطان پستان بوده است (۱۶) .. بنابراین نیاز جدی جهت محاسبه بار سرطان پستان و سیاست های مناسب برای جلوگیری از این سرطان وجود دارد.



شکل ۱-۳ نمودار درصد ابتلا به سرطان های شایع زنان در ایران

۳-۲-۱ عوامل مستعد کننده سرطان تخمدان

سرطان تخمدان یک بیماری چندعاملی^۱ است که هر دو عامل ژنتیکی و محیطی در وقوع آن موثر هستند. حدود ۸۵ درصد موارد سرطان تخمدان بصورت تگ گیر^۲ و تنها حدود ۱۵-۱۰ درصد کل موارد تومورهای بدخیم تخمدان، ارثی است که جهش در دو ژن BRCA1 و BRCA2 یکی از عوامل اصلی این موارد محسوب می شود.

علاوه بر این، عواملی همچون افزایش سن، وجود تاریخچه خانوادگی سرطان به خصوص سرطان پستان و فاکتورهای موثر در باروری (قاعدگی زودرس، سن اولین بارداری بیش از ۳۰ سال، مصرف زیاد داروهای ضدبارداری هورمونی و یائسگی دیررس) در شکل گیری سرطان تخمدان نقش عمده ای دارند. و همچنین عواملی نظیر فاکتورهای تغذیه ای، فعالیت فیزیکی، مصرف الکل، دود سیگار، چاقی پس از یائسگی و سطح اجتماعی-اقتصادی در تعدیل میزان خطر سرطان تخمدان موثر می باشند (۳). خطر ابتلاء به سرطان تخمدان در کسانی که بیشتر تخمک گذاری می کنند بیشتر است؛ بنابراین کسانی که

^۱ multifactorial

^۲ sporadic

هیچ وقت فرزندی نداشته‌اند در معرض خطر بالاتری هستند. همچنین کسانی که تخمک‌گذاریشان در سنین پایین‌تری آغاز می‌شود یا در سن بالاتری یائسه می‌شوند نیز در معرض چنین خطری هستند. دیگر عوامل خطر شامل این موارد هستند: هورمون درمانی پس از یائسگی، داروهای باروری، و مرض چاقی (زنان با اضافه وزن زیاد و دارای BMI بالای ۳۰ هم احتمال ابتلای بیشتری دارند)، زندگی در شهرهای صنعتی، نژاد سفید و استفاده مداوم از پودر تالک در ناحیه پرینه. عواملی که خطر ابتلاء را پایین می‌آورند شامل این موارد هستند: کنترل هورمونی، بستن لوله‌های رحمی، و شیردهی. سرطان‌های تخمدان بسیار متعدد و متنوع هستند و شدت رشد و سرعت بیماری بر حسب نوع سرطان تخمدان متفاوت است. ولی به طور کلی در سنین قبل از یائسگی شایع‌تر است. در حدود یک درصد از سرطان‌های تخمدان زیر ۲۰ سالگی ایجاد می‌شود. شایع‌ترین سن ابتلا حدود ۴۰ تا ۵۰ سالگی است و ۳۰ تا ۴۰ درصد بدخیمی‌های تخمدان بعد از ۶۵ سالگی رخ می‌دهد.

Percentage of Ovarian Cancer Cases Diagnosed by Age Group



شکل ۱-۴ شیوع بروز سرطان تخمدان در سنین مختلف

۴-۲-۱ ژن‌های درگیر در سرطان تخمدان

انواعی از ژن‌ها در سرطان تخمدان ارثی و غیر ارثی نقش دارند.

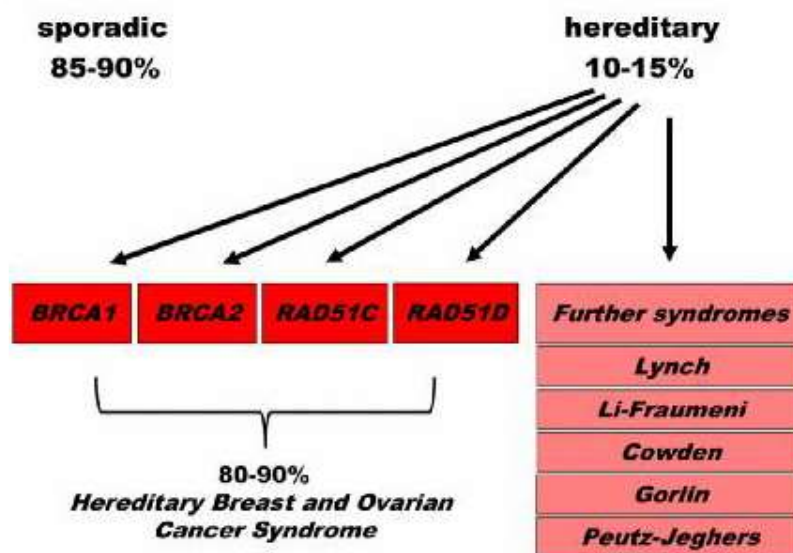
ژن‌های شایع، سندروم‌ها و بیماری‌های درگیر در سرطان تخمدان ارثی و غیر ارثی:

BRCA2, BRCA1: ژن **BRCA1** در جایگاه کروموزومی **17q** و ژن **BRCA2** در جایگاه **13q** قرار گرفته‌اند. جهش در این دو ژن باعث ایجاد سرطان پستان می‌باشد بطوری که جهش در **BRCA1** خطر بروز سرطان پستان را در برخی از خانواده‌ها حدود ۸۰٪ افزایش می‌دهد؛ اما به طور متوسط خطر بروز سرطان پستان در اثر جهش این ژن بین ۵۵ تا ۶۵٪ است. در حالیکه جهش در ژن

BRCA2 باعث ایجاد خطر بروز سرطان در حدود ۴۰٪ می شود. در صورت وجود جهش در یکی از این دو ژن، احتمال ابتلای زنان به سرطان پستان ارثی مهاجم بین ۸۵-۵۵ درصد تا سن ۷۰ سالگی خواهد بود و خطر ۶۵-۱۵ درصد احتمال ابتلای زنان به سرطان تخمدان بسته به نوع و محل جهش وجود خواهد داشت. انواع بیماری های سرطان ارثی هم وجود دارند مثل سندرم ارثی سرطان پستان-تخمدان (HBOC) سندرم سرطان ارثی غیر پولیپوزی کولون (HNPCC یا لینچ II) سرطان تخمدان وابسته به محل (HSSOC) هر سه این بیماری ها به طریقه اتوزومال غالب از سمت مادری یا پدری به ارث می رسند. شایع ترین HBOC (سرطان های ارثی تخمدان) است (۷۵-۹۰٪) که با موارد متعدد ابتلا به سرطان پستان زیر ۵۰ سالگی و سرطان تخمدان مشخص می شود و دومین مورد HNCC یا لینچ II می باشد، که خطر سرطان تخمدان در طول عمر آنها ۱۲-۱۰٪، سرطان کولون ۸۵٪ و سرطان اندومتر ۶۰-۴۰٪ است و سومین مورد HSSOC است که کمتر از ۵٪ سرطان های ارثی تخمدان را تشکیل می دهد.

علاوه براین، در افراد دارای این جهش ها احتمال بروز سایر سرطان ها همچون سرطان تخمدان نیز بالاست (۱۸-۲۰). ژن های دیگری نیز در پیدایش سرطان تخمدان ارثی موثر هستند اما همانند جهش در ژن های BRCA چندان خطر بروز سرطان را افزایش نمی دهند مانند: RAD51C و RAD51D و

....



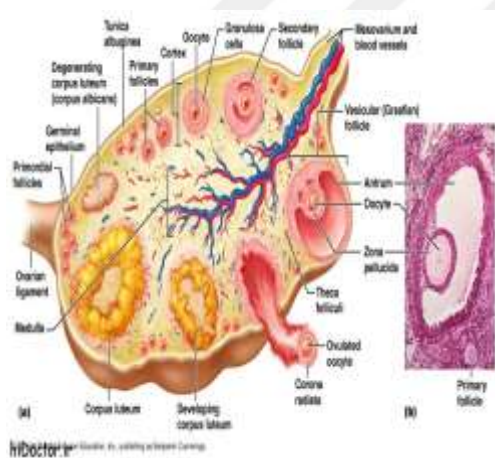
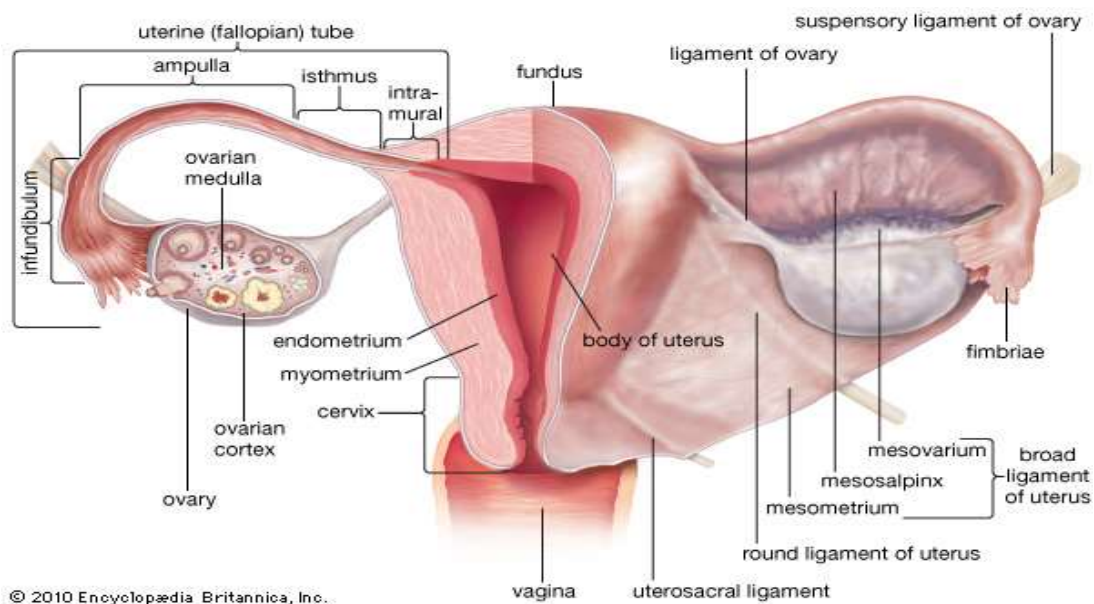
شکل ۱-۵ سرطان تخمدان به لحاظ عوامل ژنتیکی و ژن های شایع دخیل در نوع ارثی آن

Gene	Chromosome	Percentage of cancers in which amplified	Percentage of cancers in which overexpressed	Percentage of cancers in which mutated	Function
RAB25	1q22	54%	80-89%	ND	Cytoplasmic GTPase and apical vessel trafficking
EVI1	3q26	ND	ND	ND	Transcription factor
EIF5A2	3q26	ND	ND	ND	Elongation factor
PRKCI	3q26	44%	78%	ND	Cytoplasmic serine-threonine protein kinase
PIK3CA	3q26	9-11%	32%	8-12%	Cytoplasmic lipid kinase
FGF1	5q31	ND	51%	ND	Growth factor for cancer and angiogenesis
MYC	8q24	20%	41-66%	ND	Transcription factor
EGFR	7p12	11-20%	9-28%	<1%	Protein tyrosine kinase growth factor receptor
NOTCH3	9p13	20-21%	62%	ND	Cell surface growth factor receptor
KRAS	12p11-12	5%	30-52%	2-24%	Cytoplasmic GTPase
ERBB2	17q12-21	6-11%	4-12%	ND	Protein tyrosine kinase growth factor receptor
PIK3R1	19q	ND	ND	ND	Cytoplasmic lipid kinase
CCNE1	19q12	12-36%	42-63%	ND	Cyclin
AKT2	19q13.2	12-27%	12%	ND	Cytoplasmic serine-threonine protein kinase
AURKA	20q13	10-15%	48%	ND	Nuclear serine-threonine protein kinase

شکل ۶-۱ جدول سایر ژن های درگیر در سرطان تخمدان همرا با فراوانی جهش و بیان آنها

۵-۲-۱ آناتومی بافت تخمدان

تخمدانها دو غده به اندازه دو بادام بزرگند که حدود چهار سانتیمتر بلندی و دو و نیم سانتیمتر پهنا دارند. این غدد از دو طرف توسط رباطی نازک به رحم متصل میباشند. و رباطی دیگر این غدد را به لوله های فالوپ متصل میکند. در عکس زیر ، جسم بادامی شکل و سفید رنگ ، تخمدان است. فعالیت تخمدانها در دوره ی خاصی از زندگی است : دوران باروری (که معمولا از ۱۴ تا ۴۵ سالگی می باشد) شروع این دوران بلوغ و پایان ان یائسگی است. تخمکها در یک نوع مجتمع سلولی محصور هستند که پس از طی یک دوره ای در اثر هورمونهایی که از غده هیپوفیز ترشح میشوند به رشد خود میرسند. نام این مجتمع ها ”فولیکول“ است که یک بار در هر ۲۸ روز بالغ و باز شده یک تخمک رها می کند.

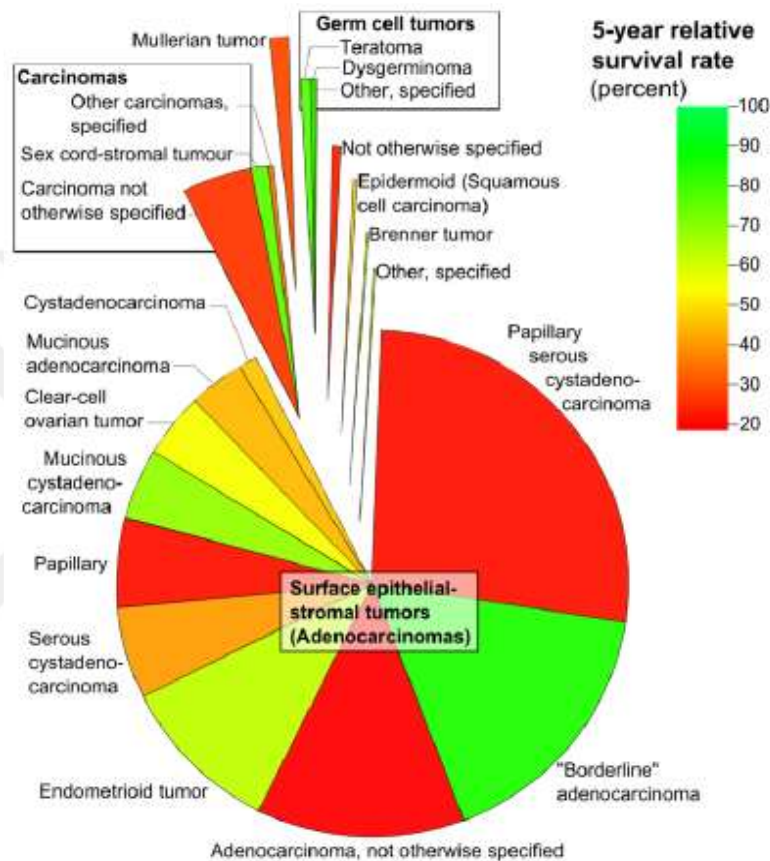


شکل ۱-۷ آناتومی و ساختار بافت تخمدان

۱-۲-۵-۱ هیستوپاتولوژی و تقسیم بندی کلی سرطان تخمدان

سرطان تخمدان یک بیماری بالینی کاملاً پیچیده و ناهمگن از لحاظ مولکولی و بافت شناسی است. از نظر مولکولی، سرطان تخمدان به سه زیر گروه اصلی، متفاوت و مشخص (اپی تلیال، ژرم سل و سکس

کورد - استرومال^۱) تقسیم بندی می شود. نوع اپیتلیال آن حدود ۹۰-۹۵٪، ژرم سل و سکس مورد استرومال در مجموع با هم ۱۰-۵٪، سرطان های تخمدان را تشکیل می دهند و معمولاً در سنین پایین، نوجوانی و یا اوایل ۲۰ سالگی شناسایی می شوند و اکثر در مرحله S₁ با پروگنوز عالی تشخیص داده می شوند و به علت حساسیت آن ها به شیمی درمانی حتی در مراحل پیشرفته پاسخ درمانی خوبی دارند.



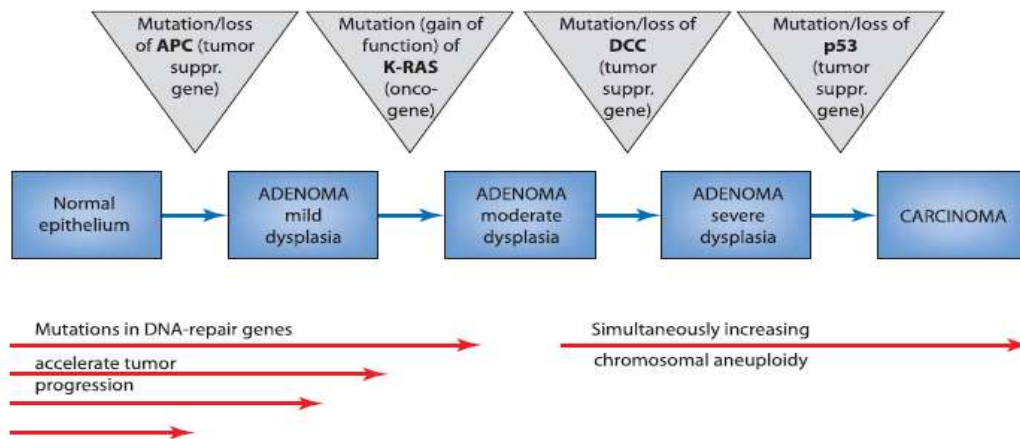
شکل ۸-۱ شیوع و تقسیم بندی انواع سرطان تخمدان از لحاظ هیستوپاتولوژیک

۶-۲-۱ چگونگی آغاز و پیشرفت سرطان تخمدان

سرطان تخمدان براساس منشا رشد سلولهای سرطانی انواع مختلفی دارد که تقریباً همیشه سرطانی شدن بافت تخمدان در سلولهای اپی تلیال^۲ (بیش از ۹۰ درصد موارد)، ژرم سل ها

^۱ Sexcord-stromal

^۲ Luminal cells



شکل ۱-۹ الگوی پیشرفت در سرطان تخمدان

یا سکس کورد ها صورت می گیرد. شروع سرطان تخمدان به علت تغییر فاکتورهای ژنتیکی و اپی ژنتیکی در سلولهای اپیتلیال است که با تکثیر بیش از حد سلول های اپیتلیال همراه می باشد و پس از آن به آدنوما ۱، کارسینوم و کارسینوم مهاجم ۲ تکامل می یابد و در نهایت پیشرفت و متاستاز بیماری به دلیل تجمع تغییرات ژنتیکی اضافی به همراه گسترش کلونال ۳ صورت می گیرد (۳۰). در شکل شماره این روند بصورت شماتیک نشان داده شده است.

