



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوشیمی بالینی

عنوان:

بررسی پلی مورفیسم ژنی گیرنده ویتامین D و ارتباط آن با غلظت این ویتامین

در حساسیت به توپر کلوزیس

اساتید راهنما:

دکتر محمد مآذنی - دکتر محمد اصغرزاده

اساتید مشاور:

دکتر سید رضا مؤدب - دکتر مجتبی امانی

نگارش: جلیل راشدی

پائیز ۱۳۹۲

شماره پایان نامه: ۰۷

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

(تقدیم به همسر مهربان و فداکارم)

و

تقدیم به غزال کوچکم)

باسپاس فراوان از

جناب آقای دکتر محمد مآذنی

جناب آقای دکتر محمد اصغرزاده

جناب آقای دکتر سید رضا مؤدب

جناب آقای دکتر پرهام محمدی

جناب آقای دکتر محسن ارزنلو

جناب آقای دکتر سید سعید حسینی

جناب آقای دکتر مجتبی امانی

که راهنماییهای ارزنده ایشان

روشنی بخش مسیرمان شد

بررسی پلی مورفیسم ژنی گیرنده ویتامین D و ارتباط آن با غلظت این ویتامین

در حساسیت به توبرکلوزیس

چکیده

زمینه و هدف: تقریباً یک سوم جمعیت دنیا آلوده به باسیل سل می باشند، ولی بعلت تفاوت در میزان فعالیت سیستم ایمنی افراد علیه میکروارگانیزم های مهاجم، تنها در ۱۰ درصد آنها بیماری بصورت بالینی بروز می کند. متابولیسم ویتامین D و فعالیت صحیح گیرنده آن از فاکتورهای مهم تنظیمی در فعالیت سیستم ایمنی ذاتی افراد علیه باسیل سل محسوب می شوند. در مطالعه حاضر پلی مورفیسم های (*FokI, BsmI, ApaI, TaqI*) از ژن VDR و نیز ارتباط آنها با غلظت ویتامین D در حساسیت نسبت به توبرکلوزیس مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها: این مطالعه بر روی ۸۴ بیمار مبتلا به سل (۵۰ نفر مرد و ۳۴ نفر زن) و ۹۰ فرد

سالم (۴۹ نفر مرد و ۴۱ نفر زن) انجام گرفت. در پلاسمای خونی تمام افراد، غلظت ویتامین D به روش ELISA سنجیده شد. همچنین از لکوسیت های خونی، DNA استخراج شده و به کمک تکنیک PCR تکثیر ژنی انجام گرفت. سپس جهت مطالعه نواحی پلی مورفیسمی *FokI, BsmI, ApaI, TaqI* بر روی محصولات PCR پروسه RFLP اجرا گردید و سپس تجزیه و تحلیل های آماری با استفاده از برنامه نرم افزاری SPSS V.14 انجام پذیرفت.

یافته ها: در این مطالعه، ارتباط مستقیم پلی مورفیسم های *FokI, BsmI, ApaI, TaqI* در ژن VDR با

شکل فعال بیماری معنی دار نبود. بین کمبود ویتامین D ($\leq 10 \text{ ng/ml}$) و ابتلا به شکل فعال بیماری

ارتباط نزدیکی وجود داشت ($p = 0/059$). همچنین ارتباط بین غلظت ویتامین D ($\geq 20 \text{ ng/ml}$) و پلی مورفیسم ژنی *FokI-ff* در هر دو گروه سالم و بیمار بصورت ($p = 0/045$) معنی دار بود.

نتیجه گیری: بین فراوانی ژنوتیپهای ژن VDR و حساسیت نسبت به توبرکلوزیس ارتباطی وجود نداشت، لیکن وقتی این بررسی با سنجش کمی ویتامین D همراه گردید، ارتباط بصورت معنی دار بود، به گونه ای که افراد با ژنوتیپ *FokI-ff* و غلظت نرمال ویتامین D احتمالاً نسبت به شکل فعال بیماری مقاومتر بودند.

واژه های کلیدی: توبرکلوزیس، گیرنده، پلی مورفیسم، ویتامین D

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

فصل اول: طرح تحقیق

۲	۱-۱- مقدمه.....
۳	۱-۲- بیان مسأله.....
۶	۱-۳- تعریف واژه های کلیدی.....
۷	۱-۴- اهداف.....
۷	۱-۴-۱- هدف کلی.....
۷	۱-۴-۲- اهداف اختصاصی.....
۷	۱-۴-۳- اهداف کاربردی.....
۸	۱-۵- فرضیات.....

فصل دوم: کلیات و مروری بر منابع

۱۰	۲-۱- مبانی نظری.....
۱۰	۲-۱-۱- تاریخچه.....
۱۰	۲-۱-۲- انواع بالینی بیماری سل.....

۱۱.....۳-۱-۲- اصول تشخیص بیماری سل.....

