دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجهٔ کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی

عنوان: ارتباط بین پلی‌مورفیسم ژنی و سطح سرمی آنزیم CPA4 با خطر ابتلای به سرطان معده

نگارش:

شیدا معروف روحی زاد

اساتید راهنما:

دکتر علی اکبر فضائلی

دکتر فرهاد پورفرضی

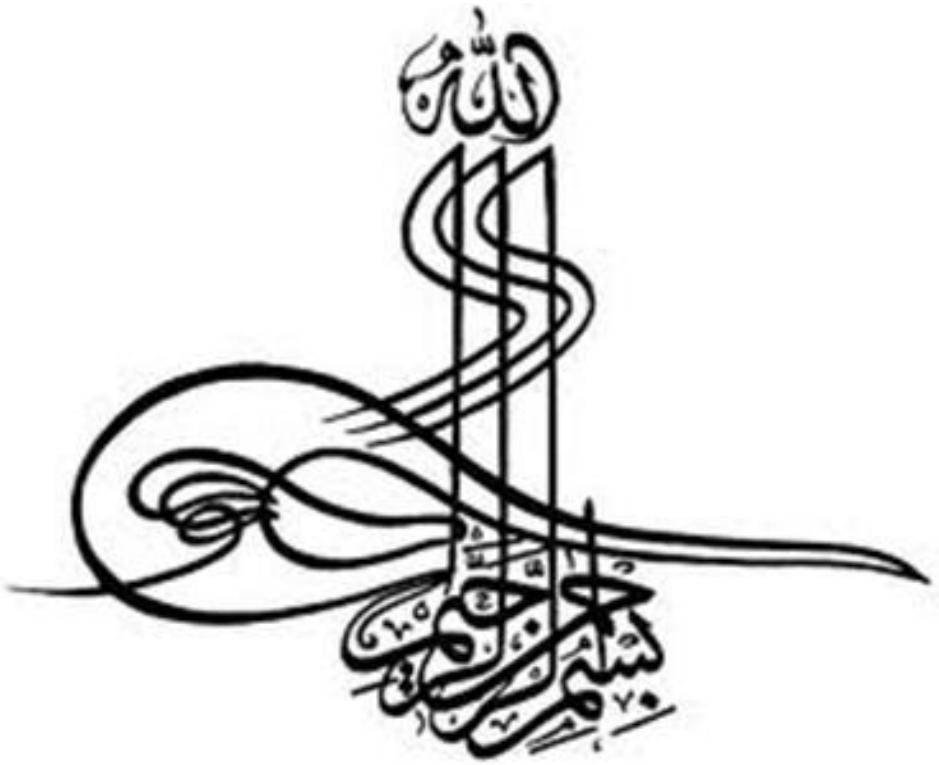
استاد مشاور:

دکتر محمد ماذنی

دکتر عباس یزدان بد

شهریور ماه ۱۴۰۱

شماره پایان نامه: ۰۸۳


الله
بسم الله الرحمن الرحيم

ماحصل آموخته هایم را تقدیم می‌کنم به آنان که مهر آسمانی شان آرام بخش آلام زمینی ام است:

پدر عزیزم

مادر بزرگوارم

و همسر همیشه همراه و تکیه‌گاهم

که در سراسر زندگی تحصیلیم از نظر مادی و معنوی با از هیچ کوششی دریغ نورزیدند و همواره در همه حال همراه و مشوق من بوده‌اند.

با سپاس و تقدیر ویژه از استاد گرانقدر جناب آقای دکتر علی اکبر فضائلی که در مراحل مختلف این پژوهش، راهنمایی‌های ارزنده و سازنده خود را برمن ارزانی داشته و از هیچ کوششی در این زمینه دریغ ننمودند.

با قدردانی فراوان از اساتید محترم دکتر فرهاد پورفرضی و دکتر محمد ماذنی که ما را در هر چه بهتر و کامل شدن این پروژه یاری کردند.

از 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 با این جانب همکاری داشته اند تشکر نموده و صمیمانه آرزومند موفقیت همه آنان هستم.