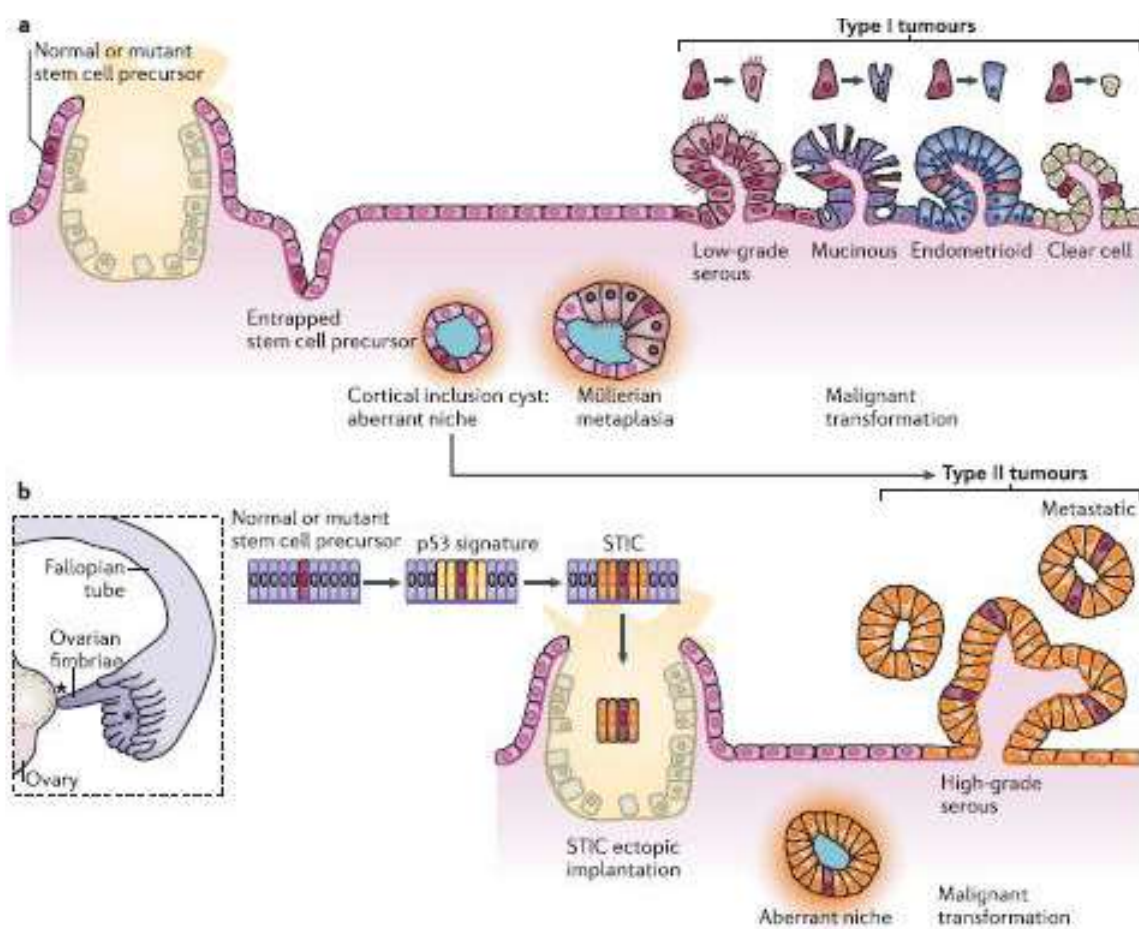
از لحاظ آسیب شناسی مولکولی دو نوع مسیر جهت تومورزایی سرطان تخمدان مطرح می باشد. این مسیرها از لحاظ مراحل تکاملی سرطان حایز اهمیت هستند. مسیر تیپ I شامل نومورهای با درجه پیشرفت کم که بصورت مرحله ای رشد می کنند. بدین ترتیب که از یک پیش ساز اولیه کاملاً شناخته شده، مانند تومور **Boorder Line** به وجود می آیند که این تومور خود از یک سیست آدنوم و یا آدنوفیروما منشأ گرفته است. این دسته از تومورها رشد کندی دارند، اغلب بزرگ بوده و هنگام تشخیص محدود به تخمدان هستند. مسیر تیپ II در هنگام تشخیص در مراحل پیشرفته هستند و معمولاً از یک پیش ساز اولیه ایجاد نمی شوند، بلکه از اپی تلیوم سطحی تخمدان و یا کیست تخمدان به صورت **De novo** بوجود می آیند و به سرعت تکامل پیدا کرده، متاستاز داده و بسیار مهاجم هستند.

(شکل شماره)

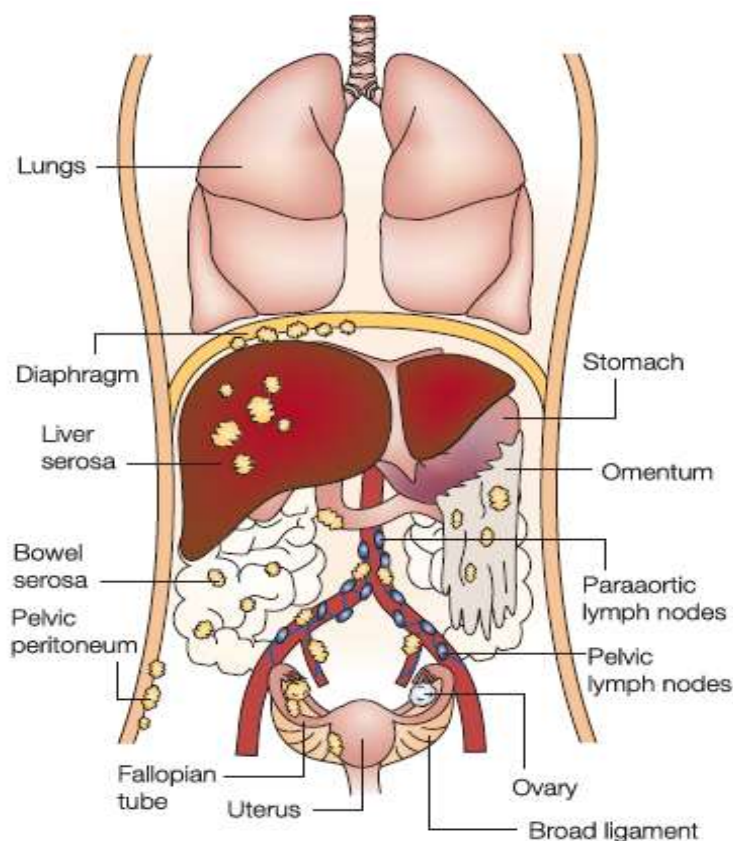
- ۱ In situ carcinoma
- ۲ Invasive carcinoma
- ۳ Clonal expansion

جدول ۱-۱ انواع مسیر تومورزایی، فراوانی و نوع پیش سازهای تیپ I و II

	Type 1	Type 2
Molecular signatures	BRAF, KRAS, PTEN, b catenin	TP53
Genomic instability	low	high
Frequency	20%	80%
Precursors	adenoma/ borderline tumors, endometriosis	de novo
Prognosis	stage 1, slow evolution	> stage 1, fast evolution
Histological sub-types	low grade serous, endometrioid, mucinous, clear cell carcinoma	high-grade serous, non-differentiated carcinoma, carcinosarcoma



شکل ۱۰-۱۱ الگوی پیشرفت و تکاملی سرطان تخمدان تیپ I و II



الگوهای انتشار سرطان تخمدان به شرح زیر است:

انتشار ترانس سلومیک: در این الگو سلول های سرطانی ریزش کرده و در سطح حفره صفاق کاشته می شوند. این سلول ها معمولاً مسیر گردشی مایع صفاق را دنبال می کنند. این راه رایج ترین و زودرس ترین مسیر انتشار این سرطان است.

انتشار لنفاتیک: روشی رایج است که گسترش تومور از راه لنفمی باشد، به ویژه در مراحل پیشرفته است.

شکل ۱-۱۱ الگوهای انتشار سرطان تخمدان

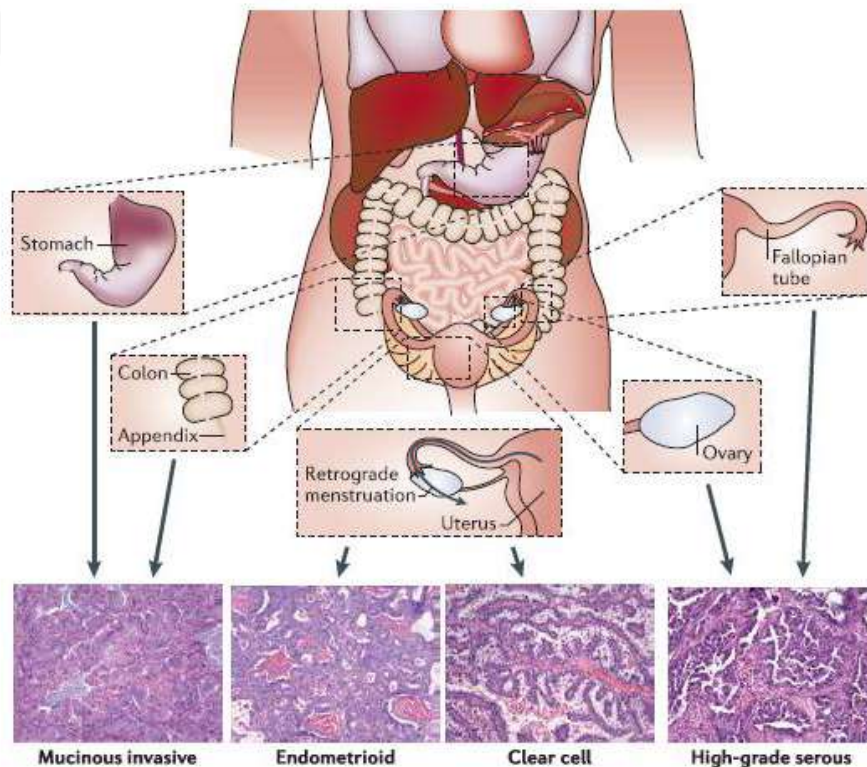
انتشار خونی: انتشار خونی در زمان تشخیص رایج نیست. انتشار به پارانشیم اعضای حیاتی مانند ریه ها، کبد و تنه در ۲ تا ۳ درصد بیماران دیده می شود. (شکل شماره) سلول های سرطانی به بافت های اطراف و اندام های دورتر مهاجرت کرده و در نهایت منجر به متاستاز شوند. بیش ترین مرگ و میر ناشی از سرطان تخمدان به علت متاستاز است (۳۱، ۳۲).

۷-۲-۱ طبقه بندی سرطان تخمدان

هدف اصلی طبقه بندی سرطان تخمدان انتخاب بهترین گزینه درمانی و تشخیصی برای هر یک از زیرگروه های این بیماری است و با توجه به هتروژنیتهی بالای سرطان تخمدان، طبقه بندی بر مبنای معیارهای گوناگونی انجام می شود. که در اینجا به دو مورد آن اشاره می شود:

۱-۲-۷-۱ طبقه بندی سرطان تخمدان بر مبنای وضعیت بافت شناسی

رایج ترین طبقه بندی سرطان تخمدان بر اساس وضعیت بافت شناسی^۱ است که با توجه به مشاهده ویژگی های نمونه بیوپسی با استفاده از میکروسکوپ نوری انجام می شود. این سرطان به دو دسته اصلی اپی تلیال و غیر اپیتلیال (ژرم سل و سکس کورداسترومال) تقسیم می شوند. همانطور که قبلا ذکر شد ، تقریبا ۹۰٪ سرطان های تخمدان را سرطان اپی تلیال تخمدان تشکیل می دهد که بسیار هتروژن بوده و رده بندی هیستولوژی آن براساس ، نوع سلول درگیر است که مشتمل بر سروزی ، موسینوسی ، اندومتريال ، سلول روشن و برنز می باشد و با انواع گوناگون سلول های اپی تلیال تخمدان در دستگاه تناسلی زنانه منطبق است.



شکل ۱-۱۱ الگوی هیستوپاتولوژیک انواع سرطان تخمدان

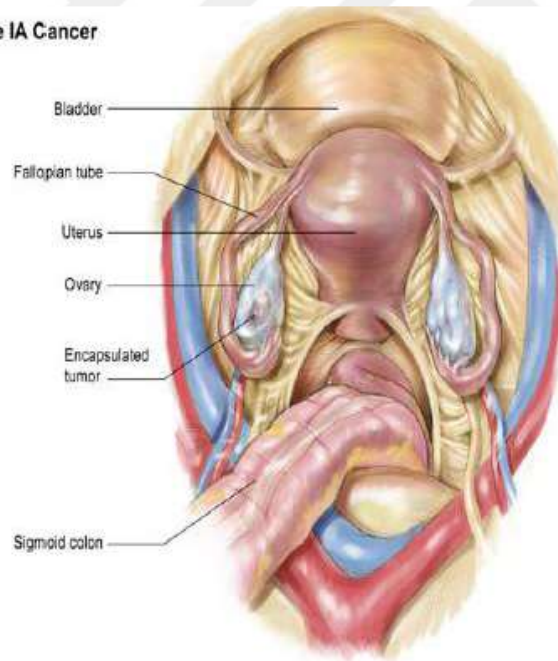
۱-۲-۷-۲ طبقه بندی سرطان براساس درجه (گرید) سرطان

درجه بندی سرطان پستان بر اساس میزان شباهت میکروسکوپی سلول های سرطانی بافت پستان با بافت طبیعی پستان صورت می گیرد و به ۹ زیر گروه اصلی تقسیم می شود:

^۱ histological status

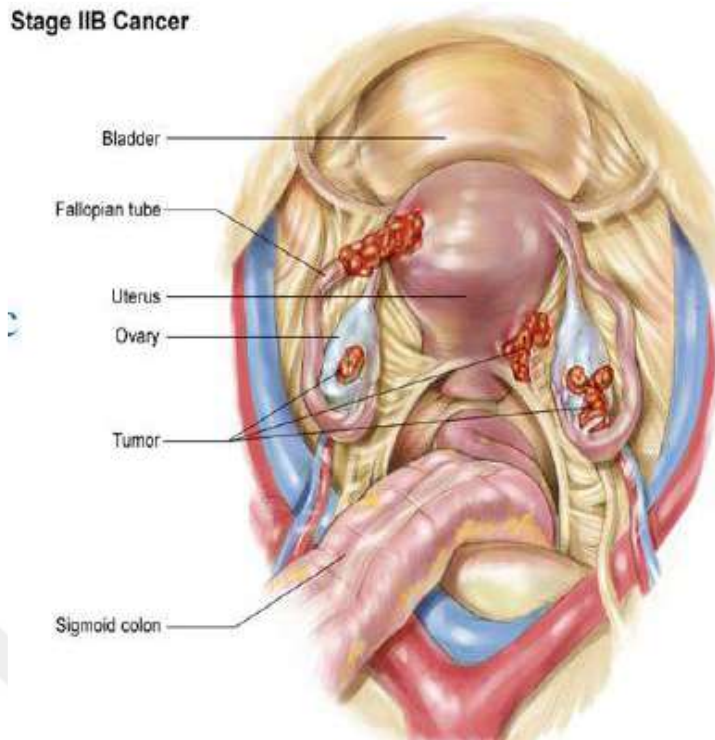
- سرطان تخمدان با گرید IA (درگیری یک تخمدان به تومور)
- سرطان تخمدان با گرید IB (درگیری هر دو تخمدان بوسیله تومور)
- سرطان تخمدان با گرید IC (درگیری یک یا هر دو تخمدان ها ، وجود سلولهای بدخیم در مایع آسیت)
- سرطان تخمدان با گرید IIA (درگیری تخمدان ها و پیشرفت تومور به لوله های فالوپ یا جسم رحم)
- سرطان تخمدان با گرید IIB (مشخصات گرید IIA به همراه گسترش تومور و درگیری روده ها)
- سرطان تخمدان با گرید IIIA (علایم گرید IIB به همراه درگیری گره های لنفاوی)
- سرطان تخمدان با گرید IIIB (درگیری و پیشرفت تومور به کبد و طحال)
- سرطان تخمدان با گرید IIIC (بروز علایم بالینی بیشتر و شدیدتر گرید IIIB)
- سرطان تخمدان با گرید IVA & IVB (متاستاز کامل به فضای خارج شکمی)

Stage IA Cancer



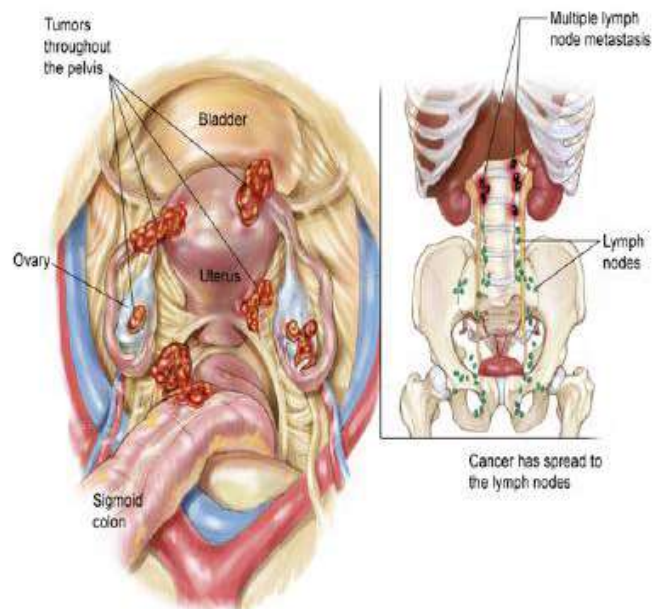
شکل ۱-۱۲ سرطان تخمدان با گرید IA

Stage IIB Cancer



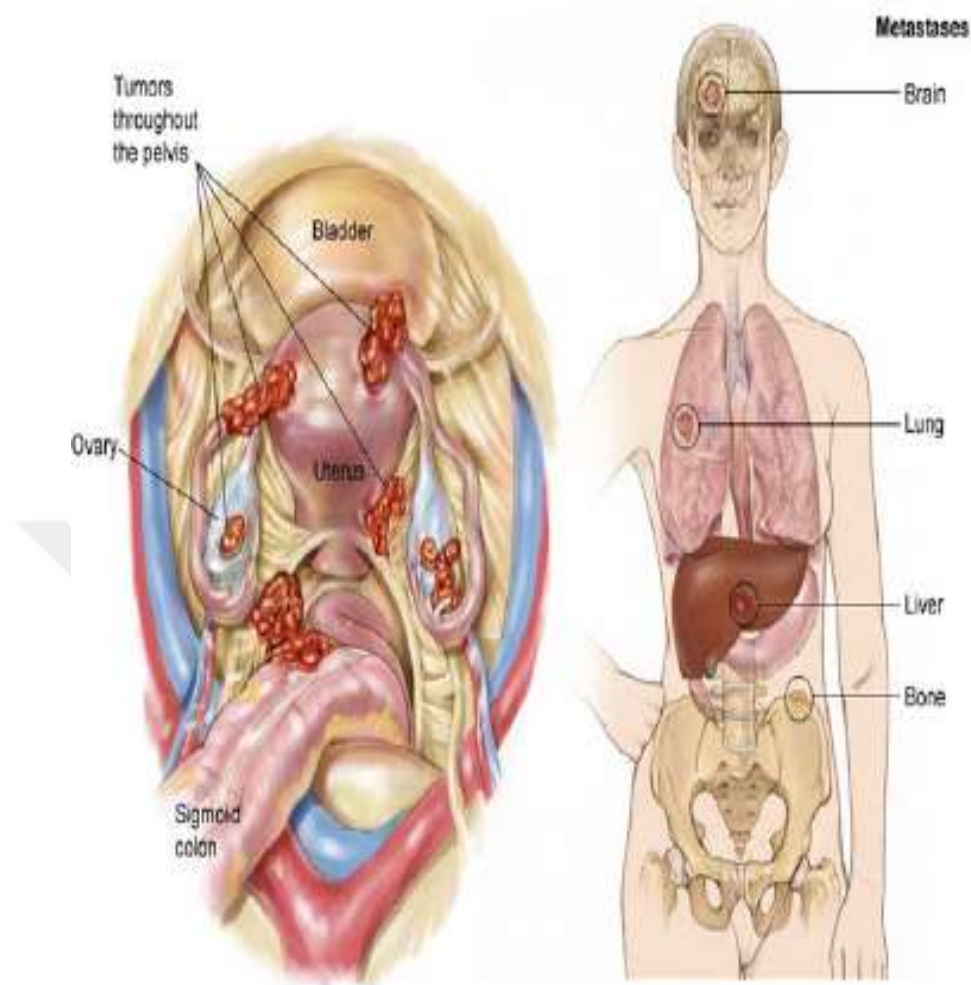
شکل ۱-۱۳ سرطان تخمدان با گرید IIB

Stage IIIC Cancer



شکل ۱-۱۴ سرطان تخمدان با گرید IIIC

Stage IV Cancer



شکل ۱-۱۵ سرطان تخمدان با گرید IV

۸-۲-۱ علائم سرطان تخمدان

علائم اولیه سرطان تخمدان ممکن است غیرقابل مشاهده یا ضعیف باشند. در بیشتر موارد، علائم چند ماه قبل از تشخیص وجود دارد. علائم را می‌توان با علت سندرم روده تحریک پذیر اشتباه گرفت. مراحل اولیه سرطان تخمدان بدون درد هستند. علائم می‌توانند بر اساس نوع زیر متفاوت باشند. تومورهای پرفیوای بدخیم (LMP)، که به عنوان تومورهای مرزی نیز شناخته می‌شوند، باعث افزایش CA125 نمی‌شوند و با سونوگرافی قابل تشخیص نیستند. علائم معمول یک تومور LMP می‌تواند شامل شکاف شکمی یا درد لگن باشد. به خصوص توده‌های بزرگ تمایل به خوش‌خیم یا مرزی دارند. مهم‌ترین علامت سرطان تخمدان، وجود یک توده یا تومور در داخل لگن به هنگام معاینه است که ممکن است با درد و فشار در لگن، یبوست یا تکرر ادرار، خود را نشان بدهد. درد شدید در قاعدگی و درد در موقع

