دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان‌نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوشیمی بالینی

عنوان: بررسی ارتباط بین ژنوتیپ و فعالیت آنزیم PON1 با خطر ابتلای به سرطان معده.

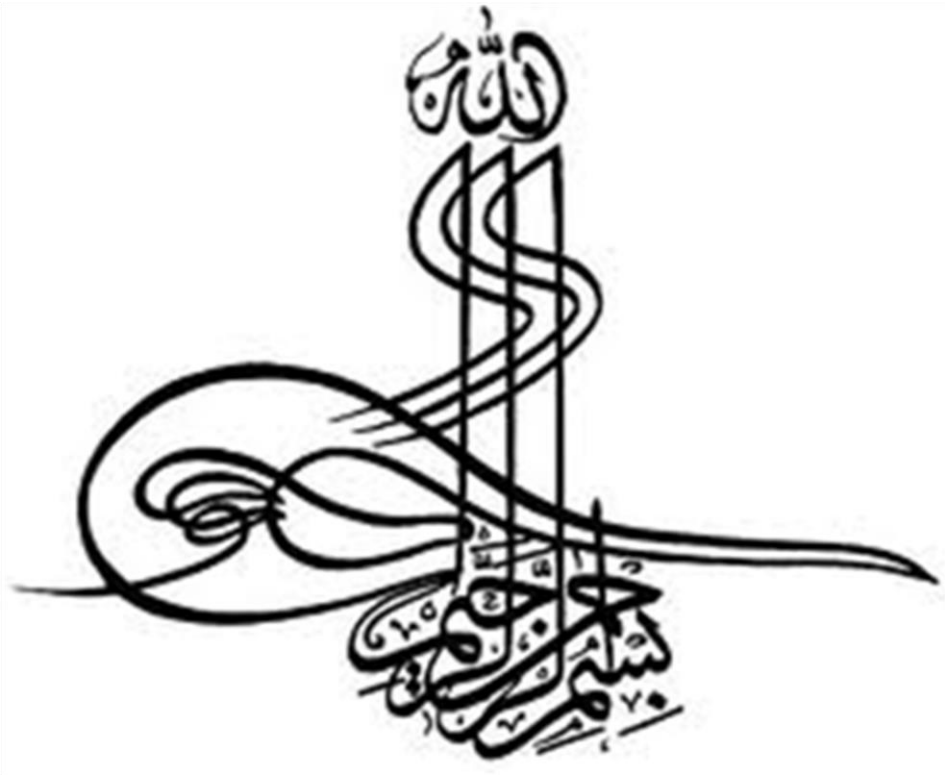
نگارش:
الهه نجفی

اساتید راهنما:
دکتر علی‌اکبر فضایلی
دکتر محمد مأذنی

اساتید مشاور:
دکتر فرهاد پورفرضی
دکتر عباس یزدان بد

مردادماه ۱۴۰۱

شماره پایان‌نامه:
۰۸۶



دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی استان اردبیل

بسمه تعالی

گواهی اصالت پایان نامه

اینجانب ..... دانشجوی مقطع ..... رشته .....

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل تایید می‌نمایم که :

- این پایان نامه بر اساس نتایج بررسیها/ تحقیقات انجام یافته توسط اینجانب تحت راهنمای خانم/آقای دکتر ..... بوده و بوسیله **خودم** انشا گردیده است و در صورت استفاده از نتایج پژوهش ها و یا آثار دیگران بلافاصله به مرجع مورد استفاده استناد شده است و در قسمت منابع و مآخذ مشخصات مرجع به طور کامل ذکر گردیده است.
- مسئولیت صحت مطالب مندرج در این پایان‌نامه به طور کامل با اینجانب است.
- این پایان نامه قبلا برای دریافت هیچ مدرک تحصیلی (هم سطح ، پایین تر یا بالاتر) درسایر دانشگاه ها وموسسات آموزش عالی ارائه نشده است.
- کلیه حقوق مادی و معنوی این پایان‌نامه و هر گونه محصول مستخرج از آن اعم از مقالات، چاپ کتاب و ثبت اختراع به دانشگاه علوم پزشکی اردبیل تعلق دارد و هرگونه استفاده از اطلاعات و یا نتایج، واگذاری اطلاعات به افراد دیگر، چاپ، تکثیر، نسخه‌برداری، ترجمه و اقتباس از این پایان‌نامه بدون اخذ اجازه کتبی از دانشگاه علوم پزشکی اردبیل ممنوع است.
- کلیه مقالات مستخرج از این پایان‌نامه تحت نام دانشگاه علوم پزشکی اردبیل (Ardabil University of Medical sciences) به عنوان وابستگی نویسنده اول یا مسئول و با اطلاع و اجازه تمامی اساتید راهنما و مشاور به چاپ رسیده یا خواهد رسید.
- چنانچه در هر مقطع زمانی، خلاف مواردفوق ثابت شود، عواقب ناشی ازآن را می پذیرم و دانشگاه مجاز است با اینجانب مطابق با ضوابط و مقررات رفتار نموده و در صورت برخورد قانونی، هیچ گونه ادعایی نخواهم داشت.

