مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و پنجم/شماره‌ی ۴۳۲/هفته‌ی چهارم تیر ماه ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۶/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۸/۲۵

مقایسه‌ی ناپایداری DNA ژنومی در آدنوما و آدنوکارسینوما در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال به روش Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction

اردشیر طالبی[۱]، صمصام دانش بختیار[۲]، محبوبه مشکوه[۳]، مرضیه مشکوه[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: تجمع تغییرات ژنتیکی دلیل اصلی پیشرفت بدخیمی در سرطان روده‌ی بزرگ است و مشخص شده است که ناپایداری ژنومی گام لازم برای ایجاد جهش‌های متعدد و ضروری در بروز بدخیمی می‌باشد.

روش‌ها: از تکنیک Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) برای بررسی و مقایسه‌ی ناپایداری ژنومی در سرطان روده‌ی بزرگ و پیشرفت آن استفاده شد که در آن پروفایل ژنومی بافت آدنوما (پولیپ) و آدنوکارسینوما (سرطان روده‌ی بزرگ) مربوط به ۱۷ بیمار مبتلا به سرطان روده‌ی بزرگ با اپیتلیوم طبیعی روده‌ی بزرگ همان بیماران مقایسه گردید.

یافته‌ها: بر اساس تفکیک و مشاهده‌ی محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد، حضور باندی با طول تقریبی ۳۷۰ جفت باز بین بافت‌های طبیعی (مشاهده شده در ۱۱/۸ درصد نمونه‌ها)، آدنوما (مشاهده شده در ۷۶/۵ درصد نمونه‌ها) و آدنوکارسینوما (مشاهده شده در ۸۸/۲ درصد نمونه‌ها) پلی‌مورف بود. حضور باند پیش‌گفته با توموری شدن بافت طبیعی همراهی معنی‌داری داشت ($P = ۰/۰۰۰۴$ و Odd ratio = ۲۴/۳۸ یا OR برای آدنوما و $P < ۰/۰۰۰۱$ و OR = ۵۶/۲۵ برای آدنوکارسینوما). همچنین، آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که فرکانس حضور این باند بین آدنوما و آدنوکارسینوما تفاوت معنی‌داری ندارد ($P = ۰/۶۶۰۰$).

نتیجه‌گیری: بررسی بیشتر قطعه‌ی ۳۷۰ جفت بازی در سطح توالی، می‌تواند پیشنهاد مناسبی برای یافتن عملکرد این تغییر ژنتیک باشد.

واژگان کلیدی: سرطان روده‌ی بزرگ، آدنوما، آدنوکارسینوما، Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction، ناپایداری ژنومی

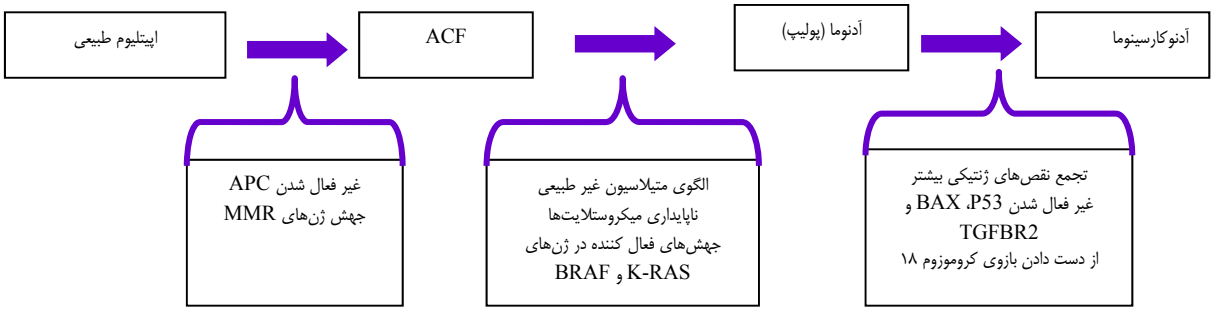
ارجاع: طالبی اردشیر، دانش بختیار صمصام، مشکوه محبوبه، مشکوه مرضیه. **مقایسه‌ی ناپایداری DNA ژنومی در آدنوما و آدنوکارسینوما در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال به روش Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۳۲): ۶۱۴-۶۰۹