مقاربت ممکن است از علائم دیگر این تومورها باشد. بنابراین توجه به علائم فوق اهمیت دارد و به خصوص خانم ها در صورت احساس بزرگی شکم حتما باید مورد بررسی قرار گیرند. اختلالات قاعدگی و خون ریزی در خانم های مُسن که سال ها است یائسه شده اند از دیگر علائم این تومورها است. متاسفانه وقتی تومور تخمدان موجب بزرگی شکم، خون ریزی یا وجود مایع در شکم می شود ممکن است مدت ها از شروع بیماری گذشته باشد، بنابراین به کلیه خانم ها در سنین باروری و پس از یائسگی باید توصیه کرد که حتی در صورتی که هیچ گونه مشکلی ندارند حداقل سالانه مورد معاینات لگنی انجام پاپ اسمیر قرار گیرند و در صورت شک به توده های لگنی، سونوگرافی رحم و تخمدان ها خصوصا به طریق واژینال برای بررسی دقیق، انجام شود.

به علت قرار گرفتن تخمدان ها در عمق لگن، علائم سرطان تخمدان دیر ظاهر می شود. با این حال علائم

سرطان تخمدان می تواند شامل موارد زیر باشد:

0 آروغ زدن، نفخ شکمی و مشکلات گوارشی

0 احساس فشار و درد در لگن یا پشت پاها

0 تورم و درد در شکم

0 اشکال در خوردن و به سرعت احساس پری کردن

0 نیاز به ادرار کردن مکرر یا فوری

البته علائم ذکر شده خیلی غیراختصاصی و مبهم هستند و ممکن است با بسیاری از بیماری های دیگر مانند سندروم روده تحریک پذیر، مشکلات قاعدگی و عفونت های مثانه هم همراه باشند.

۹-۲-۱ تشخیص سرطان تخمدان:

روش های مختلفی برای تشخیص سرطان تخمدان وجود دارد که مهم ترین آنها عبارتند از:

۹-۲-۱-۱ معاینه فیزیکی

برای شناسایی، پزشک علائم عمومی ذکر شده در بالا را بررسی می کند. و برای بررسی احتمال وجود تومورها یا هرگونه تجمع غیرعادی مایعات (آسیت یا مایع داخل صفاقی) در ناحیه شکم، با استفاده از انگشتان خود این ناحیه را لمس کرده و به آرامی روی آن فشار وارد می کند. می توان نمونه ای از مایعات را خارج کرد و این نمونه را از لحاظ دارا بودن سلول های سرطان تخمدان مورد بررسی قرار داد. معاینه دیگر، معاینه لگنی جهت بررسی تخمدان ها و اندام های مجاور آن را از لحاظ وجود توده ها یا هرگونه تغییری در شکل و اندازه شان می باشد.

۲-۹-۲-۱ آزمایش خون

در این تست سطح چندین ماده درون خون از جمله سی.ای.۱۲۵ (CA-125) بررسی می‌شود. سی.ای.۱۲۵ (CA-125) ماده‌ای است که روی سطح سلول‌های سرطانی تخمدان یافت می‌شود. بالا بودن آن می‌تواند نشان‌دهنده ابتلای فرد به سرطان یا وجود مشکلات دیگر باشد. تست سی.ای.۱۲۵ (CA-125) به‌تنهایی برای تشخیص سرطان تخمدان استفاده نمی‌شود. در این خصوص از سایر مارکرها چون HE₄ و OVA₁ نیز استفاده می‌شود، در جدول شماره به این تست‌ها اشاره شده است.

۳-۹-۲-۱ سونوگرافی

دستگاه سونوگرافی از امواج صوتی که توسط انسان قابل شنیدن نیستند استفاده می‌کند. این دستگاه، امواج صوتی را به سمت اندام‌های درون لگن می‌فرستد، که به اندام‌ها برخورد کرده و بازتاب‌هایی ایجاد می‌کنند، و کامپیوتر با استفاده از این بازتاب‌ها (اکوها) تصاویری را ایجاد می‌کند. ممکن است تومور تخمدان، درون این تصاویر قابل مشاهده باشد. برای وضوح بیشتر تخمدان‌ها در تصاویر بهتر است دستگاه درون واژن (مهبلی) قرار داده شود. (سونوگرافی از طریق مهبل یا سونوگرافی واژینال) گردد. به طور کلی اگر این ترشحات شفاف یا شیری رنگ باشد خطر ایجاد سرطان وجود ندارد اما اگر رنگ آن قرمز یا قهوه‌ای باشد احتمال وجود سرطان بیشتر است.

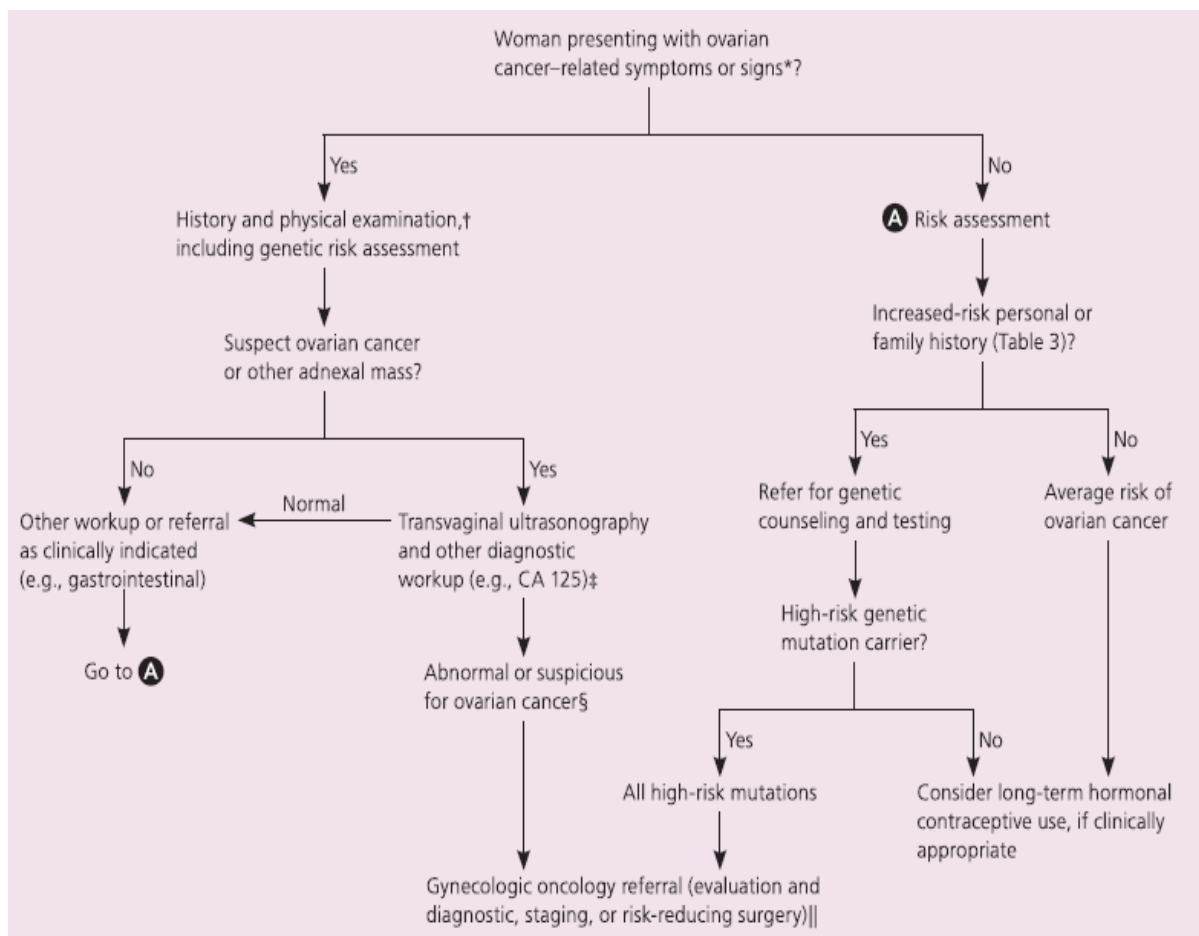
۴-۹-۲-۱ نمونه برداری^۱:

نمونه برداری زمانی صورت می‌گیرد که معاینات فیزیکی وجود ناهنجاری در تخمدان را نشان داده باشد. نمونه برداری به معنای خارج کردن بافت یا مایعات از بدن برای بررسی وجود سلول‌های سرطانی در آنها است. این روش با توجه به نتایج آزمایش خون و سونوگرافی برای خارج کردن بافت و مایع از لگن یا شکم با استفاده از جراحی (باز کردن دیواره شکمی یا لاپاراتومی) انجام می‌شود معمولاً برای تشخیص دقیق‌تر سرطان تخمدان نیاز به جراحی خواهد بود. تشخیص نمونه برداری توسط متخصص آسیب شناسی صورت می‌گیرد و بافت برداشته شده زیر میکروسکوپ مشاهده می‌گردد. نمونه برداری تنها راهی است که به طور قطعی می‌تواند وجود سرطان را مشخص کند.

جدول (۲-۱) شماره مارکرها و روش های تشخیصی سرطان تخمدان

Marker	Source	Details	Marker Type	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Reference
CA-125	Serum	Cell surface glycoprotein	Protein	89	72	Moss et al. (2005)
HE4 (ROMA)	Serum	HE4 used in conjunction with CA-125	Protein	83	90	Wu et al. (2012)
				94.3	75	Moore (2010)
OVA1	Serum	CA-125 II, transthyretin (prealbumin), apolipoprotein A1, b2-microglobulin, and transferrin	Protein	93	43	Abraham (2010); Muller (2010)
RMI	Serum, imaging, and menopausal status	Ultrasound, menopausal status, and CA125	Protein and imaging and menopausal status	71-88 84.6	74-97 75	Moore (2010)
Ultrasound	Imaging	Morphologic (gray scale) ultrasound	Imaging	88-100	39-87	Webb (2007)
FDG-PET	Imaging		Imaging	92	60	Fenchel et al. (2002)
FDG-PET, MRI, and ultrasound	Imaging	Combination of three imaging modalities	Imaging	92	85	Fenchel et al. (2002)

در شکل شماره فلوجارتی نشان داده شده است که نحوه و مراحل تشخیصی سرطان تخمدان را براساس بلی یا خیر و کاربرد روشهای تشخیصی را بیان می دارد.



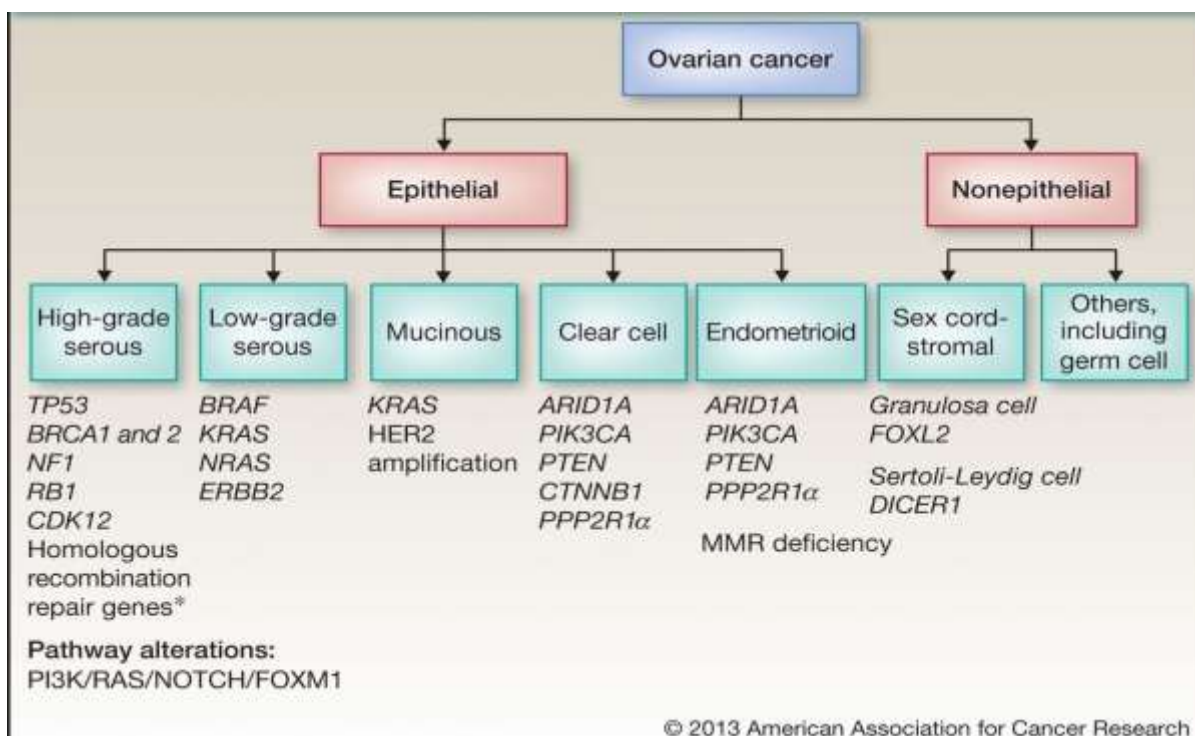
شکل ۱-۱۶ نمودار الگوریتمی مراحل تشخیص سرطان تخمدان

۱۰-۲-۱۱ اساس مولکولی و ژنی سرطان اپی تلیال تخمدان

همانطور که قبلاً ذکر شد، تقریباً ۹۰٪ سرطان‌های تخمدان را سرطان اپی تلیال تخمدان تشکیل می‌دهد که بسیار هتروژن بوده و رده بندی هیستولوژی آن براساس نوع سلول درگیر است که مشتمل بر سروزی، موسینوسی، اندومتريال، سلول روشن و برنر می‌باشند که در هر کدام ژن‌هایی مسئول جهش و ایجاد سرطان می‌باشد. در این خصوص دو مسیر تکاملی برای تومورزایی تشریح شد که در هر مسیر نوعی از تومور و سرطان ایجاد می‌شود.

جدول ۱-۳ اساس مولکولی و پیش سازی تومورهای مسیر تیپ I و II

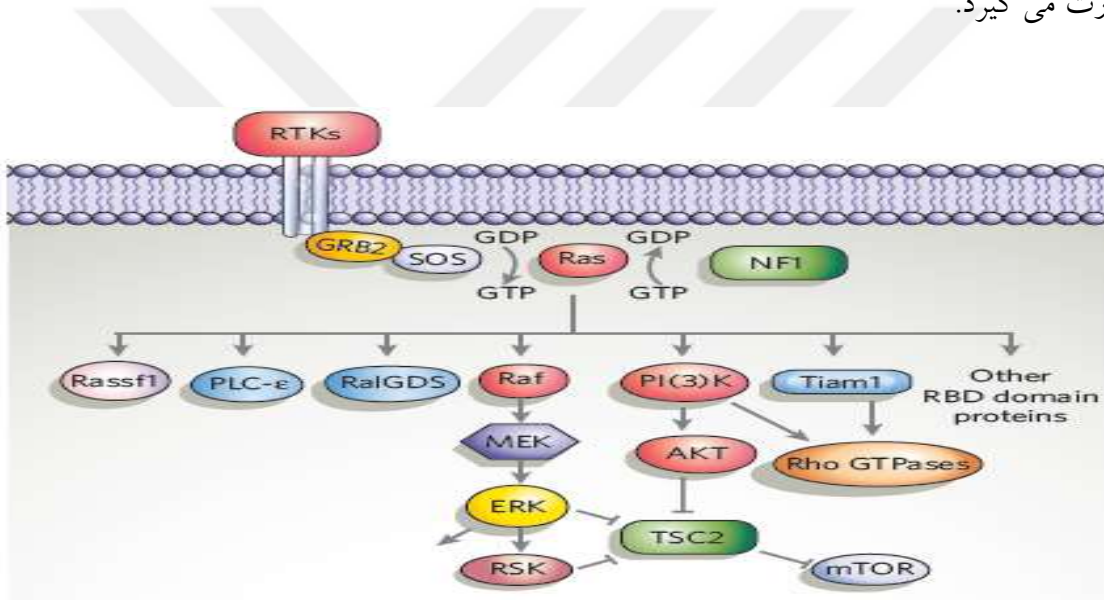
Type	Histology	Precursor	Molecular features
I	Low-grade serous carcinoma	Cystadenoma–borderline tumour–carcinoma sequence	Mutations in <i>KRAS</i> and/or <i>BRAF</i> (≥60%)
I	Low-grade endometrioid carcinoma	Endometriosis and endometrial cell-like hyperplasia*	Mutations in <i>CTNNB1</i> , <i>PTEN</i> and <i>PIK3CA</i> with microsatellite instability
I	Mucinous carcinoma	Cystadenoma–borderline tumour–carcinoma sequence; metastases from bowel	Mutations in <i>KRAS</i> ; <i>TP53</i> mutation associated with transition from borderline tumour to carcinoma
I	Clear cell carcinoma	Endometriosis	<i>PTEN</i> mutation or loss of heterozygosity; <i>PIK3CA</i> mutation†
II	High-grade serous carcinoma	De novo in epithelial inclusion cysts; fallopian tube	<i>TP53</i> mutation (up to 80%) and <i>BRCA1</i> dysfunction
II	High-grade endometrioid carcinoma	Epithelial inclusion glands or cysts	<i>TP53</i> mutation and <i>BRCA1</i> dysfunction; <i>PIK3CA</i> mutation



شکل ۱-۱۷ نمودار تقسیم بندی انواع سرطان اپی تلیال تخمدان و زن های دخیل در آنها

۱-۱۰-۲-۱-خانواده ژنی KRAS

هرچند که عوامل اتیولوژیک ایجادکننده سرطان تخمدان بخوبی شناخته شده نمی باشند اما پیش سازهای ژنتیکی همچون تغییر در مسیر ژنهای KRAS / BRAF که منجر به جهش در مسیر تیپ I تکامل زیستی سرطان تخمدان می گردند، به ویژه در سلولهای سوماتیک حائز اهمیت و بررسی می باشند. در این تحقیق از خانواده ژنی KRAS دو ژن های RASA1 و RASA1₁ که کننده پروتئین و از اجزا اصلی مسیر تیروزین کیناز MAPK / RAS می باشند مورد مطالعه قرار می گیرد. جهش های نقطه ای شایع در این ژن ها عملکرد GTPase را از بین برده و در نتیجه منجر به از دست رفتن توانایی غیرفعال سازی پروتئین توسط خود می گردند گسترش به اندام های دور، بیوپسی از اندام های آسیب دیده، ارزیابی رادیولوژیکی، تکنیک های تصویربرداری و مارکر های مربوط به تومور در سرم صورت می گیرد.