۱۴.....۴-۱-۲- اصول درمان.....

۱۵.....۲-۲- مطالعات جهان.....

۱۷.....۳-۲- مطالعات ایران.....

فصل سوم: شیوه اجرایی تحقیق

۲۰.....۱-۳- نوع پژوهش.....

۲۰.....۲-۳- جمعیت مورد مطالعه.....

۲۰.....۱-۳-۲- معیار ورود به مطالعه.....

۲۰.....۲-۳-۲- معیار خروج از مطالعه.....

۲۱.....۳-۳- روش گردآوری اطلاعات.....

۲۱.....۱-۳-۳- روش کار.....

۲۱.....۱-۳-۳-۱- نمونه گیری.....

۲۱.....۲-۳-۳-۱- استخراج DNA از خون.....

۲۳.....۳-۳-۱-۳- واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR).....

۲۵.....۴-۳-۳-۱- الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگاروز.....

۲۵..... RFLP -۳-۳-۱-۵

۲۷..... ۳-۳-۱-۶- روش کار سنجش غلظت ۲۵ - هیدروکسی ویتامین D

۲۹..... ۳-۴- ملاحظات اخلاقی

۲۹..... ۳-۵- روش تجزیه و تحلیل داده ها

فصل چهارم: نتایج

۳۱..... ۴-۱- یافته ها

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

۴۳..... ۵-۱- بحث و نتیجه گیری ...

۴۵..... ۵-۲- محدودیتها

۴۶..... ۵-۳- پیشنهادات

۴۷..... منابع

۵۲..... پیوستها

۵۶..... چکیده انگلیسی

فهرست جداول و نمودارها

عنوان	صفحه
شکل ۱-۱: عملکرد ماکروفاژ در برابر باسیل سل.....	۴
جدول ۳-۱: شرایط زمانی، دمایی، توالی پرایمرها و اندازه محصولات PCR.....	۲۴
جدول ۳-۲: ترکیبات لازم جهت اجرای پروسه RFLP.....	۲۶
جدول ۳-۳: توالی های نوکلئوتیدی که توسط آنزیم ها شناسایی و شکسته می شوند.....	۲۶
جدول ۴-۱: توزیع گروه سنی در بیماران شرکت کننده در پژوهش.....	۳۱
شکل ۴-۱: نمودار توزیع جنسی بیماران شرکت کننده در پژوهش.....	۳۱
جدول ۴-۲: توزیع گروه سنی در افراد سالم شرکت کننده در پژوهش.....	۳۲
شکل ۴-۲: نمودار توزیع جنسی افراد سالم شرکت کننده در پژوهش.....	۳۲
جدول ۴-۳: ارتباط بین سن افراد شرکت کننده و ابتلا به توبرکلوزیس.....	۳۳
جدول ۴-۴: ارتباط بین جنسیت افراد شرکت کننده در این پژوهش و ابتلا به توبرکلوزیس.....	۳۳
جدول ۴-۵: ارتباط ژنوتیپهای مختلف ژن VDR با غلظت ویتامین D.....	۳۴
جدول ۴-۶: ارتباط غلظت خونی ویتامین D با توبرکلوزیس.....	۳۵
شکل ۴-۳: نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱٪.....	۳۵

شکل ۴-۴: قطعات حاصل از اثرآنزیم *BsmI* بر محصولات ۸۲۵ bp..... ۳۶

شکل ۴-۵: قطعات حاصل از اثرآنزیم *TaqI* بر محصولات ۷۴۰ bp..... ۳۷

شکل ۴-۶: قطعات حاصل از اثرآنزیم *ApaI* بر محصولات ۷۴۰ bp..... ۳۷

شکل ۴-۷: قطعات حاصل از اثرآنزیم *FokI* بر محصولات ۲۶۵ bp..... ۳۸

جدول ۴-۷: مقایسه درصد فراوانی اللی و ژنوتیپی پلی مورفیسم های ژن VDR در بیماران و افراد سالم..... ۳۹

شکل ۴-۸: نمودار توزیع میزان ۲۵- هیدروکسی ویتامین D در میان بیماران مسلول و افراد سالم..... ۴۰

جدول ۴-۸: محدوده مرجع ویتامین D در بدن انسان..... ۴۰

فهرست علائم اختصاری:

PCR: Polymerase chain reaction

DNA: Deoxyribonucleic acid

VDR: Vitamin D receptor

RFLP: Restriction fragment length polymorphism

TB: Tuberculosis bacilli

HLA: Human leucocyte antigen

NRAMP1: Natural resistance associated macrophage protein 1

TNF: Tumor necrosis factor

MBL: Mannose binding lectin

IL: Interleukin

SNP: Single nucleotide polymorphism

MDR- TB: Multi drug resistant – TB

PPD: Purified protein derivative

ELISA: Enzyme – Linked Immunosorbent Assay