مقدمه

سرطان روده‌ی بزرگ (Colorectal cancer یا CRC) در آمریکا سومین سرطان شایع مردان و زنان است که با وجود کاهش میزان بروز مرگ در اثر این سرطان به دلیل بهبود در غربالگری، تشخیص زودهنگام و معرفی روش‌های درمانی جدید هنوز هم به عنوان یکی از مشکلات سلامت در بسیاری از کشورها مطرح است (۱). طبق گزارش‌های Iranian national cancer registry report، در ایران بروز CRC طی ۲۵ سال اخیر رو به رشد بوده است (تشخیص سالانه‌ی ۵۱۰۰۰ نفر) و همچنین، با مرگ ۳۵۰۰۰ نفر در سال، این سرطان سومین عامل مرگ و میر بعد از حمله‌ی قلبی و تصادف است (۲).

CRC، یک مدل شناخته شده برای درک وقایع ژنتیکی زمینه‌ساز توسعه‌ی بدخیمی است که تجمع تغییرات ژنتیکی شامل فعال شدن پروتوآنکوژن‌ها، غیر فعال شدن ژن سرکوبگر تومور، بی‌ثباتی کروموزومی و بی‌ثباتی میکروستلایت‌ها، باعث ایجاد پیشرفت گام به گام ضایعات در مخاط کلون می‌شود (۵-۳). از دست دادن و یا غیر فعال شدن ژن سرکوبگر تومور Adenomatous polyposis coli (یا APC) در ۸۰ درصد موارد و فعال‌سازی K-RAS (پروتو آنکوژن) در ۵۰ درصد موارد، شایع‌ترین تغییرات ژنتیکی در CRC هستند (۶).

۱- دانشیار، گروه پاتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دستیار، گروه پاتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- گروه سلولی و مولکولی، دانشکده‌ی علوم، مؤسسه‌ی آموزش عالی نور دانش، میمه، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: اردشیر طالبی
Email: talebi@med.mui.ac.ir



شکل ۱. تجمع نقص‌های ژنتیکی در بدخیم شدن تدریجی و ایجاد آدنوکارسینوما

ACF: Aberrant crypt foci; APC: Adenomatous polyposis coli; MMR: Mismatch repair; BAX: Bcl-2-associated X; TGFBR2: Transforming growth factor, beta receptor II

مراحل پاتولوژیک ایجاد سرطان روده‌ی بزرگ شامل تبدیل تدریجی اپیتلیوم سالم به Aberrant crypt foci (ACF) و سپس، آدنوما (پولیپ یا تومور خوش‌خیم) و در آخر آدنوکارسینوما (CRC و یا تومور بدخیم سرطانی) و نیز تغییرات ژنتیکی شایع در شکل ۱ به صورت خلاصه و شماتیک به تصویر کشیده شده است (۹-۷).

نقص در Mismatch repair (MMR)، باعث بی‌ثباتی میکروستلایت‌ها می‌شود که مشخصه‌ی اصلی سرطان روده‌ی بزرگ ارثی و حدود ۱۵ درصد از موارد سرطان روده‌ی بزرگ تک‌گیر است. با این حال، به طور تقریبی همه‌ی موارد سرطان روده‌ی بزرگ، بر اثر ناپایداری ژنومی دارای ناهنجاری‌های کروموزومی متعدد و فرکانس بالا از فقدان هتروزیگوسیتی Loss of heterozygosity (یا LOH) هستند (۱۱-۱۰، ۵). باید به این نکته توجه داشت که نرخ ایجاد جهش‌های خود به خودی با تعداد جهش‌های گزارش شده در سلول‌های سرطانی انسان، یکسان نیست و ناپایداری ژنومی پیش‌شرط ضروری برای ایجاد و تجمع جهش‌های متعدد در سرطان است (۶).