شکل ۱-۱۸ مسیر سیگنالینگ خانواده ژنی KRAS و BRAF

۱-۱۰-۲-۱-۱-ژن RASA1

RASA1 دستورالعمل هایی برای ساخت پروتئین به نام P120-RasGAP فراهم می کند. این پروتئین به تنظیم مسیر سیگنال RAS / MAPK کمک می کند که سیگنال ها را از داخل سلول به هسته سلول منتقل می کند. مسیر سیگنال RAS / MAPK موجب هدایت چندین توابع مهم سلولی می شود، از جمله رشد و تقسیم (تکثیر) سلول ها، فرآیندی است که سلول ها برای انجام وظایف خاص (تمایز) و سلول ها به آن متصل می شوند. پروتئین P120-RasGAP یک تنظیم کننده منفی مسیر RAS / MAPK signaling است، به این معنی که در هنگام غیرفعال کردن این سیگنال ها،

این سیگنال ها درگیر است. نقش دقیق P120-RasGAP به طور کامل درک نشده است. با این حال، به نظر می رسد که برای توسعه طبیعی سیستم عروقی ضروری است، که شبکه پیچیده ای از شریان ها، رگ ها و مویرگ ها است که خون را به و از قلب حمل می کنند.

در سرطان ها حداقل سه جهش در ژن RASA1 در یک نوع سرطان پوستی به نام کارسینوم سلول بازال تشخیص داده شده است. این جهش ها به صورت فیزیکی توصیف می شوند که در طی عمر انسان رخ می دهد و تنها در سلول هایی که سرطانی هستند، وجود دارد. محققان معتقدند جهش های ژن RASA1 منجر به از دست دادن عملکرد پروتئین p120-RasGAP می شود که ممکن است RAS / MAPK را به طور غیرمجاز کنترل کند. این سیگنالینگ RAS / MAPK غیرقابل کنترل می تواند منجر به گسترش غیرمرجع سلولی و تشکیل تومور سرطانی شود. ژنوتاسیون RASA1 تنها در درصد کوچکی از کارسینوم سلول های بازال یافت می شود و فکر نمی شود علت اصلی این سرطان ها باشد.

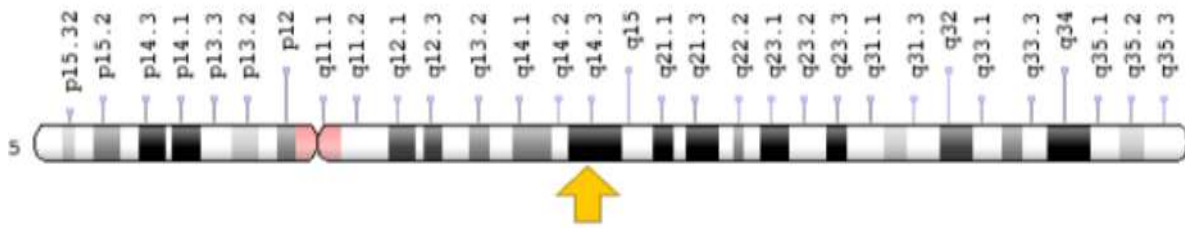
نام های دیگر ژن RASA1

- پروتئین فعال GTPase
DKFZp434N071•
- p120gap
P120•
- پروتئین فعال 1 GTPase
p120RASGAP•
- فعال کننده پروتئین RAS p21 (پروتئین فعال کننده GTPase)
- RASA1_HUMAN
RASA•
- پروتئین فعال تری فسفاتاز
RASGAP•

موقعیت کروموزومی ژن

محل سیتوزنتیکی: q14.3، بازوی بلند (q) کروموزوم ۵ در موقعیت ۱۴,۳ است.

محل مولکولی: جفت باز ۸۷,۲۶۷,۸۰۱ تا ۸۷,۳۹۱,۹۲۶ بر روی کروموزوم ۵ است.



شکل ۱-۱۹ کروموزوم ۵ و موقعیت ژن RAS1 بر روی آن

۲-۱-۱۰-۲-۱ ژن RAS1

پروتئین کدگذاری شده توسط این ژن متعلق به خانواده GAP1 پروتئین فعال GTPase است. این پروتئین ها فعالیت RAS P21 GTPase طبیعی را تحریک می کنند، اما نه آنزیم آنکوژنیک آن. به عنوان یک مهار کننده از عملکرد RAS، پروتئین فعالیت ضعیف داخلی GTPase از پروتئین های RAS را افزایش می دهد که باعث ایجاد فرم RAS ناخواسته ناخواسته می شود، در نتیجه اجازه کنترل پروليفراسیون سلولی و تمایز را می دهد. این عضو خانواده خاص شامل دامنه هایی است که خصوصیات زیر گروه نسل GAP1 پروتئین RasGAP هستند اما در مقایسه با سایر اعضای خانواده GAP1 این پروتئین به شدت و انتخابی در بافت های غدد درون ریز منتشر می شود. به طور خلاصه، انواع رونویسی تقسیم شده که ایزوفرم های مختلف را رمزگذاری می کنند، شرح داده شده است.

نام های دیگر ژن RAS1

- RAS Protein Activator Like 1
- Ras GTPase-Activating-Like Protein
- RASAL
- RAS Protein Activator Like 1 (GAP1 Like)
- RasGAP-Activating-Like Protein 1

موقعیت کروموزومی ژن

منطقه q24.13 روی کروموزوم ۱۲



شکل ۱-۲۰ کروموزوم شماره ۱۲ و موقعیت ژن RAS11

۱۱-۲-۱ خانواده ژنی BRAF

ژن BRAF دستورالعمل هایی برای ساخت پروتئین فراهم می کند که به انتقال سیگنال های شیمیایی از خارج سلول به هسته سلول کمک می کند. این پروتئین بخشی از مسیر سیگنالینگ است که به عنوان مسیر RAS / MAPK شناخته می شود که چندین عامل سلولی مهم را کنترل می کند. به طور خاص، مسیر RAS / MAPK رشد و تقسیم (تکثیر) سلول ها را تنظیم می کند، فرآیندی که سلول ها برای انجام کارهای خاص (تمایز)، حرکت سلولی (مهاجرت) و خودکفایی سلول ها (آپوپتوز) را تحریک می کند. سیگنالینگ شیمیایی از طریق این مسیر برای رشد طبیعی قبل از زایمان ضروری است. ژن BRAF متعلق به یک کلاس از ژن های شناخته شده به عنوان oncogenes است. وقتی که oncogenes mutated بالقوه باعث ایجاد سلول های طبیعی تبدیل به سرطانی می شود.

نام های دیگر ژن BRAF

94 kDa B-raf protein

B-raf 1

B-Raf proto-oncogene serine/threonine-protein kinase

BRAF1

BRAF1_HUMAN

Murine sarcoma viral (v-raf) oncogene homolog B1

p94

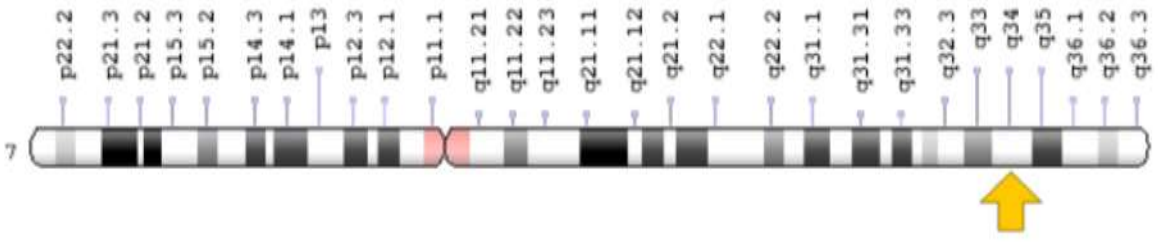
RAFB1

v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B

موقعیت کروموزومی ژن

محل سیتوژنتیکی: بازو طولانی (q) کروموزوم ۷ در موقعیت ۳۴ است

محل مولکولی: جفت باز ۱۴۰۷۱۹۳۳۱ تا ۱۴۰۹۲۴۷۶۴ در کروموزوم ۷ است



شکل ۱-۲۱ کروموزوم شماره ۷ و موقعیت ژن BRAF



فصل دوم

مروری بر مطالعات انجام شده



۲-۱ مروری بر مطالعات انجام شده

سرطان های اپی تلیال تخمدان، تومورهای موسینوسی و اندومتريال معمولاً کارسینوهای بدخیم و تهاجم دهنده هستند. تومورهای سرورزی معمولاً مهاجم و متاستاتیک نمی باشند. هرچند که عوامل اتیولوژیک ایجادکننده سرطان تخمدان بخوبی شناخته شده نمی باشند اما پیش سازهای ژنتیکی همچون تغییر در مسیر ژنهای KRAS / BRAF که منجر به جهش در مسیر تیپ I تکامل زیستی سرطان تخمدان می گردند، به ویژه در سلولهای سوماتیک حائز اهمیت و بررسی می باشند. (۱ و ۳ و ۴)

در این تحقیق از خانواده ژنی KRAS دو ژن های RASA1 و RASA11 که کننده پروتئین و از اجزا اصلی مسیر تیروزین کیناز MAPK / RAS می باشند مورد مطالعه قرار می گیرد. (۹ و ۸ و ۷) جهش های نقطه ای شایع در این ژن ها عملکرد GTPase را از بین برده و در نتیجه منجر به از دست رفتن توانایی غیرفعال سازی پروتئین توسط خود می گردند. (۲)

در مطالعه X Ding و همکاران، فراوانی جهش RASA1 بیشتر در تومورهای Myeloid cancer (5-28%) Colorectal Cancer, Gastric Cancer, lung cancer (17-33%), Thyroid cancer (60%-20) بررسی و مشخص گردیده شده است. (۲۱ و ۲۰) همچنین جهش در RASA1 در تومورهای Hereditary (HHT) - Skin Cancer (BCC) hemorrhagic نیز مشخص شده است. (۲۲)

همچنین در مطالعه Miki و همکاران، فراوانی جهش RASA11 بیشتر در تومورهای Myeloid cancer (5-28%) Colorectal Cancer, Gastric Cancer, lung cancer (17-33%), Thyroid cancer (60%-20) بررسی و مشخص گردیده شده است.

در مطالعه Nodin و همکاران جهش در خانواده ژنی k-RAS بین ۱۱/۱ تا ۱۸ درصد سرطان های اپی تلیال تخمدان وجود داشته است. (۲۰)

جهش ژن دیگر مورد نظر از خانواده ژنی BRAF می باشد که شامل بررسی BRAFV600E می باشد که وجود آن در سرطانهای ملانوما (Melanoma) و سیستم عصبی مرکزی (CNS) اثبات و مشخص گردیده است.

RASA1 نقش القا کننده در خصوص RASP21 دارد و در واقع به عنوان یک سرکوب گر فعالیت RAS با افزایش فعالیت در Weak intrinsic عمل کرده و باعث سیگنال دهی نابجا از طریق مسیره های PBK – Akt, RAF- MEKERK می گردد. (۲۲)

این سیگنال دهی نابجا باعث down regulation در RASA1 و افزایش عدم تمایز سلولی می گردد. ضمناً RASA1 در آنژیوژنز و پیشرفت تومور نیز نقش احتمالی دارد. (۲۴)

با وجود این و نیز بررسی های صورت گرفته تاکنون مطالعات اندکی در خصوص نقش و بررسی فراوانی جهش ژنهای RAS1 و RAS11 و BRAFV600E در سرطان تخمدان انجام پذیرفته است.

مطالعات بعدی نشان داد که اخیراً، فعال شدن جهش در یکی از ایزوفرمهای B-raf، در دصد زیادی از (< 60%) از ملانوم بدخیم انسان یافت شده است و در برخی از توده های کولون، تیروئید و ریه 5 جهش های مرتبط با تومور در B-raf دیده شد که جهش باعث ایجاد همبستگی متقابل بین اعضای خانواده BRAF می شود، مانند C-raf (همچنین Raf-1 نامیده می شود)، که پس از آن سیگنال ERK downstream را فعال می کند.

بیشتر تغییرات مولکولی در تومورهای تیپ 1، مشتمل بر جهش در مسیر KRAS و BRAF می باشد. در مطالعاتی که در سال 2003 توسط سینگر و همکاران صورت گرفت جهش در KRAS در کدون 12 و 13 در 35% سرورکارسینوما با درجه پیشرفت کم و 33% تومورهای Border Line دیده شد. (57)

در همین مطالعه جهش BRAF در کدون 599 در 30% موارد با سرورکارسینوما با درجه پیشرفت کم و 28% تومورهای Border Line دیده شده است اما در تومور های سرورکارسینوما پیشرفته دیده نشد جهش در BRAF و KRAS شبیه یافته های موجود در ملانوما و کارسینوم کولورکتال است. (57)

در مطالعات ایما و همکاران در سال 2011 جهش شایع BRAFV600E در ملانوم، سرطان لورکتال و تیروئید مشاهده شد. (51)

در مطالعه راشل و هکاران در سال 2012 جهش های BRAF V600E در 35% بیماران مبتلا به سرطان تخمدان SB / LGS وجود داشت. این جهش BRAF V600E در سرطان تخمدان SB / LGS همراه با بیماری زودرس و پیش آگهی بهبود یافته بود. (52)

جدول ۲-۱ یافته های بدست آمده از بررسی راشل و همکاران برای ژن BRAFV600E

Characteristic	No. of Patients (%)
Total	75
Age at diagnosis: Median/mean [range], y	47/46.3 [15-79]
Disease stage	
I/II	45 (60)
III/IV	30 (40)
Histology	
Serous borderline	56 (74.7)
Low-grade serous	19 (25.3)
Mutation	
KRAS G12D/G12V	17 (22.7)
BRAF V600E	26 (34.7)
WT for KRAS and BRAF	32 (42.7)
Clinical status	
Alive at last follow-up	68 (90.7)
Dead	7 (9.3)

در بررسی سادلکی و همکاران در سال ۲۰۱۷ بررسی جهش BRAF می تواند با یک پیش آگهی قوی تومورهای مرزی سروزی را تشخیص دهد. (۵۳)

در مطالعه آنی و همکاران، جهش های جدید BRAF در آگزون ۴ و آگزون ۱۲ و همچنین اولین جهش در MEK1 مربوط به سرطان انسان را گزارش می دهد. داده های عملکردی نشان می دهد جهش MEK1 ممکن است تغییرات فعال سازی را از طریق مسیر MAPK فراهم کند. (۵۴)

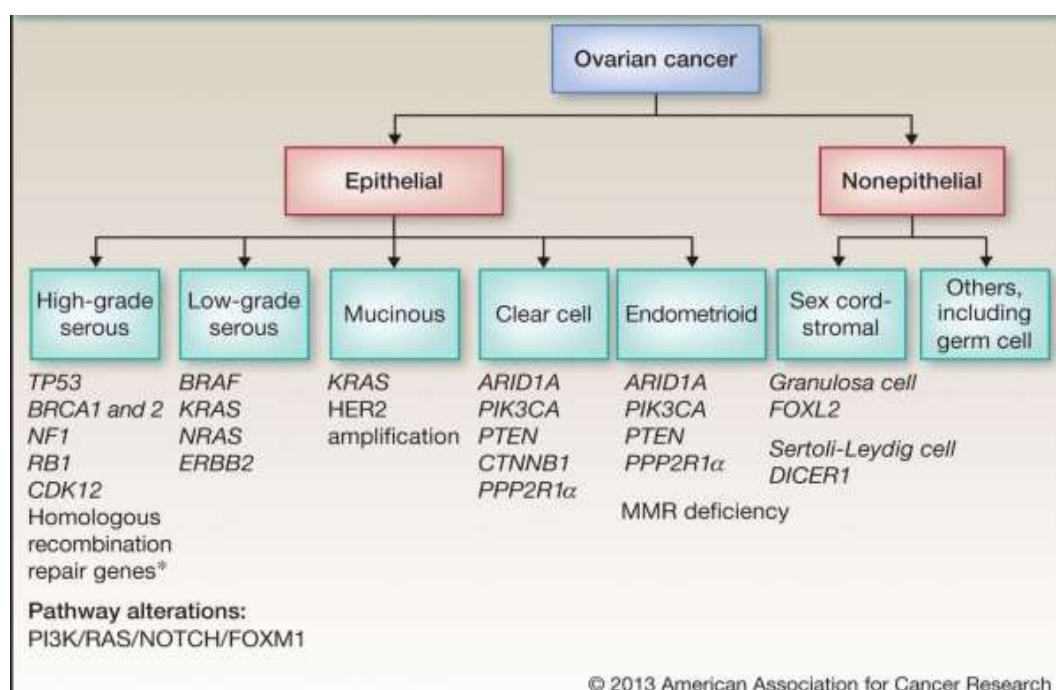
اهمیت این یافته ها این است که جهش های BRAF و MEK1 / 2 شایع تر از حد انتظار در سرطان تخمدان است که می تواند پیامدهای مهمی را برای درمان بیماران مبتلا به این بیماری داشته باشد و راه های بالقوه جدید درمان را نشان می دهد. بررسی مپی و همکاران در سال ۲۰۱۶، در کارسینومای سرطان تخمدان با درجه پیشرفت پایین فراوانی جهش های فعال در خانواده ژنی KRAS و BRAF وجود دارد. (۵۴)