فهرست مطالب

چکیده: ۱
فصل اول:مقدمه ۱
(۱-۱) اهمیت موضوع و انگیزه تحقیق ۳
(۱-۲) اهداف و فرضیات طرح ۷
(۱-۲-۱) هدف کلی طرح ۷
(۱-۲-۲) اهداف اختصاصی طرح ۷
(۱-۲-۳) فرضیات طرح ۷
(۱-۳) تعریف واژه های اختصاصی ۸
فصل دوم:بررسی متون ۱۰
(۲-۱) سرطان ۱۱
(۲-۱-۱) اپیدمیولوژی سرطان در سطح جهانی ۱۲
(۲-۲) آناتومی معده ۱۴
(۲-۲-۱)بخش‌های تشکیل دهنده‌ی معده ۱۵
(۲-۲-۲) سرطان معده ۱۷
(۲-۲-۳) طبقه بندی سرطان معده ۱۹
(۲-۲-۳-۱) سرطان پراکنده‌ی معده ۱۹
(۲-۲-۳-۲) سرطان معده با شروع زودرس ۲۰
(۲-۲-۳-۳) سرطان استامپ معده ۲۱
(۲-۲-۳-۴) سرطان منتشر ارثی معده ۲۱
(۲-۲-۴) اتیولوژی سرطان معده ۲۲
(۲-۲-۴-۱) تاثیر سبک زندگی و استفاده از دخانیات ۲۲
(۲-۲-۴-۲) عفونت هلیکوباکتر پیلوری و ابتلا به سرطان معده ۲۳
(۲-۲-۴-۳) آلودگی به ویروس اپشتین بار ۲۴
(۲-۲-۵) غربالگری و تشخیص زودهنگام سرطان معده ۲۵
(۲-۲-۵-۱) اندوسکوپی دستگاه گوارش فوقانی ۲۶
(۲-۲-۵-۲) لاپاراسکوپی مرحله‌بندی (SL) ۲۶
(۲-۲-۵-۳) نقش بیومارکرها در تشخیص سرطان ۲۷
(۲-۲-۶) آنزیم کربوکسی پپتیداز A4 (CPA4) ۲۸
(۲-۲-۶-۱) ساختار و عملکرد آنزیم CPA4 ..... ۲۹

(۲-۶-۲-۲) ارتباط CPA4 با سرطان‌های شایع ۳۱
(۳-۶-۲-۲) ارتباط CPA4 با سرطان معده ۳۸
فصل سوم:مواد و روش کار ۴۴
(۱-۳) گروه‌های مورد مطالعه ۴۵
(۲-۳) آماده سازی فرایند پژوهش ۴۵
(۱-۲-۳) نحوه اخذ نمونه خون و سرم و آماده کردن نمونه‌ها: ۴۵
(۳-۳) مواد و لوازم موردنیاز ۴۶
(۱-۳-۳) مواد و لوازم موردنیاز جهت نمونه‌گیری: ۴۶
(۲-۳-۳) مواد و لوازم موردنیاز جهت استخراج DNA ژنومی از لوکوسیت‌های خون محیطی به روش رسوب‌دهی نمک (Salting out): ۴۶
(۳-۳-۳) مواد و لوازم موردنیاز در الکتروفورز ژل آگارز جهت ارزیابی کیفیت DNA استخراج‌شده: ..۴۸
(۴-۳-۳) مواد و لوازم موردنیاز جهت انجام واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR): ۵۰
(۵-۳-۳) مواد و لوازم موردنیاز جهت الکتروفورز محصول PCR و ژنوتایپینگ نمونه‌ها: ۵۲
(۶-۳-۳) مواد و لوازم موردنیاز جهت انجام ELISA..... ۵۲
(۴-۳) بافرها و محلول‌های مورد استفاده در این تحقیق ۵۳
(۱-۴-۳) تهیه بافر لیز کننده گلبول‌های قرمز (ELB): ۵۳
(۲-۴-۳) تهیه بافر لیز کننده گلبول‌های سفید (LLB): ۵۳
(۳-۴-۳) تهیه محلول SDS 10%: ۵۴
(۴-۴-۳) تهیه بافر TE: ۵۴
(۵-۴-۳) تهیه بافر TAE 1X: ۵۵
(۵-۳) روش کار ۵۵
استخراج DNA به روش Salting out: ۵۵
(۱-۵-۳) دستورالعمل استخراج DNA: ۵۵
(۲-۵-۳) ارزیابی کیفیت DNA استخراج‌شده، با استفاده از تکنیک الکتروفورز: ۵۷
(۱-۲-۵-۳) تهیه ژل آگارز ۱٪: ۵۷
(۲-۲-۵-۳) آماده‌سازی و لود نمونه‌های DNA استخراج‌شده بر روی ژل: ۵۸
(۳-۵-۳) ارزیابی کمیت DNA استخراج‌شده، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر: ۵۹
(۴-۵-۳) روش انجام واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR): ۵۹
(۱-۴-۵-۳) رقیقسازی پرایمرهای لیوفیلیزه..... ۵۹
(۲-۴-۵-۳) روش انجام PCR ۶۰
(۵-۵-۳) الکتروفورز محصول PCR و ژنوتایپینگ نمونهها: ۶۲
(۶-۳) دستور العمل تهیه‌ی سرم بیمار از خون..... ۶۲
(۱-۶-۳) روش انجام واکنش الایزا: ۶۳