نام و نام خانوادگی دانشجو
امضا و تاریخ

- بدینوسیله **اصالت و صحت** نتایج این پایان نامه مورد تأیید اینجانب، .....استاد/اساتید راهنما می باشد.

نام و نام خانوادگی استاد/ اساتید راهنما
امضا و تاریخ

سپاس خدای بزرگ را که مرا یاری رساند تا بتوانم این مقطع تحصیلی را به پایان رسانده و گامی در راستای اعتلای علم بر دارم

این پایان نامه را تقدیم می‌کنم به مهربانترین همراهان زندگیم، پدر، مادر عزیزم که حضورشان همیشه گرما بخش روح من بوده است. و به خاطر زحماتی که در طول زندگی همواره برای پیروزی و شادکامی من به جان خریدند، تشکر می‌کنم.

تقدیر و سپاس

بر خود واجب می‌دانم از استاد فرزانه جناب آقای دکتر علی اکبر فضائلی که به عنوان استاد راهنما در مراحل مختلف این پایانامه همواره با سعه صدر و گشاده رویی در کنار من بودند و در طول مدت تحصیل از راهنمایی‌های اخلاقی و علمی ایشان بهره جسته‌ام تشکر و قدردانی نمایم.

از استاد راهنمای بزرگوارم جناب آقای دکترمحمد ماذنی به پاس زحمات بي شائبه شان در طي انجام اين تحقيق سپاسگزاري نمايم.

تمامی عزیزان همکار در کلینیک گوارش ارس بیمارستان امام خمینی (ره) و مرکز تحقیقات گوارش و کبد استان اردبیل که در انجام مراحل این پژوهش مرا یاری نموده‌اند.