در بررسی بعمل آمده توسط بروس و همکاران در سال ۲۰۱۲ نتیجه گرفتند که جهش RASA1 مسئول بروز بیماری لنفاوی بدخیم است. (۵۵)

در مطالعه وونگ و همکاران در سال ۲۰۰۸، بیان RASAL1 در سلولهای CRC که حاوی ژن KRAS وحشی هستند کاهش می یابد. کاهش در بیان RASAL1 در ضایعات پیشرفته بیشتر از آدنوم های کوچک تشخیص داده می شود، که نشان می دهد RASAL1 در پیشرفت نئوپلاسم های خوش خیم کولون نقش دارد. (۵۶)

براساس بررسی های انجام شده توسط دولتخواه و همکاران در ایران در سال ۱۳۹۴ تمامی ۳۰ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال از نظر وجود موتاسیون ژن BRAF در آگزون شماره ۱۵ مورد بررسی با روش اختصاصی تعیین توالی مستقیم قرار گرفتند. هیچ موردی از جهش ژن در منطقه V600E مشاهده نگردید. (۵۹)

این یافته مشابه با چندین مطالعه از ایران و بعضی از کشورهای آسیایی می باشد. طی بررسی های بانرجی و همکاران در سال ۲۰۱۳ جهش در دو خانواده ژنی KRAS و BRAF جزو شایع ترین تغییرات ژنتیکی سوماتیکی در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال در کشورهای غربی می باشد. (۶۰)



شکل ۱-۲ جهش های شایع ژنی سرطان تخمدان در کشورهای غربی

فصل سوم

روش کار



۱-۳ روش کار

در این مطالعه موردی-شاهدی فراوانی جهش سه ژن $RASA_1$ و $RASA_1$ و $BRAFV600E$ در چهارگروه نمونه های تومور بیماران مبتلا به سرطان تخمدان، خون بیماران مبتلا به سرطان تخمدان، خون افراد سالم و نرمال با استفاده از تکنیک $Real\ Time\ PCR$ مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

برای انجام این پژوهش مراحل طی شده به شرح زیر می باشد:

۱. تعیین حجم نمونه
۲. جمع آوری نمونه های بافتی و خونی تازه از هر چهار گروه مورد بررسی
۳. تایید و گزینش نمونه ها توسط پاتولوژیست
۴. نگهداری بافتها در فریزر -80 درجه سانتیگراد
۵. استخراج توتال DNA از همه ی نمونه های تازه با روش ستونی
۶. تایید کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از Run کردن در ژل آگارز ۲٪
۷. انجام $Gradiant\ PCR$ برای $RASA_1$ جهت یافتن دمای اتصال بهینه ی ۱ پرایمر ویژه ی این ژن
۸. انجام $Gradiant\ PCR$ برای $RASA_1$ جهت یافتن دمای اتصال بهینه ی پرایمر ویژه ی این ژن
۹. انجام $Gradiant\ PCR$ برای $BRAFV600E$ جهت یافتن دمای اتصال بهینه پرایمر ویژه ی این ژن
۱۰. انجام واکنش $Realtime\ PCR$ برای $RASA_1$ در همه ی نمونه های مورد بررسی
۱۱. انجام واکنش $Realtime\ PCR$ برای $RASA_1$ در همه ی نمونه های مورد بررسی
۱۲. انجام واکنش $Taqman\ prob\ Realtime\ PCR$ برای $BRAFV600E$ در همه ی نمونه های مورد بررسی
۱۳. تعیین تغییرات میزان فراوانی ژن های مورد بررسی در گروه های مختلف نسبت به گروه نرمال
۱۴. مقایسه میانگینمیزان فراوانی ژن های مورد بررسی در گروه های مختلف با استفاده از آزمونهای آماری

۳-۱-۱ مواد مورد استفاده در مطالعه

جدول ۳-۱: لیست ترکیبات و محلول های شیمیایی مورد استفاده

Compounds	chemical formula	Producer
Ethanol 96%-50%	C ₂ H ₅ OH	Ghadir (Iran)
Agarose	C ₂₄ H ₃₈ O ₁₉	Pars Tous (Iran)
Bromophenol blue (Loading dye)	C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S	Merck (Germany)
Green Viewer TM		Pars Tous (Iran)

جدول ۳-۲: فهرست کیت های مورد استفاده

Kit	Producer	Cat Number
DNA Extraction	Pars tous(Iran)	A101211

جدول ۳-۳: مستر میکس ها و پرایمرهای مورد استفاده

Reagent	Producer	
GAPDH primer	MACRO GENE Pishgam Biotech(Iran)	جدول ضمیمه
RASA ₁ primer	QIAGENE (Germany)	-
RASA ₁ primer	QIAGENE (Germany)	-
BRAFV600E primer	QIAGENE (Germany)	-
BRAFV600E prob	QIAGENE (Germany)	جدول ضمیمه

۱-۲-۳ تعیین حجم نمونه:

جهت تعیین تعداد نمونه های لازم با توجه به مقالات مشابه و بررسی آنها و برای معتبر بودن نتایج آزمایش و با توجه به اهداف تعیین شده در مطالعه به ۲۵ نمونه از هر یک از گروه ها نیاز بود:

۱. نمونه تومور
۲. نمونه خون بیماران مبتلا به تومور
۳. نمونه خون نرمال

۳-۱-۳ نمونه گیری و جمع آوری نمونه های مناسب:

نمونه گیری از آزمایشگاه آسیب شناسی بیمارستان قائم، امید و ۲۲ بهمن مشهد از دی ماه ۹۴ آغاز شد و تا خرداد ۹۶ ادامه یافت و در این مدت ۲۵ نمونه تومور؛ ۲۵ نمونه خون این افراد مبتلا به تومور و ۵۰ نمونه خون نرمال و ۵ نمونه بافت نرمال جمع آوری شد. همچنین تومور بودن همه ی نمونه ها تحت نظر متخصص آسیب شناسی تایید گردید. در نهایت نمونه ها تا زمان استخراج RNA در فریزر -80°C نگهداری شدند.

۳-۱-۴ استخراج DNA از بافت

مهم ترین و دشوارترین مرحله ی استخراج از بافت هموژن کردن بافت است. به طور کلی هموژن کردن بافت های مختلف را به چند روش می توان انجام داد:

بافت های نرمی مانند مغز را با پیپتینگ کردن و گذراندن از سوزن سرنگ و یا استفاده از هموژنایزهای دستی می توان هموژن کرد اما بافت های سخت تر را باید با هموژنایزر برقی و یا چندین بار فریز کردن در تانک ازت و سپس کوبیدن هموژن کرد. در این مطالعه ما دو روش هموژنایزر برقی و تانک ازت را آزمودیم و با توجه به مقدار کم بافت و سخت بودن آن، تانک ازت گزینه ی مناسب تری بود.

ابتدا حجم کوچکی از بافت (وزن تقریبی ۵۰ میلی گرم) با تیغ بیستوری برش داده شده و در فویل آلومینیومی استریل پیچیده شد. این نمونه ها بلافاصله در ازت مایع فریز و کوبیده شد تا نمونه ها کاملاً خرد شوند. این کار چندین مرتبه تکرار شد. در نهایت بافت که به صورت پودر درآمده بود؛ با احتیاط از روی فویل آلومینیومی به داخل میکروتیوب ۱/۵ منتقل شد.



شکل ۳-۱ نمونه های توموری بیماران



شکل ۳-۲ نمونه برداری از بافت



شکل ۳-۳ تانک ازت (نیتروژن مایع)



شکل ۳-۴ بافت منجمد و کوبیده شده



شکل ۳-۵ کیت استخراج DNA از بافت شرکت پارس توس

استخراج از همه بافت ها طبق پروتوکل کیت پارس توس و طبق دستور العمل زیر انجام یافت:

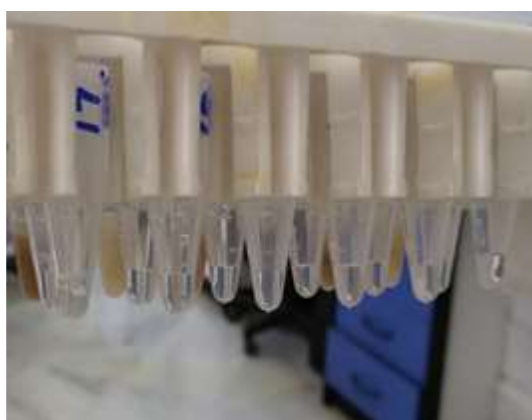
۱. مقدار ۲۰ میلی گرم از بافت منجمد و کوبیده شده را در میکروتیوپ ۱.۵ میلی لیتری می گذاریم و حجم ۲۰۰μL از محلول PL را به میکروتیوپ افزوده و حدود ۱۵ دقیقه از سر سوزن عبور داده شده تا کاملاً هموژن و در محلول حل شود.



شکل ۳-۶ هموژن کردن بافت با استفاده از سرنگ

۲. حجم ۲۰μL از پروتئوکیناز K را به میکروتیوپ افزوده، توسط دستگاه ورتکس به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط میکنیم بعد به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد در داخل بن ماری قرار داده شد.
۳. حجم ۲۰۰μL از محلول PTB را به میکروتیوپ افزوده مجدد به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس و بعد به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۵۶ درجه سانتیگراد قرار میدهم. سپس محلول رویی به میکروتیوپ ۱/۵ جدید انتقال یافت.
۴. حجم ۲۰۰μL از اتانول مطلق به میکروتیوپ افزوده شد و مدت ۱۵ ثانیه با مرتکس مخلوط شد.

۵. با دقت کل محتویات میکروتیوپ به ستون جداکننده منتقل داده شد و سانتریفیوژ 13000 rpm به مدت ۱ دقیقه در دمای 4^{0c} انجام شد. سپس میکروتیوپ و محلول زیری دور ریخته شد و میکروتیوپ جدید جایگزین شد.
۶. حجم 500μL از محلول PW1 به میکروتیوپ افزوده شد و سانتریفیوژ 13000 rpm به مدت ۱ دقیقه در دمای 4^{0c} انجام شد. سپس میکروتیوپ و محلول زیری دور ریخته شد و میکروتیوپ جدید جایگزین شد.
۷. حجم 700μL از محلول PW2 به میکروتیوپ افزوده شد و سانتریفیوژ 13000 rpm به مدت ۱ دقیقه در دمای 4^{0c} انجام شد. سپس میکروتیوپ و محلول زیری دور ریخته شد و میکروتیوپ جدید جایگزین شد.
۸. مجدد حجم 500μL از محلول PW2 به میکروتیوپ افزوده شد و سانتریفیوژ 13000 rpm به مدت ۱ دقیقه در دمای 4^{0c} انجام شد. سپس میکروتیوپ و محلول زیری دور ریخته شد و میکروتیوپ جدید جایگزین شد.
۹. جهت تخلیه کامل بافر شستشو مجدد سانتریفیوژ 13000 rpm به مدت ۱ دقیقه در دمای 4^{0c} انجام شد. سپس میکروتیوپ و محلول زیری دور ریخته شد و میکروتیوپ جدید که حامل محلول پایانی بود، جایگزین شد.
۱۰. حجم 200μL از محلول PE را به میکروتیوپ افزود شد و به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد.
۱۱. سانتریفیوژ 13000 rpm به مدت ۱ دقیقه در دمای 4^{0c} انجام شد. ستون جداسازی دور انداخته شد.
۱۲. نمونه ها تا انجام مراحل بعدی در دمای 20^{0c}- نگه داری شدند.



شکل ۳-۷ تیوپ های حاوی DNA استخراج شده از بافت

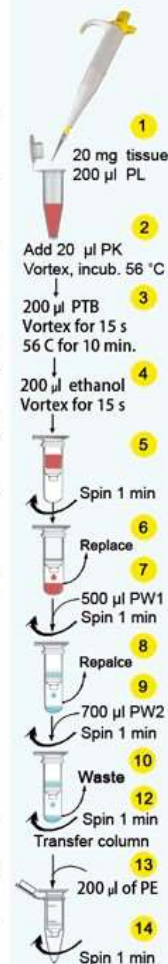


Before starting

1. Add 10 ml of absolute ethanol to the PW1 (only at the first use).
2. Add 48 ml of absolute ethanol to the PW2 (only at the first use).
3. Add Proteinase K (PK) solution to the lyophilized powder of proteinase K and store at -20°C until usage (only at the first use).
4. Check PW1, PL and PTB for salt precipitation. Redissolve any precipitation at 50°C .
5. Preheat the solution of PE to 56°C before starting the extraction process to enhance DNA extraction yield.

Tissue DNA Extraction Protocol

1. Transfer 20 mg of tissue (10 mg for liver or spleen) to a 1.5 ml tube and add $200\ \mu\text{l}$ of PL solution. Cutting the tissue into the small pieces increases the yield of genomic DNA and reduce lysis incubation time.
2. Add $20\ \mu\text{l}$ of Proteinase K and mix them well by vortexing and incubate at 56°C until complete lysis (vortex occasionally). Lysis time varies depending on the tissue type.
3. After lysis of tissue, add $200\ \mu\text{l}$ of PTB solution and vortex for 15 seconds and incubate at 56°C for 10 minutes.
4. Add $200\ \mu\text{l}$ of absolute ethanol and mix by puls-vortexing (15 s).
5. Carefully transfer lysate to the spin column. A quick spin before lysate transfer would be preferred if there was any debris in the mixture. Spin column for 1 min at 13,000 rpm.
6. Replace the collection tube with a new one.
7. Add $500\ \mu\text{l}$ of PW1 into the column and spin for 1 min at 13,000 rpm.
8. Replace the collection tube with a new one.
9. Add $700\ \mu\text{l}$ of PW2 into the column and spin for 1 min at 13,000 rpm.
10. Pour off the flow-through of collection tube.
11. Repeat step 8 and 9 with $500\ \mu\text{l}$ of PW2 (optional)
12. Spin for 1 min at 13,000 rpm to remove the remaining of the wash buffer. Transfer the spin column to a new 1.5 ml microtube.
13. Add $200\ \mu\text{l}$ of preheated PE, wait 3 min at room temperature. If you want more concentration add less PE ($100\ \mu\text{l}$).
14. Spin for 1 min at 13,000 rpm to elute DNA from the column. Store DNA solution at -20°C .



پروتوکل جداسازی DNA از بافت

- استخراج از همه خون ها طبق پروتوکل کیت پارس طوس و طبق دستور العمل زیر انجام یافت:
۱. حجم $20\ \mu\text{L}$ از پروتئوکیناز K را و $200\ \mu\text{L}$ نمونه خون و $200\ \mu\text{L}$ محلول PB به میکروتیوب افزوده شد، توسط دستگاه ورتکس به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط میکنیم بعد به مدت ۲۰ دقیقه در دمای 56°C درجه سانتیگراد در داخل بن ماری قرار داده شد.
 ۲. حجم $200\ \mu\text{L}$ از اتانول مطلق به میکروتیوب افزوده شد و مدت ۱۰ ثانیه با دستگاه ورتکس مخلوط شد.
 ۳. با دقت کل محتویات میکروتیوب به ستون جداکننده منتقل داده شد و سانتریفیوژ $13000\ \text{rpm}$ به مدت ۱ دقیقه در دمای 4°C انجام شد. سپس میکروتیوب و محلول زیری دور ریخته شد و میکروتیوب جدید جایگزین شد.

۴. حجم $500\mu\text{L}$ از محلول PW1 به میکروتیوب افزوده شد و سانتریفیوژ 13000 rpm به مدت ۱ دقیقه در دمای 4°C انجام شد. سپس میکروتیوب و محلول زیری دور ریخته شد و میکروتیوب جدید جایگزین شد.
۵. حجم $700\mu\text{L}$ از محلول PW2 به میکروتیوب افزوده شد و سانتریفیوژ 13000 rpm به مدت ۱ دقیقه در دمای 4°C انجام شد. سپس میکروتیوب و محلول زیری دور ریخته شد و میکروتیوب جدید جایگزین شد.
۶. مجدد حجم $500\mu\text{L}$ از محلول PW2 به میکروتیوب افزوده شد و سانتریفیوژ 13000 rpm به مدت ۱ دقیقه در دمای 4°C انجام شد. سپس میکروتیوب و محلول زیری دور ریخته شد و میکروتیوب جدید جایگزین شد.
۷. جهت تخلیه کامل بافر شستشو مجدد سانتریفیوژ 13000 rpm به مدت ۱ دقیقه در دمای 4°C انجام شد. سپس میکروتیوب و محلول زیری دور ریخته شد و میکروتیوب جدید که حامل محلول پایانی بود، جایگزین شد.
۸. حجم $200\mu\text{L}$ از محلول PE را به میکروتیوب افزود شد و به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد سانتریفیوژ 13000 rpm به مدت ۱ دقیقه در دمای 4°C انجام شد. ستون جداسازی دور انداخته شد.
- نمونه ها تا انجام مراحل بعدی در دمای 20°C - نگه داری شدند.

جدول ۳-۴ ترکیبات مورد استفاده در واکنش PCR

Substance	stock concentration	Final Concentration	Volume in 1 reaction
SYBR Green Mastermix	2x	1x	10 μ L
Rox dye	10x	1x	0.4 μ L
Distilled water	-	-	6.6 μ L
Primer	10x	1x	2 μ L
cDNA	-	-	1 μ L
Total volume	-	-	20 μ L

جدول ۳-۵ برنامه ی زمانی مورد استفاده در واکنش PCR

95 ^{0c}	5 minutes	1 cycle
95 ^{0c}	30 second	40 cycle
58 ^{0c} , 61 ^{0c} , 52 ^{0c} 55 ^{0c} ,	30 second	40 cycle
72 ^{0c}	30 second	40 cycle
72 ^{0c}	5 minutes	1 cycle

۱-۶-۱-۳ باندهای مربوط به هر پرایمر :

محصول PCR بر روی ژل ۲٪ Run شد تا بر اساس کیفیت باند حاصله، دمای مناسب برای انجام واکنش های بعدی تعیین شود.

الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز

الکتروفورز به حرکت مولکول‌های دارای بار الکتریکی تحت تأثیر میدان الکتریکی و در یک ماتریکس ژلی گفته می‌شود و در واقع روشی است که برای جداسازی مولکول‌های موجود در یک مخلوط از اختلاف بار الکتریکی استفاده می‌شود.

مولکول‌های DNA دارای بار منفی هستند و هنگامی که در میدان الکتریکی قرار می‌گیرند به سوی قطب مثبت حرکت می‌کنند. هنگامی که الکتروفورز در ژل انجام می‌شود، اندازه مولکول DNA یک عامل مؤثر در جداسازی خواهد بود. مولکول‌ها با اندازه متفاوت به علت سرعت‌های متفاوتی که در حرکت از میان شبکه منافذ موجود در ژل دارند از هم جدا می‌شوند. ژل معمولاً از آگارز یا پلی-آکریل‌آمید تشکیل می‌شود. مهم‌ترین عاملی که بر حرکت مولکول‌های DNA درون ژل تأثیر می‌گذارد غلظت ژل می‌باشد. هر چه غلظت ژل بیشتر باشد حرکت DNA کندتر می‌شود زیرا غلظت ژل با قطر منافذ رابطه عکس دارد. بنابراین هر چه درصد ژل افزایش یابد قطر منافذ کاهش می‌یابد. در ولتاژهای پایین سرعت مهاجرت DNA خطی با ولتاژ مورد استفاده مناسب است.