(۷-۵-۳) محاسبات آماری:..... ۶۴
فصل چهارم:نتایج ۶۷
(۴-۱) نتایج بررسی‌های مولکولی ۶۸
(۴-۱-۱) ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده توسط روش Salting out:..... ۶۸
(۴-۱-۲) ارزیابی کمیت DNA استخراج شده توسط روش Salting out: ۶۸
(۴-۲) نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) پلی‌مورفیسم rs2171492 ژن CarboxypeptidaseA4 ..... ۶۹
(۴-۳) نتایج الکتروفورز محصولات نهایی حاصل از PCR..... ۷۰
(۴-۴) نتایج آنالیز آماری پلی‌مورفیسم ژن CPA4..... ۷۰
(۴-۴-۱-۲) بررسی فراوانی آللی پلی‌مورفیسم rs2171492 G>T ۷۷
(۴-۴-۱-۲)بررسی تعادل هاردی-واینبرگ پلی‌مورفیسم rs2171492 ..... ۷۸
(۴-۴-۱-۳)بررسی فراوانی ژنوتیپ‌ها در الگوهای توارثی آلل‌های پلی‌مورفیسم rs2171492 G>T ... ۷۹
(۴-۵) نتایج بررسی‌های بیوشیمیایی ۸۰
(۴-۵-۱) نتایج آنالیز ویژگی‌های جمعیت شناختی..... ۸۰
فصل پنجم:بحث و نتیجه گیری ۶۱
(۵-۱) تاثیر فراوانی پلی‌مورفیسم ژنی و سطح سرمی آنزیم CPA4 بر ریسک بروز برخی از بیماری‌ها۷۸
(۵-۲) مقایسه نتایج مطالعات انجامشده مشابه با مطالعه حاضر..... ۸۱
(۵-۳) معیارهای ورود و خروج از مطالعه..... ۸۷
(۵-۴)محدودیت‌های مطالعه ۸۸
(۵-۵) نتیجه گیری ۸۹
(۵-۶) پیشنهادات ۹۰
منابع ۹۱

فهرست شکل‌ها

شکل۱۱-۱ اپیدمیولوژی سرطان در سطح جهانی در سال ۲۰۲۰ ..... ۱۳
شکل۲ ۱-۲ فاکتورهای سرطانزای تاثیر گذار بر معده و بخشی که بر آن تاثیر می‌گذارند..... ۲٤
شکل۳ ۱-۳ آلودگی معده به ویروس اپشتین بار ۲٥

فهرست جداول

جدول ۱-۳ دستگاه‌های استفاده شده جهت استخراج DNA ٤٧
جدول ۲-۳ دستگاه‌های استفاده شده جهت الکتروفورز DNA استخراج شده ٤٩
جدول۳-۳ دستگاه‌های استفاده شده جهت الکتروفورز DNA استخراج شده ٥٠
جدول ۴-۳ پرایمرهای طراحی شده و استفاده شده ٥١
جدول ۵-۳ دستگاه‌های استفاده شده برای انجام PCR ٥١
جدول ۶-۳ دستگاه‌های استفاده شده جهت انجام ELISA ٥٢
جدول ۷-۳ غلظت مواد مورد نیاز برای انجام واکنش‌ها ٦١
جدول ۸-۳ برنامه دمایی-زمانی PCR ٦١
جدول ۱-۴ طول قطعات تکثیرشده در PCR پلی‌مورفیسم rs2171492 G>T ٧٠
جدول ۲-۴ نتایج مربوط به فراوانی ژنوتیپی پلی‌مورفیسم rs2171492 ..... ٧١
جدول ۳-۴ مقایسه فراوانی ژنوتیپی TT در مقابل GG در پلی‌مورفیسم rs2171492 G>T ٧٣
جدول ۴-۴ مقایسه فراوانی ژنوتیپی TT در مقابل GT در پلی‌مورفیسم rs2171492 G>T ٧٥
جدول ۵-۴ نتایج مربوط به فراوانی آللی پلی‌مورفیسم rs2171492 G>T ٧٧
جدول ۶-۴ بررسی تعادل هاردی- واینبرگ در جمعیت بیمار و سالم ٧٨
جدول ۷-۴ توزیع ژنوتیپی بر اساس ۳ مدل توارث آللی ٨٠
جدول ۸-۴ ویژگی‌های جمعیت‌شناختی و سطح CPA4 سرمی در بیماران مبتلا به سرطان معده و گروه کنترل ٨١