فهرست

عنوان صفحه

چکیده:.....۱

فصل اول: مقدمه

(۱-۱) اهمیت موضوع و انگیزه تحقیق.....۴

(۱-۲) اهداف و فرضیات طرح ۵

(۱-۲-۱) اهداف اختصاصی طرح.....۵

(۱-۲-۲) فرضیات.....۵

(۱-۳) تعریف واژه‌های اختصاصی ۵

فصل دوم: بررسی متون

(۲-۱) بیولوژی سرطان.....۶

(۲-۲) اپیدمیولوژی سرطان ۷

(۲-۳) سرطان معده ۸

(۲-۴) اپیدمیولوژی سرطان معده.....۹

(۲-۵) معده ۱۰

(۲-۵-۱) آناتومی معده ۱۰

(۲-۵-۲) انواع سرطان معده ۱۰

(۲-۵-۳) طبقه‌بندی سرطان معده.....۱۱

(۲-۵-۳-۱) طبقه‌بندی بافتی.....۱۱

(۲-۵-۳-۲) طبقه‌بندی تشریحی (کالبدشناسی).....۱۱

(۲-۵-۴) تظاهرات بالینی ۱۱

(۲-۵-۵) تشخیص سرطان معده.....۱۳

(۲-۵-۶) جلوگیری از ابتلا به سرطان معده ۱۳

(۲-۵-۷) اتیولوژی سرطان معده ۱۳

(۲-۵-۷-۱) هلیکوباکترپیلوری ۱۴

(۲-۵-۷-۲) رژیم غذایی.....۱۵

(۲-۵-۷-۳) دخانیات ۱۶

(۲-۵-۷-۴) ویروس Epstein-Barr.....۱۷

(۲-۵-۷-۵) چاقی.....۱۷

(۲-۵-۷-۶) گروه خونی ۱۸
(۲-۵-۷-۷) جنسیت ۱۸
(۲-۵-۷-۸) آنمی پرنیشیوز ۱۹
(۲-۵-۷-۹) عوامل ژنتیکی ۱۹
(۲-۶) پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) ۲۱
(۲-۷) استرس‌اکسیداتیو ۲۳
(۲-۸) آنزیم پاراکسوناز (PON) ۲۵
(۲-۸-۱) بررسی ژنتیکی خانواده پاراکسوناز ۲۶
(۲-۸-۲) ساختار و مکانیزم کاتالیزوری PON1 ..... ۲۶
(۲-۹) نقش های فیزیولوژیکی PON1 ..... ۲۷
(۲-۱۰) ارتباط PON1 با سرطان ۲۸
(۲-۱۱) پلی‌مورفیسم‌های *PON1* ۲۹
(۲-۱۲) ارتباط عوامل اکتسابی با PON1 ..... ۳۱
(۲-۱۲-۱) رژیم غذایی ۳۱
(۲-۱۲-۲) سیگار کشیدن ۳۲
(۲-۱۲-۳) سن ۳۳
(۲-۱۲-۴) سموم محیطی ۳۳
(۲-۱۲-۵) الکل ۳۴
(۲-۱۲-۶) بیماری‌های دیگر ۳۵
(۲-۱۳) برسی متون ۳۶

فصل سوم: مواد و روش کار

(۳-۱) گروه‌های موردمطالعه ۳۹
(۳-۲) آماده‌سازی فرایند پژوهش ۳۹
(۳-۲-۱) نحوه اخذ نمونه خون و آماده کردن نمونه‌ها: ۳۹
(۳-۳) مواد و لوازم موردنیاز ۳۹
(۳-۳-۱) مواد و لوازم موردنیاز جهت نمونه‌گیری: ۳۹
(۳-۳-۲) مواد و لوازم موردنیاز جهت استخراج DNA ژنومی از لوکوسیت‌های خون محیطی به روش رسوب‌دهی نمک (Salting out): ۴۰
(۳-۳-۳) مواد و لوازم موردنیاز در الکتروفورز ژل آگارز جهت ارزیابی کیفیت DNA استخراج‌شده: ۴۱
(۳-۳-۴) مواد و لوازم موردنیاز جهت انجام واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR): ۴۲
(۳-۳-۵) مواد و لوازم موردنیاز جهت الکتروفورز محصول PCR و ژنوتایپینگ نمونه‌ها: ۴۴
(۳-۳-۶) مواد ولوازم مورد نیاز جهت سنجش فعالیت پاراکسوناز ۱ ..... ۴۴

(۳-۴) بافرها و محلول‌های مورد استفاده در این تحقیق ۴۵

(۳-۴-۱) تهیه بافر لیز کننده گلبول‌های قرمز (ELB): ۴۵
(۳-۴-۲) تهیه بافر لیز کننده گلبول‌های سفید (LLB): ۴۶
(۳-۴-۳) تهیه محلول SDS 10%: ۴۶
(۳-۴-۴) تهیه بافر TE: ۴۶
(۳-۴-۵) تهیه بافر TAE 1X: ۴۷
(۳-۵) روش کار ۴۷

(۳-۵-۱) دستورالعمل استخراج DNA: ۴۷
(۳-۵-۲) ارزیابی کیفیت DNA استخراج‌شده، با استفاده از تکنیک الکتروفورز: ۴۹
(۳-۵-۲-۱) تهیه ژل آگارز ۱٪: ۴۹
(۳-۵-۲-۲) آماده‌سازی و لود نمونه‌های DNA استخراج‌شده بر روی ژل: ۴۹
(۳-۵-۳) ارزیابی کمیت DNA استخراج‌شده، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر: ۵۰
(۳-۵-۴) روش انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): ۵۰
(۳-۵-۴-۱) رقیق‌سازی پرایمرهای لیوفیلیزه ۵۰
(۳-۵-۴-۲) روش انجام PCR ۵۱
(۳-۵-۵) الکتروفورز محصول PCR و ژنوتایپینگ نمونه‌ها: ۵۲