۲-۳ روش بررسی فراوانی ژن‌ها:

واکنش زنجیره ای پلیمرز در زمان واقعی^۱

۱-۲-۳ Real Time PCR

ریل تایم مشاهده لحظه به لحظه ی فرآیند PCR می باشد. Real Time PCR که آن را به عنوان PCR کمی و یا واکنش زنجیره ای پلی مرز کینتیک نیز می شناسند؛ دارای کاربردهای گسترده ای در آزمایش های پزشکی و تحقیقاتی برای تشخیص و اندازه گیری کمیت توالی های اختصاصی DNA و RNA می باشد و از آن به عنوان یک روش استاندارد طلایی^۲ برای آنالیز بیان ژن ها یاد می شود. اختصاصیت، حساسیت و تکرار پذیری از مهمترین مزایای این روش است. در این روش از رنگ ها و پروب های الیگونوکلوئوتیدی فلورسانس استفاده می شود. میزان فلورسانس؛ نشانگر محصول و تکثیر DNA است بنابراین پرتو فلورسانس؛ در طی واکنش متناسب با میزان محصولات هر چرخه آزاد می شود و میزان فلورسانس آن توسط یک دستگاه آشکارساز شناسایی و ثبت می گردد.. به این معنی که در زمان واقعی تولید محصول توسط دستگاه آشکارساز؛ گزارش داده می شود. در حالی که در روش های PCR کمی معمولی؛ تولید محصول فقط در پایان کار تشخیص داده می شود. اساس این روش؛

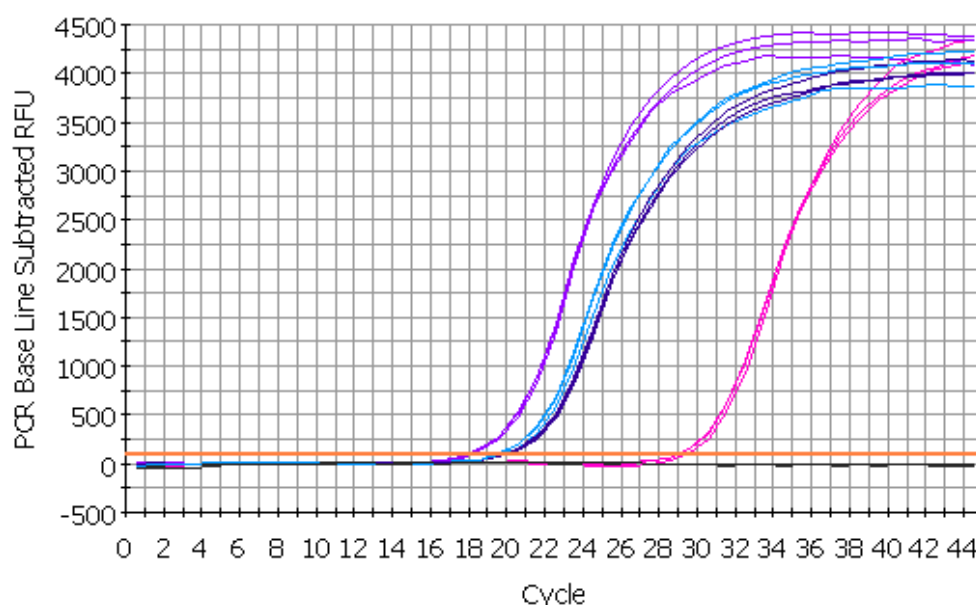
^۱ Real-time PCR

^۲ Gold standard method

ارتباط کمی بین مقدار مواد هدف موجود قبل از PCR و مقدار محصول تولید شده در طی فرایند PCR است.

نحوه تکثیر Real-time PCR را می توان به ۴ فاز عمده تقسیم نمود:

- ۱- فاز خط زمینه
- ۲- فاز نمایی ابتدایی
- ۳- فاز نمایی - خطی (یا فاز نمایی)
۴. فاز ثابت؛



منحنی تکثیر در واکنش Real-time PCR متشکل از ۴ فاز عمده

طی فاز خط زمینه (معمولا ۱۰ تا ۱۵ سیکل ابتدایی) تکثیر صورت می گیرد ولی انتشار نور فلورسانس در این مرحله نمی تواند از مقدار پایه فراتر رود. در فاز نمایی آغازین، مقدار فلورسانس به بالاتر از میزان فلورسانس پایه می رسد. چرخه ای که میزان فلورسانس از خط آستانه فراتر می رود اصطلاحاً سیکل آستانه (Ct) و یا نقطه تقاطع (Cp) نامیده می شود.

طی فاز نمایی - خطی، PCR در شرایط بهینه می باشد به طوری که محصولات PCR (و متعاقباً فلورسانس حاصل) در هر چرخه دو برابر می شوند. در مرحله چهارم یا فاز ثابت، به دلیل اتمام برخی از اجزای واکنش PCR، تکثیر بصورت نمایی نیست و در نتیجه میزان فلورسانس حاصل در این فاز نیز نمی تواند برای ارزیابی های کمی مفید قرار گیرد.

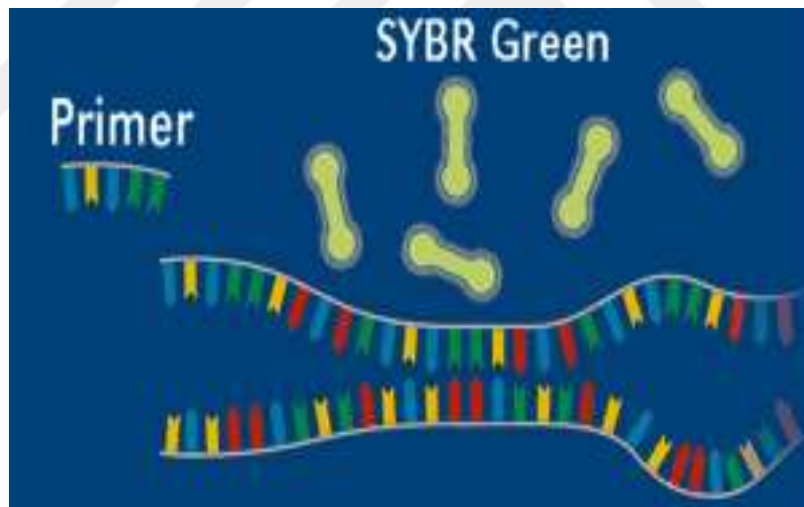
- ۱ Linear ground phase
- ۲ Early exponential phase
- ۳ Log linear phase
- ۴ Platu phase
- ۵ Cycle Threshold
- ۶ Cross Point

رنگهای فلورسانس مورد استفاده در Real-time PCR

سایبرگرین

یک رنگ اینترکالاته^۱ او فلورسانس است که به شیار کوچک^۲ DNA دو رشته‌ای متصل می‌شود. این رنگ در ۴۹۸ نانومتر^۳ برانگیخته می‌شود و نوری با طول موج^۴ ۵۲۲ نانومتر ساطع می‌کند که توسط دستگاه Real-time thermocycler ثبت می‌شود. (شکل ۳-۵ و ۳-۶ و ۳-۷)

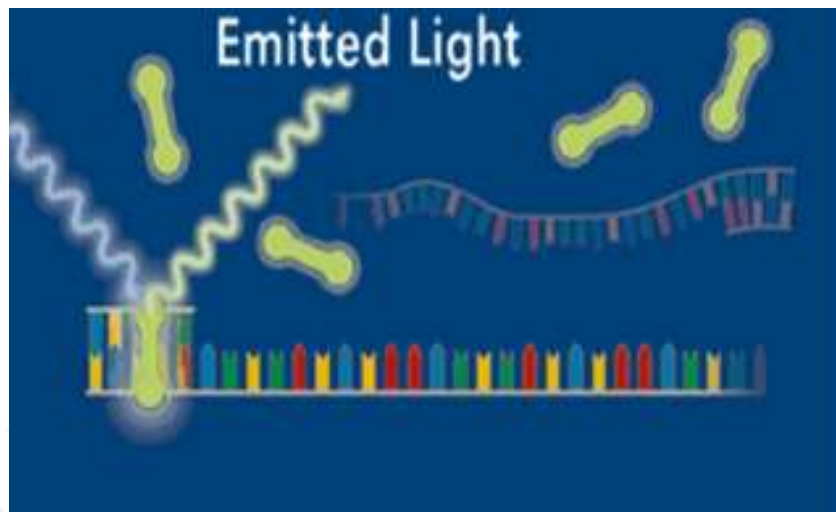
این رنگ به DNA تک رشته‌ای متصل نمی‌شود و همچنین نور فلورسانس زمینه‌ی ضعیفی دارد که آن را برای این روش بسیار مناسب می‌نماید. علاوه بر آن سایبرگرین به توالی خاصی تمایل ندارد، کار کردن با آن راحت است، از نظر دمایی پایدار است و تأثیر منفی بر آنزیم DNA polymerase ندارد. توانایی اتصال سایبرگرین به هر نوع DNA دورشته‌ای، از مهمترین معایب آن می‌باشد زیرا به پرایمر دایمرها و همچنین محصولات غیر اختصاصی نیز وصل می‌شود. اتصال به پرایمر-دایمر را می‌توان با آنالیز منحنی ذوبه مشخص نمود و اتصال به قطعه‌ی غیر اختصاصی را نیز می‌توان با افزایش دمایی اتصال پرایمر برطرف نمود زیرا معمولاً قطعات غیر اختصاصی دمایی^۵ (Tm) کمتری نسبت به قطعه هدف دارند. با این وجود، هزینه‌های کمتر آن در مقایسه با پروب‌ها دارند.



سازو کار گزارشگر فلئورسانس

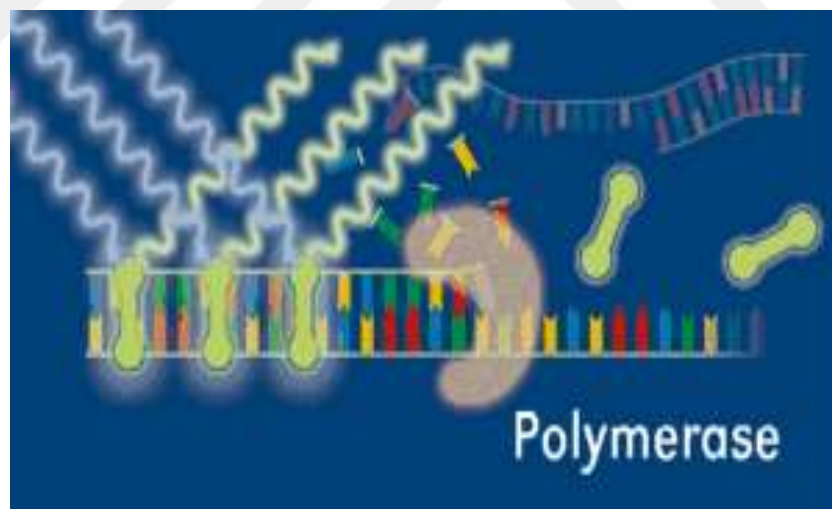
-
- ۱ Intercholate
 - ۲ Minor groove
 - ۳ Nanometer
 - ۴ Wavelength
 - ۵ Melt curve
 - ۶ Temperature melting

در ابتدا DNA دو رشته ای از هم باز میشود رنگ سایبرگرین نور فلئورسانس زمینه ای ضعیف منتشر میکند.



سازو کار گزارشگر فلئورسانس Sybergreen

بعد از اتصال پرایمر ۲ تعدادی از مولکول های سایبرگرین به DNA دو رشته متصل می شود



سازو کار گزارشگر فلئورسانس Sybergreen

- ۱ Denaturing
- ۲ Annealing

طی فرآیند سنتز رشته مکمل^۱ در واکنش Real-time PCR افزایش انتشار نور فلورسانس مشاهده می شود

پروپ های فلورسانس:

پروپ ها برخلاف سایبرگرین، مختص قطعه ی مورد نظر می باشند و اغلب دارای یک رنگ گزارشگر^۲ فلورسانس زا و یک رنگ خاموش کننده^۳ می باشند. در صورتی که این پرایمرها به قطعه نچسبند، رنگ فلورسانس ایجاد شده توسط رنگ خاموش کننده جذب می شود و در نتیجه سیگنالی قابل تشخیص نمی باشد. درحالی که اگر قطعه ای تکثیر شود، بدلیل اینکه رنگ فلورسانس از خاموش کننده دور می باشد، نور فلورسانس توسط دستگاه جذب می شود. به دلیل تکثیر اختصاصی، این پروپ ها به بهینه سازی چندین ژن را با هم تشخیص داد به شرطی که هر نمونه، رنگ فلورسانس مجزایی داشته باشد. با این وجود هزینه ی آنها بسیار بیشتر از سایبرگرین می باشد و همچنین طراحی برخی از انواع پروپ ها مشکل می باشد.

پروپ Taq Man

نخستین پروپ های طراحی شده برای Real-time PCR هستند. این پروپ، اولیگونوکلوئوتید استاندارد است که در سر^{۵'} خود به یک رنگ گزارشگر فلورسانس مانند FAM متصل است و در سر^{۳'} به یک خاموش کننده مانند TAMRA متصل می شود. (شکل ۳-۸)

هنگامی که این دو رنگ در مخلوط واکنش و یا متصل به DNA هستند بخاطر فعالیت خاموش کننده، هیچ سیگنالی توسط دستگاه خوانده نمی شود. (شکل ۳-۹) با انجام واکنش، سر^{۵'} پروپ توسط آنزیم polymerase جدا می شوند. با برداشته شدن اثر خاموش کننده، سیگنال پروپ گزارشگر توسط دستگاه خوانده شده و نمایانگر انجام واکنش است.

در طی هر واکنش PCR، پروپ به توالی مکملش بین ناحیه ی اتصال پرایمر رفت و برگشتی می چسبد.

۱ Extention

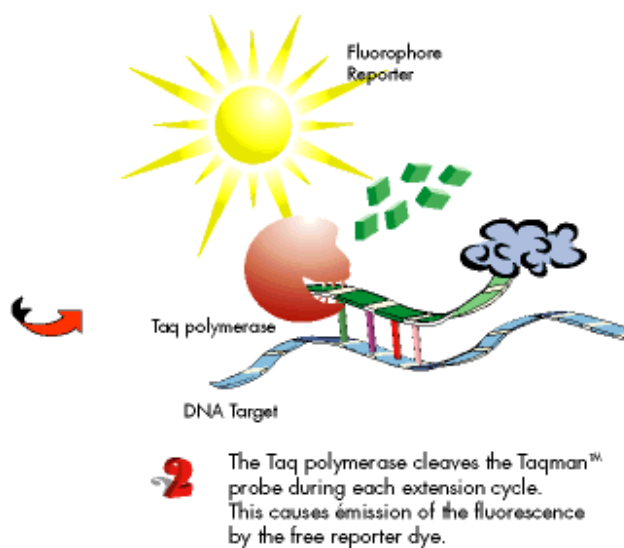
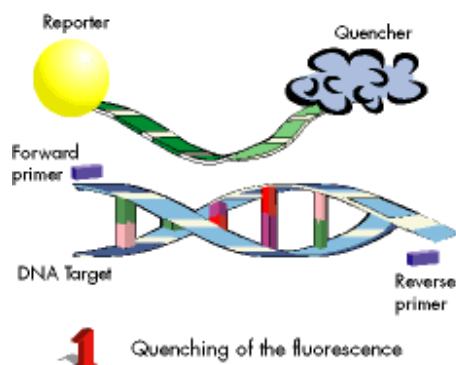
۲ Reporter dye

۳ Quencher

۴ 6-carboxy fluorescein

۵ 6-carboxy-tetra-methyl-rhodamine

Taqman™ probe



عملکرد پروب Taq Man

روش های کمی سنجی

روش مطلق^۱ یا منحنی استاندارد: در اینجا از نمونه های RNA یا DNA با غلظت مشخص استفاده می شود و سپس منحنی استاندارد آن کشیده می شود تا تعداد نسخه های mRNA تعیین شود و سپس نمونه ی RNA یا DNA توسط دستگاه اسپکتروفتومتری^۲ و جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر مشخص شده و تعداد کپی های آن به دست می آید.

روش نسبی^۳ یا سیکل آستانه : در این روش از یک ژن مرجع استفاده می شود که بیان آن در دو حالت شاهد^۴ و نمونه تقریباً ثابت می باشد. اختلاف Ct بین بیان ژن هدف^۶ و ژن مرجع^۷ در دو حالت نمونه و شاهد، $\Delta\Delta Ct$ نامیده می شود. با فرض بازدهی ۱۰۰٪ تکثیر پرایمرها، می توان با فرمول ساده ی $(2^{-\Delta\Delta Ct})$ افزایش نسبی میزان بیان ژن را بدست آورد.

-
- ۱ Absolute quantification
 - ۲ Spectrophotometry
 - ۳ Comparative quantification
 - ۴ Normal
 - ۵ Sample
 - ۶ Target gene
 - ۷ Reference gene

نرمال سازی^۱ و انتخاب ژن مرجع

به منظور نرمال سازی نیاز به مقایسه ی اختلاف بیان ژن با ژن مرجع می باشد. ژن مرجعی مناسب می باشد که معمولا تحت شرایط مختلف بیان ثابتی داشته باشد و تحت تأثیر ژن مورد نظر نیز نباشد. برخی از این ژن ها عبارتند از :

GAPDH: یک ژن مسیر گلیکولیزی می باشد که به میزان فراوانی در آزمایشات **Real-time PCR** مورد استفاده می باشد با این وجود در برخی شرایط بیان آن می تواند تغییر نماید.
 β -Actin: از ژن های مهم در اسکلت سلولی می باشد. با وجود مشاهده برخی از تغییرات، می توان از آن به عنوان یکی از بهترین ژن های مرجع یاد نمود.

۱-۲-۳ انجام Real Time PCR

واکنش در دستگاه **Light Cycler** (شکل ۳-۱۱) مطابق با جداول زیر در دمای اتصال 60°C انجام شد.

جدول ۳-۷ برنامه ی دمایی مورد استفاده در واکنش **Real-time PCR**

95°C	10 minutes	1 cycle
95°C	15 second	40 cycles
60°C	20 second	40 cycles
72°C	30 second	40 cycles

^۱ Normalization

جدول ۳-۸ ترکیبات مورد استفاده در واکنش Real-time PCR

Substance	First concentratic	Concentration in 1 reaction	Volume in 1 reaction
SYBR Green Mastermix	2x	1x	10 μ L
Distiled water	-	-	μ L ν
Primer mix	10x	1x	2 μ L
cDNA	-	-	1 μ L
Total volume	-	-	20 μ L

۱-۲-۳ واکنش Real Time PCR برای تمام نمونه ها با پرایمرها
 واکنش Real-time PCR با هر ۳ پرایمر در دستگاه Light Cycler انجام شد.