فهرست نمودارها

نمودار ۱-۴ نمایش فراوانی ژنوتیپ‌های GG در مقابل GT و TT..... ۷۲
نمودار ۲-۴ نمایش فراوانی ژنوتیپی TT در مقابل GT در پلی‌مورفیسم rs2171492 G>T ۷۶
نمودار ۳-۴ نمایش فراوانی آلل‌های G در مقابل T ۷۷
نمودار ۴-۴ غلظت سرمی CPA4 بر حسب ng/ml در گروه بیمار و کنترل ۶۰
نمودار۵-۴ نمودار حساسیت و اختصاصیت آنزیم CPA4 بر اساس آنالیز راکلف ۸۲

اختصارات:

ALDH1A1	Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member A1
ARMS-PCR	Amplification Refractory Mutation System-PCR
BLCA	Bladder Urothelial Cancer
CCK-8	Cell Counting Kit-8
CDH1	Cadherin 1
CI	Confidence Interval
CPA1	Carboxypeptidase A1
CPA2	Carboxypeptidase A2
CPA3	Carboxypeptidase A3
CPA4	Carboxypeptidase A4
CPB	Carboxypeptidase B
CRC	Colorectal Cancer / Colorectal Carcinoma
CYFRA21-1	Cytokeratin-19 fragments
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EBV	Epstein-Barr Virus
ELB	Erythrocyte Lysis Buffer
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EOGC	Early Onset Gastric Cancer
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
ESCC	Esophageal Squamous Cell Carcinoma
GC	Gastric Cancer
GSC	Gastric Stump Cancer
HER2/neu	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HGDC	Hereditary Diffuse Gastric Cancer

HWE	Hardy–Weinberg Equilibrium
Ki67	Antigen KI-67
LLB	Leukocyte Lysis Buffer
MALT	Mucosa-Associated Lymphoid Tissue
mRNA	Messenger RNA
NBI	Narrow Band Imaging
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer
NSE	Neuron-Specific Enolase
OR	Odds Ratio
P53	Tumor protein P53
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleic Acid
SCCA	Serum Squamous Cell Carcinoma Antigen
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SGC	Sporadic Gastric Cancer
siRNA	Small interfering RNA
SL	Staging Laparoscopy
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
STAT3	Signal Transducer And Activator Of Transcription 3
TAE	Tris-Acetic acid-EDTA
TAFI	Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor
TE	Tris/EDTA Buffer
TME	Tumor Microenvironment
TNBC	Triple Negative Breast Cancer
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor / VEGF receptor
X^2	Chi-squared test

ارتباط بین پلی‌مورفیسم ژنی و سطح سرمی آنزیم CPA4 با خطر ابتلای به سرطان معده

چکیده:

زمینه: سرطان معده دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در سراسر جهان است. با وجود اینکه پیشرفت‌های زیادی در درمان سرطان معده ایجاد شده است، نرخ بقای ۵ ساله به دلیل تمایل به تهاجم زودهنگام و متاستاز، بسیار پایین باقی مانده است. بنابراین، شناسایی بیومارکرهای کلیدی سرطان معده، که اهداف تشخیصی بالقوه سرطان معده هستند، ضروری است. کربوکسی پپتیداز A4 (CPA4)، عضوی از خانواده متالوکربوکسی پپتیدازهای حاوی روی، این آنزیم یک اگزوپپتیداز است که عمل رهاسازی اسیدهای آمینه در انتهای کربوکسیل الیگوپپتیدها را کاتالیز می کند. نقش مولکولی دقیق CPA4 نامشخص است. سوبستراهای بیولوژیکی بالقوه‌ی CPA4 شامل پپتیدهای دخیل در تکثیر و تمایز هستند.

هدف: بررسی ارتباط بین پلی‌مورفیسم ژنی و سطح سرمی آنزیم CPA4 با خطر ابتلای به سرطان معده.

مواد و روش ها: این مطالعه شامل ۱۴۰ بیمار مبتلا به سرطان معده و ۱۴۵ فرد سالم به عنوان گروه کنترل بود. سطح سرمی CPA4 شرکت کنندگان با آزمون الایزا تعیین شد و برای ارزیابی جایگزینی CPA4 Cys 303 Gly از روش PCR استفاده شد.

نتایج: سطح سرمی CPA4 ($p< 0/0001$) در بیماران به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود. فراوانی آللی جایگزینی CPA4 Cys 303 Gly در گروه مورد و شاهد تفاوت معنی‌داری داشت (OR=2.255, p-value=0.007، CI 95% = 1.074-4.733).

نتیجه گیری: نتایج مطالعات ما نشان داد که بین پلی‌مورفیسم ژنی rs2171492 و سطح سرمی آنزیم CPA4 با خطر ابتلا به سرطان معده ارتباط معناداری وجود دارد و وجود این پلی‌مورفیسم تاثیر چشمگیری بر افزایش ریسک ابتلا به سرطان معده دارد.

کلمات کلیدی: سرطان معده، CPA4، پلی مورفیسم، بیومارکر