(۳-۶) روش سنجش فعالیت آریل استرازی آنزیم پاراکسوناز ۱ ..... ۵۳

(۳-۶-۱) سنجش فعالیت آریل‌استرازی آنزیم پاراکسوناز ۱ ..... ۵۳
(۳-۷) محاسبات آماری: ۵۴

فصل چهارم: نتایج

(۴-۱) نتایج بررسی‌های مولکولی ۵۵

(۴-۱-۱) ارزیابی کیفیت DNA استخراج‌شده به روش Salting out ۵۵
(۴-۱-۲) ارزیابی کمیت DNA استخراج‌شده به روش Salting out: ۵۶
(۴-۲) نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) پلی‌مورفیسم‌های ژن *PON1* ۵۷

(۴-۲-۱) نتایج الکتروفورز محصولات PCR ۵۷
(۴-۳) نتایج آنالیز آماری پلی‌مورفیسم‌های ژن *PON1* ۵۸

(۴-۳-۱) نتایج آنالیز آماری پلی‌مورفیسم *LM55* ۵۸
(۴-۳-۱-۱) بررسی فراوانی ژنوتیپی پلی‌مورفیسم LM55 A>T ۵۸
(۴-۳-۱-۲) بررسی فراوانی آللی پلی‌مورفیسم LM55 A>T ۶۲
(۴-۳-۱-۳) بررسی تعادل هاردی-واینبرگ پلی‌مورفیسم LM55 ..... ۶۳
(۴-۳-۱-۴) بررسی فراوانی ژنوتیپ‌ها در الگوهای توارثی آللهای پلی‌مورفیسم LM55 A>T ۶۵