جدول ۳-۹ برنامه ی دمایی در واکنش Real-time PCR

95 ^{0c}	10 minutes	1 cycle
95 ^{0c}	15 second	40 cycles
60 ^{0c}	20 second	40 cycles
72 ^{0c}	30 second	40 cycles

فصل چہارم

نتائج



۱-۴ نتایج

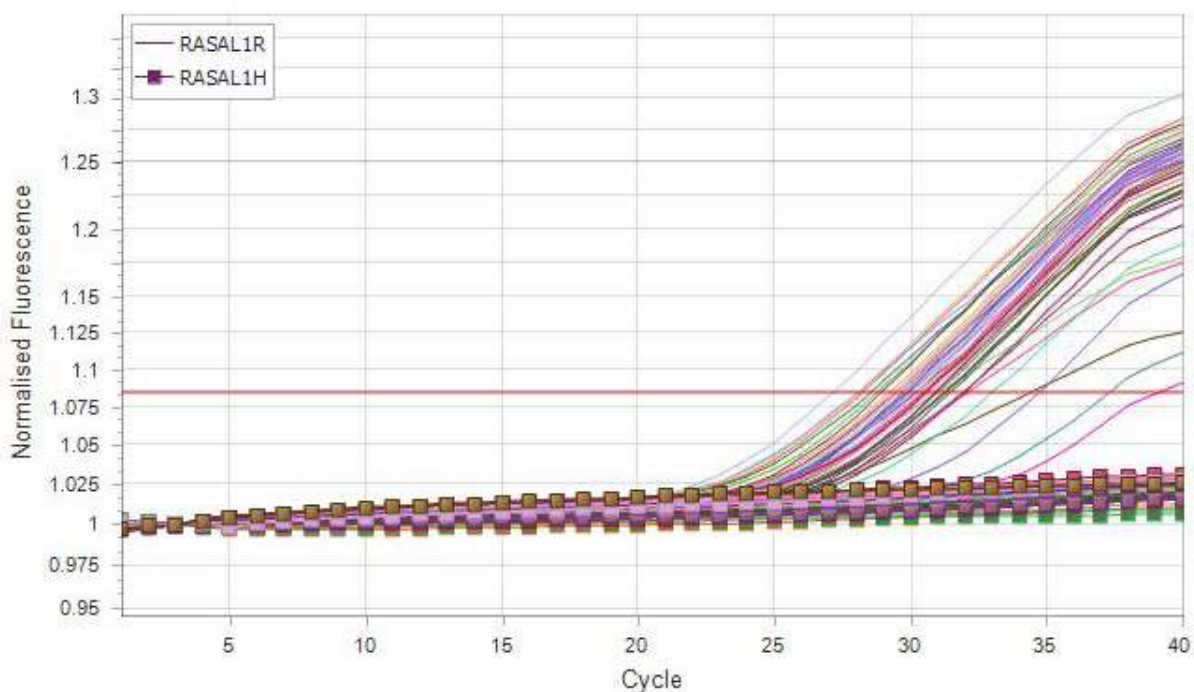
۱-۱-۴ نتیجه ی بررسی فراوانی جهش سه ژن در سه گروه با گروه کنترل

با توجه به عدم تغییرات gene fold مربوط به فراوانی جهش سه ژن $RASA_1$ و $RASA_1$ و BRAFV600E و نبود جهش در این خصوص در نمونه های انجام پذیرفته بافت های توموری بدخیم بیماران مبتلا به سرطان تخمدان بافت های نرمال بعنوان شاهد نتایج معنی دار نبود و عملاً جهشی در این مورد نداشتیم و نیز با عدم تغییرات gene fold مربوط به فراوانی جهش دو ژن $RASA_1$ و $RASA_1$ و نبود جهش در این خصوص در نمونه های انجام پذیرفته خون بیماران مبتلا به سرطان تخمدان و نمونه خون های افراد سالم بعنوان شاهد نتایج معنی دار نبود و عملاً جهشی در این مورد هم نداشتیم.

اما با اینکه در مورد ژن BRAFV600E در یافت تومورال جهشی یافت نشد ولی در خون افراد مبتلا در این گروه ۲ نفر واجد این جهش بودند (۸٪) و تغییرات gene fold، معنی دار است.

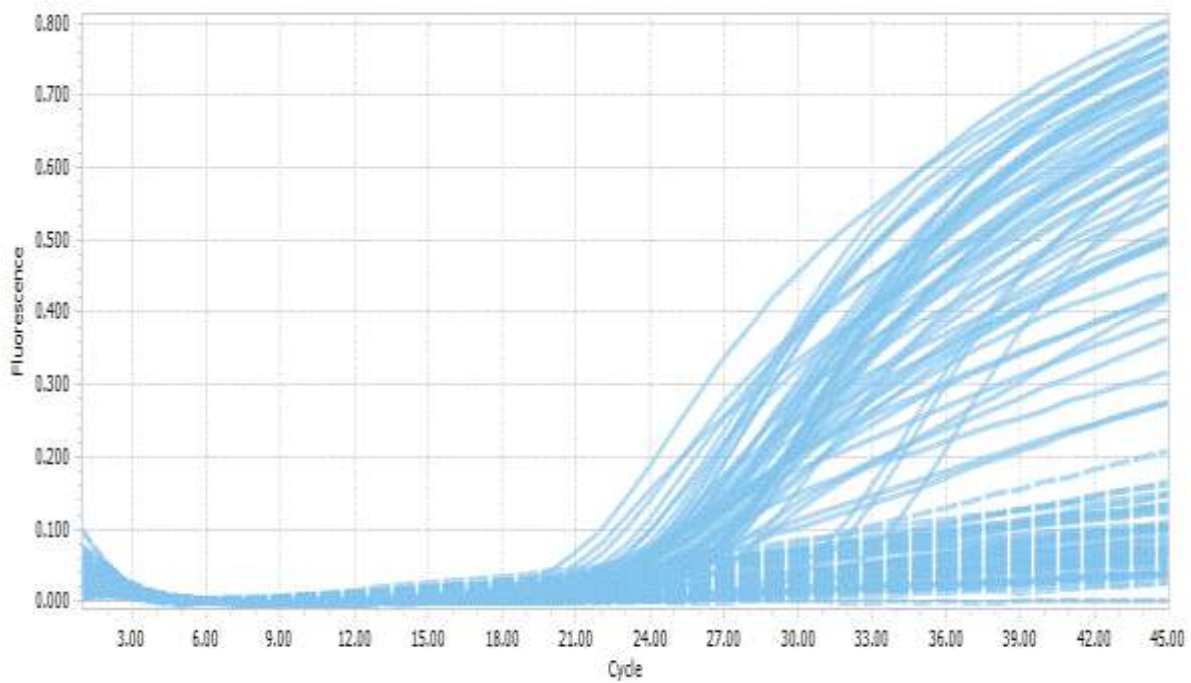
نتیجه ی بررسی فراوانی جهش ژن $RASA_1$ در سه گروه

در بررسی انجام شده تمام نمونه ها هموزیگوت و فاقد جهش (هتروزیگوت) بودند

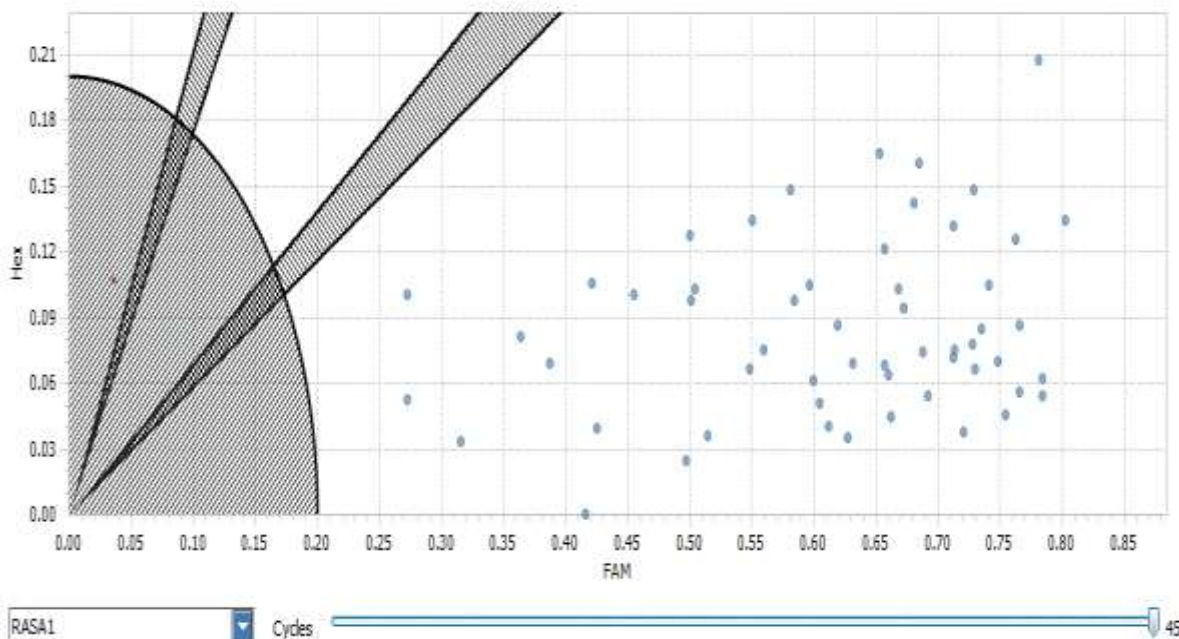


شکل ۴-۱- منحنی تکثیر در یک Run واکنش Real-time PCR

نتیجه بررسی فراوانی جهش ژن $RASA1$ در سه گروه
 در بررسی انجام شده تمام نمونه ها هموزیگوت و فاقد جهش (هتروزیگوت) بودند



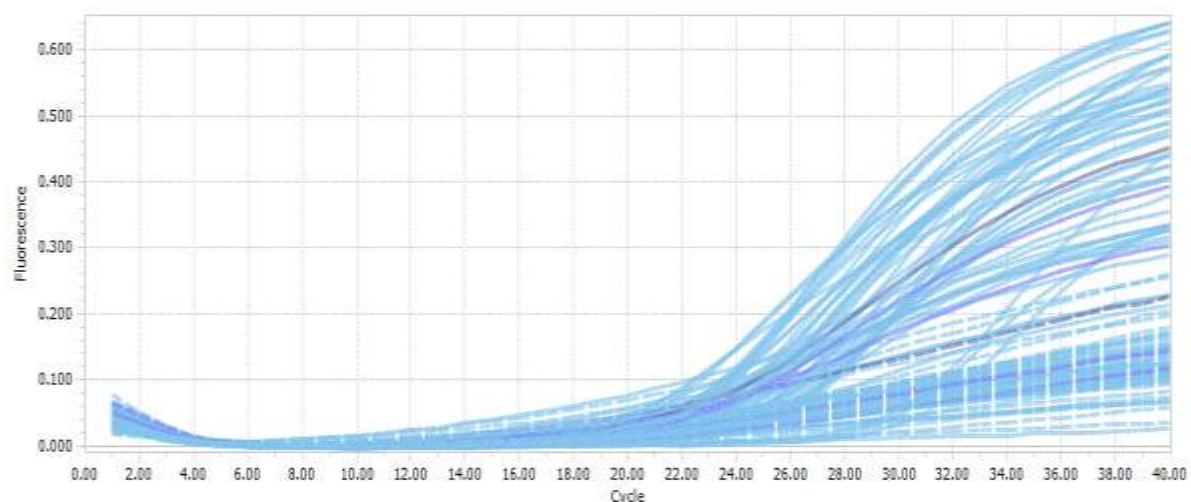
شکل ۴-۲ منحنی تکثیر در یک Run واکنش Real-time PCR



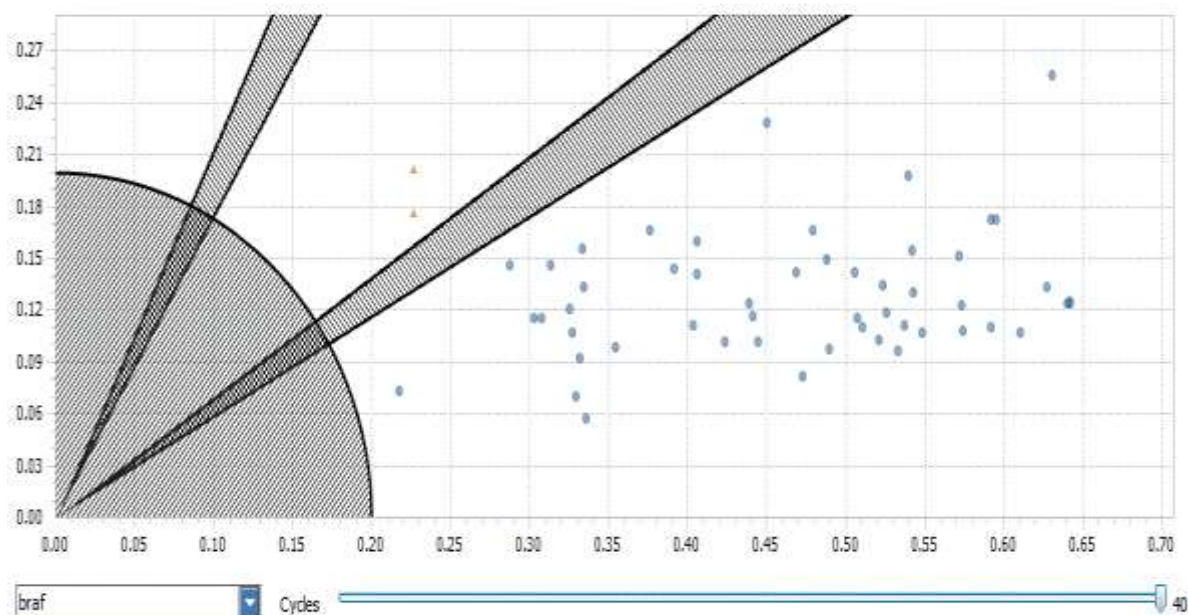
در نمودار بالا دایره های آبی رنگ نشاندهنده هموزیگوتی و عدم جهش می باشد.

نتیجه بررسی فراوانی ژن BRAFV600E در سه گروه

در بررسی انجام شده تمام نمونه های بافت تومورال و خون افراد سالم هموزیگوت و فاقد جهش (هتروزیگوت) بودند اما در بررسی نمونه خون های افراد تومورال ۲ مورد جهش (۲ مورد هتروزیگوت) یافت شد.



شکل ۴-۳ منحنی تکثیر در یک Run واکنش Real-time PCR



در نمودار بالا دایره های آبی نشاندهنده هموزیگوتی (عدم جهش) و ۲ مثلث زرد هتروزیگوت (وجود جهش)

فصل پنجم

بحث و نتیجه گیری



۱-۵ بحث و نتیجه گیری

هدف از انجام این مطالعه شناسایی کاندیدهای مناسب برای مطالعات کشف بیومارکرهای تشخیصی و پیش آگهی بود. نشانگرهای مرتبط با سرطان یا بیومارکرها در واقع عواملی هستند که در بافت توموری تولید شده وارد جریان خون و مایعات بدن می شوند و می توان آن ها را با آزمایشات مبتنی بر خون، سرم، ادرار و دیگر مایعات بدن ردیابی کرد.

این بیومارکرها قادر خواهند بود تشخیص سرطان پستان را در مراحل اولیه و قبل از گسترش به بافت ها و اندام های ثانویه تسهیل نمایند (۴۸).

در این مطالعه، ما احتمال نقش داشتن ، جهش در سه ژن RAS_{A1} و RAS_{A1} و $BRAFV600E$ را در ایجاد سرطان تخمدان در جمعیت ایرانی در تومور و خون آنها مورد بررسی قرار دادیم.

اهداف ما از آغاز این طرح شامل موارد زیر بود:

▪ تعیین فراوانی جهش ژنهای RAS_{A1} ، RAS_{A1} ، $BRAFV600E$ در سلولهای تومورال، خون محیطی و نرمال

▪ بررسی تفاوت فراوانی جهش ژنهای RAS_{A1} ، RAS_{A1} ، $BRAFV600E$ در خون افراد نرمال و مبتلا

▪ بررسی تفاوت فراوانی جهش ژنهای RAS_{A1} ، RAS_{A1} ، $BRAFV600E$ در خون و بافت تومورال افراد مبتلا

▪ هدف نهایی ما بکارگیری و استفاده از پیش آگهی این جهش ها بخصوص در مقام مقایسه ای در خون افراد مبتلا به سرطان تخمدان به عنوان بیومارکرهایی تشخیصی جهت شناسایی بیماران مبتلا به سرطان تخمدان و همچنین یک بیومارکر پیش بینی کننده ی بروز متاستاز در مبتلایانی که در مرحله ی تومور اولیه سرطان تخمدان قرار دارند با استفاده از یک آزمایش ساده خون بود.

▪ که در نهایت می توان نتیجه گیری کرد ، با توجه به عدم وجود فراوانی جهش در ژن های RAS_{A1} ، RAS_{A1} و $BRAFV600E$ علیرغم وجود این جهش ها در سایر تومورها پتانسیل معرفی شدن به عنوان اهداف تحقیقاتی در مطالعات کشف بیومارکر به منظور تشخیص زودهنگام وقوع متاستاز در بیماران مبتلا به سرطان تخمدان را دارا نمی باشند

▪ اما در مطالعه X Ding و همکاران ، فراوانی جهش RAS_{A1} بیشتر در تومورهای Myeloid cancer(5-28%) Colorectal Cancer, Gastric Cancer, lung cancer(17-33%)،

Thyroid cancer (۶۰-۲۰٪) بررسی و مشخص گردیده شده است. (۲۱و۲) اما در بررسی ما این جهش در کانسر تخمدان یافت.

■ در بررسی بعمل آمده توسط بروس و همکاران در سال ۲۰۱۲ نتیجه گرفتند که جهش RASA1 مسئول بروز بیماری لنگوای بدخیم است. (۵۵)

■ همچنین جهش در RASA1 در تومورهای (HHT) - (BCC) Skin Cancer Hereditary hemorrhagic نیز مشخص شده است. (۲۲) اما در بررسی ما این جهش در کانسر تخمدان یافت.

■ ضمناً RASA1 در آنژیوزنز و پیشرفت تومور نیز نقش احتمالی دارد در صورتیکه در مطالعه صورت گرفته با اینکه تومورهای بدخیم تخمدان مورد بررسی قرار گرفتن ولی جهشی از این ژن مبنی بر آنژیوزنز بودن یافت نشد. (۲۴)

■ اما در خصوص ژن BRAFV600E وجود جهش در نمونه خون ۲ نفر از افراد مبتلا و شیوع ۸٪ آن توصیه به تحقیق و بررسی بیشتر در این مورد بعنوان یک روش کمتر تهاجمی و زود هنگام در تشخیص مراحل ابتدایی سرطان می گردد. جهش این ژن از خانواده ژنی BRAF می باشد که وجود آن در سرطانهای ملانوما (Melanoma) و سیستم عصبی مرکزی (CNS) اثبات و مشخص گردیده است.