تکنیک Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR)، روشی برای طبقه‌بندی گونه‌ها، تعیین سویه‌ی میکروارگانیسم‌ها، تشخیص بازآرایی (Rearrangement)، جای‌گیری (Insertion)، حذف (Deletion) در توالی DNA و پلوئیدی در سلول است که توسط پرایمرهای کوتاه با توالی تصادفی و پلیمریزاسیون تصادفی DNA انجام و در نهایت، به کمک الگوی متفاوت باندهی شامل تغییر اندازه‌ی باند، کاهش تعداد باند و افزایش تعداد باند در ژل الکتروفورز تفسیر می‌شود و می‌تواند نمایانگر بازآرایی، جای‌گیری،و حذف در کروموزوم‌ها باشد (۱۳-۱۲). در واقع، روش RAPD-PCR، با فراهم کردن پروفایل ژنومی (بدون نیاز به اطلاع داشتن از توالی) و مقایسه‌ی آن با الگوهای به دست آمده از نمونه‌ی طبیعی، تغییرات ژنتیکی را در سرطان روده تشخیص می‌دهد (۱۴، ۵).

هدف از انجام این مطالعه، مقایسه‌ی تغییرات ژنتیکی آدنوما و آدنوکارسینوما با بافت طبیعی روده‌ی بزرگ در بیماران مبتلا به CRC بود که به این منظور، پروفایل ژنومی بافت آدنوما (پولیپ) و آدنوکارسینوما (سرطان روده‌ی بزرگ) مربوط به ۱۷ بیمار مبتلا به سرطان روده‌ی بزرگ با پروفایل اپیتلیال طبیعی روده‌ی بزرگ همان بیماران با استفاده از تکنیک RAPD-PCR مقایسه گردید.

روش‌ها

نمونه‌های بافتی و استخراج DNA. در این مطالعه، ۱۷ بیمار مبتلا به CRC شرکت داشتند که از هر فرد بیمار، ۳ بلوک پارافینه شامل نمونه‌ی سالم، آدنوما، و آدنوکارسینوما برای استخراج DNA ژنومی مورد اسفاده قرار گرفت. تمامی نمونه‌ها از عمل باز برداشت روده‌ی بزرگ در بیمارستان الزهرای (س) اصفهان جمع‌آوری شد. از هر بلوک، برش‌هایی با ضخامت ۱۰ میکرون با استفاده از تیغه‌ی استریل تهیه و در لوله‌های اپندورف ذخیره شدند. برای استخراج DNA از نمونه‌های جمع‌آوری شده، کیت Exgene cell SV mini (GeneAll, Korea) استفاده شد. نمونه‌های DNA استخراج شده، در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

Random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR)

بخش‌های تصادفی از DNA ژنومی توسط پرایمر ۱۰ نوکلئوتیدی، دارای توالی '5-AAGAGCCCGT-3' با ۶۰ درصد GC، برای تشخیص تغییرات ژنتیکی با استفاده از تکنیک RAPD-PCR تکثیر یافتند. لازم به ذکر است، بر اساس اطلاعات جمع‌آوری شده، پرایمر مورد استفاده در این مطالعه، تنها در یک مطالعه برای تشخیص تغییرات ژنتیکی در نمونه‌های انسانی مورد استفاده قرار گرفته است (۱۵) و پیش‌تر، برای تعیین سویه‌ی باکتری و نیز تعیین ناپایداری ژنتیکی در سایر پستانداران مورد استفاده بوده است (۱۷-۱۶، ۶). PCR در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر شامل ۵۰ پیکومول پرایمر، ۰/۵ میکروگرم DNA ژنومی استخراج شده، ۲/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۱۰۰ میکرومولار Deoxynucleotide triphosphates (dNTP)،

۱ واحد آنزیم Taq polymerase و 1X بافر PCR در دستگاه ترموسایکلر (BioRad, USA) به مدت ۱۰ چرخه‌ی اولیه با سخت‌گیری کم (۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۴۰ ثانیه در ۳۶ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد) و سپس، ۳۰ چرخه با سخت‌گیری بالا (۶۰ ثانیه در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۶۰ ثانیه در ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد) و در نهایت، ۵ دقیقه در دمای ۱۲ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام پذیرفت. ۵ میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد توسط دستگاه الکتروفورز (Cleaver Scientific Multisub, UK) با ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۹۰ دقیقه تفکیک و با رنگ‌آمیزی RedSafe قابل مشاهده شد. پروفایل به دست آمده از تکنیک RAPD-PCR، برای نمونه‌های آدنوما و آدنوکارسینوما با پروفایل به دست آمده از نمونه‌های طبیعی اپیتلیال روده‌ی بزرگ همان بیمار، مقایسه شد و موارد دارای باند اضافه شده و یا حذف شده، به عنوان نمونه‌هایی با ژنوم ناپایدار در نظر گرفته شدند (جدول ۱ و شکل ۲).