(۴-۴) نتایج آنالیز آماری فعالیت سرمی آنزیم PON1 ..... ۶۶

فصل پنجم: بحث و نتیجه‌گیری

(۵-۱) تأثیر فراوانی پلی‌مورفیسم ژن *PON1* بر ریسک بروز بیماری‌های مختلف ۷۲

(۵-۲) مقایسه نتایج مطالعات انجام‌شده مشابه با مطالعه حاضر ۸۰

(۵-۳) محدودیت‌های مطالعه ۸۷

(۵-۴) نتیجه گیری ۸۸

(۵-۵) پیشنهادات ۸۹

فهرست اشکال، جداول و نمودارها

شکل ۱-۲. نمایش موارد جدید ابتلا به سرطان به تفکیک قاره‌ها ۷
شکل ۲-۲. تظاهرات بالینی سرطان معده ۱۲
جدول ۱-۲: سندرم‌های ارثی ناشی از اختلال در جایگاه‌های ژنی که خطر ابتلا به سرطان معده را دنبال دارند. ۲۰
شکل ۳-۲: این طرح نشان می دهد که چگونه سیستم نشانگرهای خطر ژنومی برای پیشگیری از سرطان می‌تواند طراحی شود. پس از تعریف، SNP های مرتبط با سرطان به نسل های آینده این امکان را می‌دهند که در مورد استعداد خود برای ابتلا به سرطان مطلع شوند. ۲۳
شکل۴-۲: عوامل موثر بر فعالیت PON1 ..... ۳۰
جدول ۱-۳: دستگاه‌های موردنیاز جهت استخراج DNA ۴۱
جدول ۲-۳. دستگاه‌های موردنیاز جهت الکتروفورز DNA استخراج‌شده و مستندسازی نتایج ۴۲
جدول ۳-۳. دستگاه‌های موردنیاز جهت ارزیابی کمی DNA استخراج‌شده ۴۲
جدول ۴-۳: اطلاعات مربوط به توالی پرایمرهای طراحی‌شده ۴۳
جدول ۵-۳. دستگاه‌های موردنیاز جهت انجام PCR ۴۳
جدول ۶-۳. دستگاه‌های موردنیاز جهت سنجش فعالیت پاراکسوناز ۱ ..... ۴۵
جدول ۷-۳. غلظت مواد موردنیاز جهت انجام واکنش PCR ۵۲
جدول ۸-۳. برنامه دمایی–زمانی PCR به تفکیک جایگاه‌ها ۵۲
شکل ۱-۴. الکتروفورز DNA ژنومیک استخراج‌شده ۵۵
شکل ۲-۴. نمونه‌ای از ارزیابی کمی DNA استخراج‌شده با استفاده از نانودارپ ۵۶
جدول ۱-۴. طول قطعات تکثیرشده در PCR پلی‌مورفیسم L55M ۵۷
شکل ۳-۴. تصویر الگوی الکتروفورز محصولات PCR ژن *PON1* L55M ۵۸
جدول ۲-۴. نتایج مربوط به فراوانی ژنوتیپی پلی‌مورفیسم LM55 ..... ۵۹
نمودار ۱-۴. نمایش فراوانی ژنوتیپ‌های AA در مقابل AT و TT ۵۹
جدول ۳-۴. مقایسه فراوانی ژنوتیپی TT در مقابل AA در پلی‌مورفیسم L55M A>T ۶۰
نمودار ۲-۴. نمایش فراوانی ژنوتیپ‌های TT در مقابل AA ۶۱
جدول ۴-۴. مقایسه فراوانی ژنوتیپی TT در مقابل AT در پلی‌مورفیسم L55M A>T ۶۱
نمودار ۳-۴. نمایش فراوانی ژنوتیپ‌های TT در مقابل AT ۶۲
جدول ۵-۴. نتایج مربوط به فراوانی آللی پلی‌مورفیسم LM55 ..... ۶۳
نمودار ۴-۴. نمایش فراوانی آلل‌های A در مقابل T ۶۴
جدول ۶-۴. بررسی تعادل هاردی- واینبرگ در جمعیت بیمار و سالم ۶۴
جدول ۷-۴. توزیع ژنوتیپی بر اساس ۳ مدل توارث آللی ۶۵
جدول۸-۴. ویژگی‌های جمعیت شناختی ، فعالیت آنزیم پاراکسوناز ۱ و پروفایل لیپیدی در بیماران مبتلا به سرطان معده و گروه کنترل ۶۶
نمودار ۵-۴ منحنی راک برای سطح فعالیت سرمی PON1 در افراد مبتلا به سرطان معده و افراد سالم ۶۷
نمودار ۶-۴. سطح سرمی فعالیت آنزیم PON1 در افراد مبتلا به سرطان معده و افراد سالم ۶۸

اختصارات:

AML	Acute Myeloid Leukemia
ARE	Arylesterase
BMI	Body Mass Index
CHD	Coronary Heart Disease
DM	Diabetes Melitus
ECG	Early gastric cancer
ENCODE	Encyclopedia of DNA Elements
FH	Familial Hypercholesterolaemia
GC	Gastric Cancer
GWAS	Genome-Wide Association Study
HWE	Hardy–Weinberg Equilibrium
IL-1	Inter Leukin-1
LAT	Lactonase
PON1	Paraoxonase1
PPARS	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
ROS	Reactive oxygen species
SCC	Squmous Cell Carcinoma
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TNF-a	Tumor Necrosis Factor-alpha

بررسی ارتباط بین ژنوتیپ و فعالیت آنزیم PON1 با خطر ابتلای به سرطان معده

چکیده:

زمینه: سرطان معده به عنوان شایع‌ترین سرطان مردان و دومین سرطان شایع زنان در ایران است. عوامل ژنتیکی و محیطی در بروز سرطان موثر می‌باشند. گونه‌های فعال اکسیژن ترکیباتی هستند که به صورت روزمره در داخل بدن تولید شده و توانایی آسیب به ترکیبات حیاتی بدن را دارا می‌باشند. یکی از آنزیم‌هایی که عمل خنثی سازی و غیرفعال سازی گونه-های فعال اکسیژن را انجام می‌دهد پاراکسوناز ۱ می‌باشد. آنزیم‌های خانواده پاراکسوناز به ویژه PON1[1] بدلیل ماهیت عملکردی خود می‌توانند نقش مهمی در سرطان‌های مختلف داشته باشند. بدلیل اهمیت این آنزیم‌ها به ویژه در سمیت‌زدایی از ترکیبات اکسیدان داخل بدن، نقش آن‌ها در ابتلای افراد به سرطان مطرح شده است. از این رو مطالعات گسترده‌ای از دیدگاه‌های مختلف در مورد نقش این آنزیم در مسیر سرطان‌زایی و درمان سرطان انجام گرفته است. بررسی تفاوت‌های ژنتیکی این آنزیم در افراد مختلف از یک سو و ارزیابی تاثیر این تفاوت‌ها بر فعالیت آنزیم و سبک زندگی افراد (مصرف الکل، مصرف سیگار، رژیم غذایی و تاثیر آن روی پروفایل لیپیدی) بر خطر ابتلا به این بیماری موثر می‌باشد.

با وجود این‌که مطالعاتی در مورد تک تک تاثیر متغییرهای فوق بر روی خطر ابتلا به سرطان های گوناگون در جمیعت های مختلفی انجام گرفته است با این وجود به نظر می‌رسد مطالعه تاثیر متغییرهای فوق در کنار یکدیگر کمتر موردتوجه قرار گرفته است. بر این اساس در این

[1] Paraoxonase 1

پژوهش برآن شدیم تا تاثیر متغییرهای پیش‌گفته را روی سرطان معده که یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها به ویژه در استان اردبیل می‌باشد را مورد مطالعه قرار دهیم.

هدف: بررسی ارتباط بین ژنوتیپ و فعالیت آنزیم PON1 با خطر ابتلای به سرطان معده.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد-شاهدی ۲۸۵ نفر (۱۴۰ فرد مبتلا به سرطان معده به‌عنوان گروه مورد و ۱۴۵ فرد سالم به‌عنوان گروه کنترل یا شاهد) به ترتیب از کلینیک ارس بیمارستان امام خمینی (ره) و مرکز تحقیقات گوارش و کبد استان اردبیل انتخاب گردیدند. نمونه‌های خون کامل از افراد مورد مطالعه جهت استخراج DNA و تعیین پلی‌مورفیسم‌های ژن PON1 با استفاده از تکنیک Tetra-Primer ARMS-PCR جمع‌آوری گردید.

در مرحله بعد، بررسی فنوتیپ نمونه‌ها از طریق سنجش فعالیت آنزیم PON1 در سرم نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتوفتومتر انجام شد. و در پایان، نتایج توسط آزمون‌های آماری مقایسه میانگین‌ها و X2 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج: پس از تجزیه و تحلیل داده‌ها، فراوانی پلی‌مورفیسم LM55 در گروه مورد و شاهد تفاوت معناداری داشت ($p<۰/۰۵$). همچنین پس از آزمایشات تکمیلی مشخص شد که افراد با ژنوتیپ TT نسبت به افرادی با ژنوتیپ AA استعداد ابتلا به سرطان معده بیشتری دارند. علاوه بر این، افراد مبتلا به سرطان معده سطح فعالیت سرمی آنزیم PON1 کمتری نشان دادند. با بررسی‌های بیشتر مشخص شد که افراد دارای ژنوتیپ TT میزان فعالیت آنزیم کمتری داشته و در معرض خطر بیشتری برای ابتلا به سرطان معده هستند.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه مشخص شد که پلی‌مورفیسم LM55 ژن PON1 با افزایش خطر ابتلا به سرطان معده مرتبط است. می‌توان نتیجه گرفت که پلی‌مورفیسم LM55 می‌تواند

نقش مهمی به عنوان نشانگر بیولوژیکی (بیومارکر) در تشخیص و پیش‌آگهی زودرس سرطان معده ایفا کند. که نیاز به تحقیقات بیشتر و گسترده‌تری دارد. و همچنین از مطالعه حاضر چنین استنتاج می‌شود که در بیماران مبتلا به سرطان معده فعالیت آنزیم PON1 کاهش می‌یابد.

کلمات کلیدی: سرطان معده، PON1، فعالیت آنزیم، پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی، جهش