■ در مطالعات ایما و همکاران در سال ۲۰۱۱ جهش شایع BRAFV600E در ملانوم ، سرطان کلورکتال و تیروئید مشاهده شد که در مقایسه با مطالعه ما نیز از ۲۵ مورد تومور بدخیم تخمدان ۲ جهش در این ژن یافت گردید. (۵۱)

■ در مطالعه راشل و هکاران در سال ۲۰۱۲ جهش های V600E BRAF در ۳۵٪ بیماران مبتلا به سرطان تخمدان SB / LGS وجود داشت. این جهش BRAF V600E در سرطان تخمدان SB / LGS همراه با بیماری زودرس و پیش آگهی بهبود یافته بود. که این مورد همخوانی و هماهنگی با یافته های تحقیقات ما نیز دارد. (۵۲)

■ اهمیت این یافته ها این است که جهش های BRAF و MEK1 / 2 شایع تر از حد انتظار در سرطان تخمدان است که می تواند پیامدهای مهمی را برای درمان بیماران مبتلا به این بیماری داشته باشد و راه های بالقوه جدید درمان را نشان می دهد.

▪ بررسی مهی و همکاران در سال ۲۰۱۶، در کارسینومای سرطان تخمدان با درجه پیشرفت پایین فراوانی جهش های فعال در خانواده ژنی KRAS و BRAF وجود دارد که در خصوص وجود ۲ جهش در ژن BRAF با تحقیقات صورت گرفته ما تطابق دارد.

▪ براساس بررسی های انجام شده توسط دولتخواه و هکاران در ایران در سال ۱۳۹۴ تمامی ۳۰ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال از نظر وجود موتاسیون ژن BRAF در آگزون شماره ۱۵ مورد بررسی با روش اختصاصی تعیین توالی مستقیم قرار گرفتند. هیچ موردی از جهش ژن در منطقه V600E مشاهده نگردید اما این جهش در کانسر تخمدان با مطالعه ای که ما بر روی ۲۵ نمونه تومورال تخمدان با ۲ مورد جهش داشتیم، یافت شد. (۵۹)

▪ باتوجه به شیوع این نوع سرطان، اهمیت تشخیص اولیه آن و پیگیری درمان متمرکز شده و مشخص شدن فراوانی و شیوع جهش این ژن در خون این افراد در این تحقیق نتایج حاصله می تواند کمک شایانی در جهت تشخیص زود هنگام، انتخاب درمانهای و دستورالعمل درمان مبتنی بر شرایط هر فرد (individualized treatment) را در زمینه کانسر تخمدان ارائه داد.

۲-۵-پیشنهادهات

نتایج به دست آمده از این مطالعه مقدماتی نشان می دهد که به منظور تایید ارزش تشخیصی و پروگنوستیک جهش در این سه نوع ژن بخصوص ژن BRAFV600E (که بسیار برای بحث پایش درمان هدفمند مورد اقبال خوبی در تحقیقات اخیر قرار گرفته است) و استفاده از آنها به عنوان بیومارکر برای تشخیص زودهنگام، پیش آگهی و پیش بینی گزینه درمانی مناسب برای سرطان تخمدان، نیاز است تا طبقه بندی جامع و کاملی برای این سرطان انجام شود. نتایج بدست آمده از مطالعه ما پیشنهاد کننده تفاوت بین بیان سطح و وجود جهش در این سه ژن را در جمعیت ایرانی در مقام مقایسه با سایر نژاد در بروز این نوع سرطان بیان می کند. ضمناً در به منظور استفاده از این ملکولها از قبل باید نوع تومور تخمدان مشخص شده باشد. همانطور که در پیشینه تحقیق ذکر شد نوع ژن های درگیر خود مارکرهای ارزشمندی برای تعیین نوع زیرگروه تومورهای تخمدان می باشند. اثبات این مدعا نیازمند انجام بررسی در تعداد مناسبی از هریک از زیرگروه های تومور تخمدان می باشد.

منابع



- .^۱ Cardoso F, Harbeck N, Fallowfield L, Kyriakides S, Senkus E, Group EGW. Locally recurrent or metastatic breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology*. 2012;23(suppl 7):vii11-vii9.
- .^۲ van Schooneveld E, Wildiers H, Vergote I, Vermeulen PB, Dirix LY, Van Laere SJ. Dysregulation of microRNAs in breast cancer and their potential role as prognostic and predictive biomarkers in patient management. *Breast Cancer Research*. 2015;17(1):1.
- .^۳ Prolla CMD, Silva PSd, Netto CBO, Goldim JR, Ashton-Prolla P. Knowledge about breast cancer and hereditary breast cancer among nurses in a public hospital. *Revista latino-americana de enfermagem*. 2015;23(1):90-7.
- .^۴ Graveel CR, Calderone HM, Westerhuis JJ, Winn ME, Sempere LF. Critical analysis of the potential for microRNA biomarkers in breast cancer management. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2015;7:59-79.
- .^۵ - Kroeger Jr, P. T. and R. Drapkin (2017). "Pathogenesis and heterogeneity of ovarian cancer." *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 29(1): 26-34.
- .^۶ Ohta, M., et al. (2009). "Decreased expression of the RAS-GTPase activating protein RASAL1 is associated with colorectal tumor progression." *Gastroenterology* 136(1): 206-216
- .^۷ DOUBENI, C. A., et al. (2016). "Diagnosis and Management of Ovarian Cancer." *American family physician* 93(11).
- .^۸ Huang, E. C., et al. (2017). *Pathology and Molecular Pathology of Uterine and Ovarian Cancers. Pathology and Epidemiology of Cancer, Springer: 247-278.*
- .^۹ - Gershenson, D. M. (2017). *Serous Tumors of Low Malignant Potential and Low-Grade Serous Carcinomas of the Ovary or Peritoneum. Ovarian Cancers, Springer: 183-200.*
- .^{۱۰} Naghavi M. Death report from 10 provinces in Iran. Tehran Ministry of Health. 2000.
- .^{۱۱} Shamsa A, Mohagheghi M. Final report of the National project for cancer registry. Islamic Republic of Iran, cancer Institute, Tehran. 2002.
- .^{۱۲} Taghavi A, Fazeli Z, Vahedi M, Baghestani AR, Pourhoseingholi A, Barzegar F, et al. Increased trend of breast cancer mortality in Iran. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2012;13(۱۱):۲۶۷۰-۲۶۷۴(۱)
- .^{۱۳} Pujade-Lauraine, E., et al. (2017). *Clinical Research in France, Europe, and in the World Dedicated to Ovarian Cancers. Ovarian Cancers, Springer: 3-12.*
- .^{۱۴} Haghghat S, Akbari M, Ghaffari S, Yavari P. Standardized breast cancer mortality rate compared to the general female population of Iran. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2012;13(11):5525-8.
- .^{۱۵} Harirchi I, Karbakhsh M, Kashefi A, Momtahn AJ. Breast cancer in Iran: results of a multi-center study. *Asian pacific journal of cancer prevention*. 2004;5(1):24-7.
- .^{۱۶} Rezaghali T, Yavari P, Abolhasani F, Etemad K, Khosravi A, Hashemi Nazari S, et al. Estimating the burden of breast cancer in Iranian women in 2009. *Iranian Journal of Epidemiology*. 2015;10(4):32-40.
- .^{۱۷} Maxwell, K. N., et al. (2016). Evaluation of ACMG guideline classified variants in 180 cancer and incidental non-cancer genes in families with breast/ovarian cancer, *AACR*.
- .^{۱۸} Antoniou A, Pharoah P, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper J, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *The American Journal of Human Genetics*. 2003;72(5):1117-30.
- .^{۱۹} Petrucelli N, Daly MB, Feldman GL. Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in BRCA1 and BRCA2. *Genetics in Medicine*. 2010;12(5):245-59.

- .۲۰ Stover, E. H., et al. (2016). Somatic mutations and copy number variations in cancer-associated genes in 695 ovarian cancer patients, AACR.
- .۲۱ Dvorak, K., et al. (2013). "Evaluation of BRAF (V600E) mutation by immunohistochemically staining with anti-BRAF V600E (VE1) antibody: A comparison with Sanger sequencing." *Cancer Research* 73(8 Supplement): 42-42.
- .۲۲ Lengyel, E. (2010). "Ovarian cancer development and metastasis." *The American journal of pathology* 177(3): 1053-1064.
- .۲۳ - Yin, J. G., et al. (2016). "Gene expression profiling analysis of ovarian cancer." *Oncology Letters* 12(1): 405-412.
- .۲۴ Freyer, G. (2016). *Ovarian Cancer in Elderly Patients*, Springer
- .۲۵ - Liu, D., et al. (2013). "Identification of RASAL1 as a major tumor suppressor gene in thyroid cancer." *Journal of the National Cancer Institute*: djt249..
- .۲۶ Malek, A. and O. Tchernitsa (2013). *Ovarian Cancer*, Springer..
- .۲۷ Welch, P. (2009). *The role of genetics in breast and reproductive cancers*, Springer
- .۲۸ Scanlon VC, Sanders T. *Essentials of anatomy and physiology*: FA Davis; 2014.
- .۲۹ Loda, M., et al. (2016). "Pathology and Epidemiology of Cancer."
- .۳۰ Malhotra GK ,Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer biology & therapy*. 2010;10(10):955-60.
- .۳۱ Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(11):3155-63.
- .۳۲ Burstein HJ, Polyak K, Wong JS, Lester SC, Kaelin CM. Ductal carcinoma in situ of the breast. *New England Journal of Medicine*. 2004;350(14):1430-41.
- .۳۳ Gubbels, J. A., et al. (2010). "The detection, treatment, and biology of epithelial ovarian cancer." *Journal of ovarian research* 3(1): 1.
- .۳۴ Cantwell-Dorris, E. R., et al. (2011). "BRAFV600E: implications for carcinogenesis and molecular therapy." *Molecular cancer therapeutics* 10(3): 385-394.
- .۳۵ Pujade-Lauraine, E., et al. (2016). *Ovarian Cancers: Advances through International Research Cooperation (GINECO, ENGOT, GCIG)*, Springer.
- .۳۶ Nodin B, Zendehtrokh N, Sundstrom M, Jirstrom K. (2013). Clinicopathological correlates and prognostic significance of KRAS mutation status in a pooled prospective cohort of epithelial ovarian cancer. *Diagnostic Pathology* 8(106):1596-8.
- .۳۷ Smith RA, Cokkinides V, von Eschenbach AC, Levin B, Cohen C, Runowicz CD, et al. American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2002;52(1):8-22.
- .۳۸ Cicenas, J., et al. (2017). "KRAS, NRAS and BRAF mutations in colorectal cancer and melanoma." *Medical Oncology* 34(2): 26.
- .۳۹ Seto, M., et al. (2011). "Reduced expression of RAS protein activator like-1 in gastric cancer." *International journal of cancer* 128(6): 1293-1302..
- .۴۰ Patrick, C., et al. (2016). "Novel ACLV1 Mutation Identified in Late Onset Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia." *International Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery* 5(04): 157.
- .۴۱ Willis, M. S. and T. Sander (2016). *The Genetic Basis and Molecular Diagnosis of Vascular Tumors and Developmental Malformations*. *Vascular Tumors and Developmental Malformations*, Springer: 101-129.
- .۴۲ CHEN, Y.-L., et al. (2017). "Down-regulation of RASA1 Is Associated with Poor Prognosis in Human Hepatocellular Carcinoma." *Anticancer Research* 37(2): 781-785.
- .۴۳ Dhomen N, Marais R. New insight into BRAF mutations in cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2007 Feb;17(1):31-9. Review.
- .۴۴ Ding, X., et al. (2017). "Clinicopathologic characteristics and outcomes of Chinese patients with non-small-cell lung cancer and BRAF mutation." *Cancer Medicine*.

- .εο Leber MF, Efferth T. Molecular principles of cancer invasion and metastasis (review). *International journal of oncology*. 2009;34(4):881.
- .εϛ Badalian-Very G, Vergilio JA, Degar BA, MacConaill LE, Brandner B, Calicchio ML, Kuo FC, Ligon AH, Stevenson KE, Kehoe SM, Garraway LA, Hahn WC, Meyerson M, Fleming MD, Rollins BJ. Recurrent BRAF mutations in Langerhans cell histiocytosis. *Blood*. 2010 Sep 16;116(11):1919-
- .εϜ Boon LM, Mulliken JB, Viskula M. RASA1: variable phenotype with capillary and arteriovenous malformations. *Curr Opin Genet Dev*. 2005 Jun;15(3):265-9. Review.
- .ε⊕ Joyce DP, Kerin MJ, Dwyer RM. Exosome-encapsulated microRNAs as circulating biomarkers for breast cancer. *International journal of cancer*. 2016.
- .ε⊖ Jin, H., Wang, X., Ying, J., Wong, A. H. Y., Cui, Y., Srivastava, G., Shen, Z.-Y., Li, E.-M., Zhang, Q., Jin, J., Kupzig, S., Chan, A. T. C., Cullen, P. J., Tao, Q. Epigenetic silencing of a Ca(2+)-regulated Ras GTPase-activating protein RASAL defines a new mechanism of Ras activation in human cancers. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 104: 12353-12358, 2007.
- .οο Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 65, 5–29 (2015)
- οϛ Emma R. Cantwell-Dorris, John J. O’Leary, and Orla M. Sheils. BRAFV600E: Implications for Carcinogenesis and Molecular Therapy. *Mol Cancer Ther*; 10(3); 94–99. 2011 AACR.
- οϜ Rachel N. Grisham, Gopa Iyer, Karuna Garg, Deborah DeLair, David M. Hyman, Qin Zhou, Alexia Iasonos, Michael F. Berger, Fanny Dao, David R. Spriggs, Douglas A. Levine, Carol Aghajanian, and David B. Solit. BRAF Mutation Is Associated With Early Stage Disease and Improved Outcome in Patients with Low-Grade Serous Ovarian. *Cancer* 2013; 119:548-54. VC 2012 American Cancer Society.
- οϝ Sadlecki P , Walentowicz P , Bodnar M , Marszalek A , Grabiec M , Walentowicz-Sadlecka M. Determination of BRAF V600E (VE1) protein expression and BRAF gene mutation status in codon 600 in borderline and low-grade ovarian cancers. *Tumour Biol*. 2017 May;39(5)
- ο⊘ Anne L. Estep, Chana Palmer, Frank McCormick, Katherine A. Rauen. Mutation Analysis of BRAF, MEK1 and MEK2 in 15 Ovarian Cancer Cell Lines: Implications for Therapy. *PLoS ONE* 2(12): e1279. Doi:10.1371/journal.pone.0001279
- οο Patricia E. Burrows, Manuel L. Gonzalez-Garay, John C. Rasmussen,.... Lymphatic abnormalities are associated with *RASA1* gene mutations in mouse and man. 8621–8626, doi: 10.1073/pnas.1222722110. May 21, 2013
- οϛ Kwong-Kwok Wong, Yvonne T.M. Tsang, Michael T. Deavers, Samuel C. Mok, Zhifei Zu, Charlotte Sun, Anais Malpica, Judith K. Wolf, Karen H. Lu, and David M. Gershenson. BRAF Mutation Is Rare in Advanced-Stage Low-Grade Ovarian Serous Carcinomas. *The American Journal of Pathology*, Vol. 177, No. 4, October 2010
- οϜ Singer G , Oldt R 3rd, Cohen Y, Wang BG, Sidransky D, Kurman RJ, Shih IeM. Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low grade ovarian serous carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2003 Mar 19;95(6):484-6.
- ο⊕ MIKI OHTA, MOTOKO SETO, HIDEAKI IJICHI, KOJI MIYABAYASHI, YOTARO KUDO, DAI MOHRI, YOSHINARI ASAOKA, MOTOHISA TADA, YASUO TANAKA, TSUNEO IKENOUE, FUMIHIKO KANAI, TAKAO KAWABE, and MASAO OMATA. Decreased Expression of the RAS-GTPase Activating Protein

RASAL1 Is Associated With Colorectal Tumor Progression. GASTROENTEROLOGY
2009;136:206–216

59 رویا دولت خواه و.... موتاسیون های شایع ژن KRAS و BRAF در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال.

گوارش / دوره 20، شماره 1/ بهار-33 / 13 94

60 Susana Banerjee and Stanley B. Kaye. New Strategies in the Treatment of Ovarian
Cancer: Current Clinical Perspectives and Future Potential. Clin Cancer

Res; 19(5); 961–8. _2013 AACR.



Abstract

Introduction: Ovarian cancer the fourth most common cancer is the most common cause of death from gynecological cancers, the epithelium of which is the sixth most common cancer in women. Although etiologic factors causing ovarian cancer are not well known, genetic precursors such as changes in the pathway of the KRAS / BRAF genes that lead to mutations in the pathway of Type I, the evolution of ovarian cancer, especially in somatic cells, are important and important. Ovarian cancer is one of the major issues in the field of surgery, which requires serious and often complex treatment. This cancer has the highest mortality rate among all female genital ulcers. In this study, the KRAS gene family of the two RASA1 and RASA11 genes, which are the protein and are the main components of the pathway of tyrosine kinase MAPK / RAS, are studied. The common spot mutations in these genes eliminate the function of GTPase and, as a result, result in the loss of the ability to inactivate the protein by themselves.

Method: In this case-control study, 25 ovarian tumors and 25 blood samples of ovarian cancer patients undergoing surgery and 50 blood samples from healthy women and 5 normal samples from ovaries as controls were studied. DNA extraction was performed for all specimens and finally, the frequency of mutations of RASA11, RASA1 and BRAFV600E genes was investigated by quantitative real-time PCR technique.

Result: After analyzing the results of the Real-time PCR technique, a relative method was applied to the tumor and blood samples of the patients with ovarian cancer. Normal tissue samples were taken as controls and blood samples from healthy women in terms of ovarian cancer, no No mutation was observed in the two RASA1 and RASA1 genes in tumor samples and their blood samples. There was no mutagenic tumor in the BRAFV600E gene, but in the blood of this group, 2 people had this mutation (8%) in the blood of healthy subjects No mutation was seen from these three genes.

Conclusion: It can be concluded that due to the lack of mutations in the RASA11, RASA1 and BRAFV600E genes, despite the presence of these mutations in other tumors, the potential to be introduced as research objectives in biomarker discovery studies to detect the early onset of metastasis in cancer patients the ovaries are not present. However, with regard to the BRAFV600E gene and the presence of mutations in the blood sample of 2 people and the incidence of 8%, it recommends further research in this regard as a less invasive and early approach to detecting early stages of cancer. Given the prevalence of this type of cancer, the importance of its primary diagnosis and follow-up of treatment, and the frequency and frequency of mutation in the blood of these individuals in this study, the results can be of great help in early diagnosis, treatment selection and treatment-based treatment Provides individualized treatment for ovarian cancer.

Keywords: Ovarian cancer, metastasis, RASA11 gene, RASA1 gene, BRAFV600E gene



Azad Islamic University of Damghan
School of Basic Science

A thesis presented for the degree of of Ms.c. in Iran

Title:

Frequency of mutations in genes BRAFV600E, RAS_{A1} and RAS_{A1}
in tumor samples and peripheral blood of patients with ovarian cancer by
Real Time PCR technic

Supervisors:
Dr. Majid Mojarrad

Advisers:
Dr. Masoodian

By:
Omid Nejati

August 2018 January

Thesis No: 337916