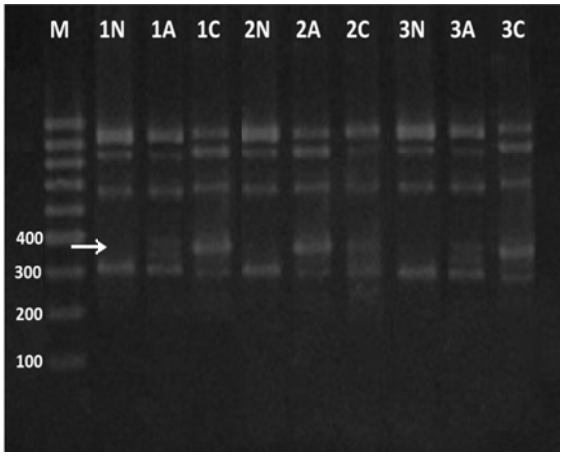
جدول ۱. حضور و عدم حضور باند ۳۷۰ جفت بازی در نمونه‌های نئوپلاستیک (آدنوما و آدنوکارسینوما) و سالم بیماران مبتلا به سرطان روده‌ی بزرگ

تعداد بیماران	طبیعی	آدنوما (پولیپ)	آدنوکارسینوما	جمع (درصد)
۲	+	+	+	۱۱/۸
۹	–	+	+	۵۳/۰
۴	–	–	+	۲۳/۴
۲	–	+	–	۱۱/۸

آنالیز آماری: بررسی همراهی بین فرکانس حضور باند ۳۷۰ جفت بازی در آدنوما و یا آدنوکارسینوما با استفاده از آزمون Fisher's exact و محاسبه‌ی Odds ratio انجام گرفت. همچنین، عوامل حساسیت (Sensitivity)، ویژگی (Specificity)، ارزش اخباری مثبت (Positive predictive value) و ارزش اخباری منفی (Negative predictive value) برای بررسی بیشتر و دقیق‌تر محاسبه شدند (جدول ۲). لازم به ذکر است که تمامی آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism انجام شد.

یافته‌ها

انجام تکنیک RAPD-PCR با استفاده از پرایمر معرفی شده بر روی نمونه‌های آرشیوی طبیعی، آدنوما و آدنوکارسینوما مربوط به ۱۷ بیمار مبتلا به سرطان روده‌ی بزرگ، اثر انگشت DNA ژنومی هر نمونه با تشکیل باندهایی با طول تقریبی بین ۹۰۰–۳۰۰ جفت بازی را فراهم ساخت.



شکل ۲. مقایسه‌ی پروفایل ژنومی به دست آمده از تکنیک Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) و پرایمر استفاده شده در این مطالعه نشان داد که باند ۳۷۰ جفت بازی، می‌تواند به عنوان نشانگر تشخیصی برای بافت‌های آدنوما و آدنوکارسینوما عمل کند (شماره‌ی بالای چاهک‌ها نمایانگر شماره‌ی بیمار، N نمایانگر بافت طبیعی، A نمایانگر آدنوما و C نمایانگر آدنوکارسینوما می‌باشد).

تمامی ۵۱ نمونه‌ی طبیعی، آدنوما و آدنوکارسینوما با موفقیت تکثیر شدند و آنالیز پروفایل به دست آمده از روش RAPD-PCR نشان داد که باندی به طول تقریبی ۳۷۰ جفت بازی، می‌تواند نشانگر مناسبی برای تفکیک تومورهای آدنوما و آدنوکارسینوما از بافت طبیعی باشد (جدول ۱). به طور کلی، از ۱۷ نمونه‌ی طبیعی بررسی شده، تنها در ۲ نمونه‌ی دارای باند ۳۷۰ جفت بازی (۱۱/۸ درصد)، مشاهده شد و نیز در بافت آدنوما و آدنوکارسینوما، فراوانی مشاهده‌ی این باند به ترتیب ۷۶/۵ و ۸۸/۲ درصد بود. لازم به ذکر است که تنها ۶ نمونه، دارای پروفایل متفاوتی برای آدنوما و آدنوکارسینوما بوده‌اند که در جدول ۱ مشخص شده‌اند. همچنین، آنالیز آماری حاکی از وجود ارتباط باند ۳۷۰ جفت بازی با آدنوما ($P = ۰/۰۰۰۴$) و آدنوکارسینوما ($P < ۰/۰۰۰۱$) در مقایسه با بافت طبیعی بوده است. همان‌طور که در جدول ۲ مشخص است، این باند نمی‌تواند به صورت معنی‌داری بین تومور خوش‌خیم (آدنوما) و بدخیم (آدنوکارسینوما) افتراقی قایل شود (ویژگی ۰/۸۸، حساسیت ۰/۲۴ و $P = ۰/۶۶۰۰$).

بحث

مزایای استفاده از تکنیک RAPD-PCR برای تشخیص ناپایداری ژنومی این است که به مقدار کمی از DNA برای تولید اثر انگشت ژنوم نیاز دارد و همچنین، می‌تواند تغییرات متعددی را بدون داشتن دانش قبلی از توالی DNA تشخیص دهد (۵).

جدول ۲. آنالیز آماری مقایسه‌ی نمونه‌ها برای حضور باند ۳۷۰ جفت بازی

مقایسه‌ی دو گروه برای حضور باند ۳۷۰ جفت بازی	مقدار P	نسبت شانس (٪۹۵ CI)	حساسیت (٪۹۵ CI)	اختصاصیت (٪۹۵ CI)	ارزش اخباری مثبت (٪۹۵ CI)	ارزش اخباری منفی (٪۹۵ CI)
آدنوما در مقایسه با طبیعی	۰/۰۰۰۴	۲۴/۳۸ (۳/۸۲-۱۵۵/۵)	۰/۸۸ (۰/۶۴-۰/۹۹)	۰/۷۶ (۰/۵۰-۰/۹۳)	۰/۷۹ (۰/۵۴-۰/۹۴)	۰/۸۷ (۰/۶۰-۰/۹۸)
آدنوکارسینوما در مقایسه با طبیعی	< ۰/۰۰۰۱	۵۶/۲۵ (۶/۹۸-۴۵۳/۴۰)	۰/۸۸ (۰/۶۴-۰/۹۹)	۰/۸۸ (۰/۶۴-۰/۹۹)	۰/۸۸ (۰/۹۹-۰/۶۴)	۰/۸۸ (۰/۶۴-۰/۹۹)
آدنوکارسینوما در مقایسه با آدنوما	۰/۶۶۰۰	۲/۳۱ (۰/۳۶-۱۴/۷۲)	۰/۲۴ (۰/۰۷-۰/۵۰)	۰/۸۸ (۰/۶۴-۰/۹۹)	۰/۶۷ (۰/۲۲-۰/۹۶)	۰/۵۴ (۰/۳۴-۰/۷۲)

انجام PCR برای این تکنیک در دو مرحله با شرایط سخت‌گیری کم (اتصال تعداد زیاد پرایمرها در سراسر ژنوم) و زیاد (تکثیر قطعات منطبق با پرایمر) انجام می‌پذیرد (۱۸، ۵). مطالعات زیادی ناپایداری ژنومی در سرطان روده‌ی بزرگ را توسط روش RAPD-PCR بررسی کرده‌اند (۱۰، ۶-۵). Luo و همکاران، تغییر اثر انگشت ژنوم را در ۲۳/۳ درصد از موارد ACF و ۹۵/۷ درصد از موارد آدنوکارسینوما مشاهده نمودند (۵). Luceri و همکاران، ناپایداری میکروستلایتی را برای آدنوما و آدنوکارسینوما به ترتیب ۱۸/۲ و ۲۵/۰ درصد گزارش کردند (۶).

در این مطالعه، برای اولین بار پرایمر ۱۰ نوکلئوتیدی و دارای توالی '5'-AAGAGCCCGT-3 برای آنالیز ناپایداری ژنومی در سرطان روده‌ی بزرگ انسانی مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه، پروفایل به دست آمده از روش RAPD-PCR نشان داد که حضور و یا حذف باند ۳۷۰ جفت بازی در نمونه‌ها پلی‌مورف می‌باشد و حضور آن با توموری شدن بافت طبیعی همراهی معنی‌داری دارد (P = ۰/۰۰۰۴، OR = ۲۴/۳۸ برای آدنوما و P < ۰/۰۰۰۱، OR = ۵۶/۲۵ برای آدنوکارسینوما). همچنین، با توجه به جدول ۲، پرایمر استفاده شده در این مطالعه، می‌تواند برای تفکیک بافت توموری شامل آدنوما و آدنوکارسینوما از بافت طبیعی با حساسیت و ویژگی بالایی عمل نماید. استفاده از این پرایمر، باعث ایجاد باند ۳۷۰ جفت بازی در ۷۶/۵ درصد موارد آدنوما و ۸۸/۲ درصد موارد آدنوکارسینوما می‌شود که می‌توان آن را به ناپایداری ژنومی گسترده در بافت‌های توموری نسبت داد. ایجاد باند ۳۷۰ جفت بازی در ۱۱/۸ درصد از نمونه‌های طبیعی، بسیار قابل بحث است و بررسی این مشاهده در گروهی با تعداد نمونه‌ی بیشتر پیشنهاد مناسبی به نظر می‌رسد.

تشابه فرکانس حضور باند ۳۷۰ جفت بازی در آدنوما و آدنوکارسینوما، پیشنهاد می‌کند که تغییرات ژنتیکی ایجاد شده در آدنوما تا سرطانی شدن تومور خوش‌خیم در سلول باقی می‌ماند و همچنین، افزایش فرکانس حضور در بافت سرطانی، از فرضیه‌ی تجمع نقص‌های ژنتیکی در پیشرفت سرطان روده‌ی بزرگ حمایت می‌نماید. متأسفانه، تفاوت پروفایل مشاهده شده در تومورها با روش RAPD-PCR را نمی‌توان به طور قطع به حذف ژن‌های سرکوبگر تومور و یا به جهش‌های فعال کننده‌ی آنکوژن‌ها نسبت داد. کلون کردن و آنالیز توالی قطعات پلی‌مورف به دست آمده از روش RAPD-PCR، می‌تواند توالی حذف شده و یا اضافه شده در DNA ژنومی را تشخیص دهد و پیامد آن را در بافت توموری معین سازد (۱۸). بنابراین، تعیین توالی باند ۳۷۰ جفت بازی برای درک عملکرد نهایی از حضور این باند، بسیار ضروری به نظر می‌رسد. علاوه بر الگوی متفاوت در اضافه شدن باند ۳۷۰ جفت بازی، شدت باندهای به دست آمده (با طول بین ۹۰۰-۳۰۰ جفت بازی) نیز در بعضی از نمونه‌ها متغیر است که نمی‌توان این مشاهده را با قطعیت تفسیر نمود و همچنین، نمی‌توان آن را به ناپایداری ژنومی نسبت داد (شکل ۲).

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از آقای دکتر ابوالقاسم اسماعیلی مدیر گروه زیست‌شناسی دانشکده‌ی علوم دانشگاه اصفهان جهت راهنمایی در انجام تکنیک RAPD-PCR تشکر و قدردانی می‌شود. مقاله‌ی حاضر، حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دستیاری در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد.

References

1. Vilar E, Tabernero J. Molecular dissection of microsatellite instable colorectal cancer. Cancer Discov 2013; 3(5): 502-11.
2. Dolatkhah R, Somi MH, Bonyadi MJ, Asvadi K, I, Farassati F, Dastgiri S. Colorectal cancer in Iran: Molecular epidemiology and screening strategies. J Cancer Epidemiol 2015; 2015: 643020.
3. Luo L, Chen WD, Pretlow TP. CpG island methylation in aberrant crypt foci and cancers from the same patients. Int J Cancer 2005; 115(5): 747-51.
4. Grady WM, Markowitz SD. The molecular pathogenesis of colorectal cancer and its potential

application to colorectal cancer screening. Dig Dis Sci 2015; 60(3): 762-72.
5. Luo L, Li B, Pretlow TP. DNA alterations in human aberrant crypt foci and colon cancers by random primed polymerase chain reaction. Cancer Res 2003; 63(19): 6166-9.
6. Luceri C, De Filippo C, Caderni G, Gambacciani L, Salvadori M, Giannini A, et al. Detection of somatic DNA alterations in azoxymethane-induced F344 rat colon tumors by random amplified polymorphic DNA analysis. Carcinogenesis 2000; 21(9): 1753-6.
7. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. N Engl J Med 2009; 361(25): 2449-60.
8. Janne PA, Mayer RJ. Chemoprevention of colorectal cancer. N Engl J Med 2000; 342(26): 1960-8.
9. Munteanu I, Mastalier B. Genetics of colorectal cancer. J Med Life 2014; 7(4): 507-11.
10. Shih IM, Zhou W, Goodman SN, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Evidence that genetic instability occurs at an early stage of colorectal tumorigenesis. Cancer Res 2001; 61(3): 818-22.
11. Kloor M, Staffa L, Ahadova A, von Knebel DM. Clinical significance of microsatellite instability in colorectal cancer. Langenbecks Arch Surg 2014; 399(1): 23-31.
12. Ong TM, Song B, Qian HW, Wu ZL, Whong WZ. Detection of genomic instability in lung cancer tissues by random amplified polymorphic DNA analysis. Carcinogenesis 1998; 19(1): 233-5.
13. Atienzar FA, Jha AN. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review. Mutat Res 2006; 613(2-3): 76-102.
14. Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res 1990; 18(22): 6531-5.
15. Gupta N, Raman G, Banerjee G. Cloning and identification of two unique genes involved in UV induced apoptosis on human keratinocyte (HaCaT) cell line. Toxicol Mech Methods 2004; 14(6): 355-9.
16. Chansiripornchai N, Ramasoota P, Sasipreeyajan J, Svenson SB. Differentiation of avian pathogenic Escherichia coli (APEC) strains by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Vet Microbiol 2001; 80(1): 75-83.
17. Ben MK, Fendri C, Battikh H, Garnier M, Zribi M, Jlizi A, et al. Multiple and mixed Helicobacter pylori infections: Comparison of two epidemiological situations in Tunisia and France. Infect Genet Evol 2016; 37: 43-8.
18. Peinado MA, Malkhosyan S, Velazquez A, Perucho M. Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89(21): 10065-9.

Journal of Isfahan Medical School

Vol. 35, No. 432, 4th Week, July 2017

Received: 18.09.2016

Accepted: 15.11.2016

Comparison of DNA Instability in Adenoma and Adenocarcinoma in Patients with Colorectal Cancer, Using Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR)

Ardeshir Talebi[1], Samsam Daneshbakhtyiar[2], Mahboobeh Meshkat[3], Marzieh Meshkat[3]

Original Article

Abstract

Background: Colorectal cancer is the consequence of gathering numerous genetic alterations and it has been suggested that genomic instability is indispensable for the generation of multiple mutations underlying the development of cancer.

Methods: Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) method was utilized to find genomic alterations in adenomas and adenocarcinomas compared with normal epithelial tissue obtained from 17 patients with colorectal cancer.

Findings: Separated PCR products by 2% agarose determined approximate 370 base pairs band as a polymorphic fingerprint for normal (11.8%), adenoma (76.5%), and adenocarcinoma (88.2%) tissues. Polymorphic band could significantly discriminate adenomas [Odds ratio (OR) = 24.38, P = 0.0004] and adenocarcinomas (OR = 56.25, P < 0.0001) from normal tissues. Furthermore, the 370 base pairs band could not distinguish adenomas from adenocarcinomas (P = 0.6600).

Conclusion: Further investigations can be aimed for sequencing and disclosing functional outcome of gaining 370 base pairs band.

Keywords: Colorectal cancer, Adenoma, Adenocarcinoma, Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction, Genomic instability

Citation: Talebi A, Daneshbakhtyiar S, Meshkat M, Meshkat M. **Comparison of DNA Instability in Adenoma and Adenocarcinoma in Patients with Colorectal Cancer, Using Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR).** J Isfahan Med Sch 2017; 35(432): 609-14.

1- Associate Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Resident, Department of Pathology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Department of Cellular and Molecular Biology, School of Sciences, Nourdanesh Institute of Higher Education, Meymeh, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Ardeshir Talebi, Email: talebi@med.mui.ac.ir