



دانشگاه علوم پزشکی و  
خدمات بهداشتی درمانی استان اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت دریافت درجه دکترای حرفه ای در رشته پزشکی

**عنوان:**

بررسی وضعیت متیلاسیون ژن p16 در سرم بیماران مبتلا به سرطان معده در استان

اردبیل

**استاد راهنما:**

**دکتر سعید حسینی اصل**

**استاد مشاور:**

**دکتر محمد مآذنی**

**نگارش:**

**زهرا موسوی**

**شماره پایان نامه:**

**۰۳۳۱**

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

## فهرست مطالب

صفحه	عنوان مطالب
۱	چکیده.....
	فصل اول: طرح تحقیق
۳	۱-۱- مقدمه.....
۴	۱-۲- بیان مسئله.....
۵	۱-۳- تعریف واژه ها.....
۵	۱-۴- اهداف.....
۵	۱-۴-۱- هدف کلی.....
۵	۱-۴-۲- اهداف اختصاصی.....
۶	۱-۴-۳- هدف کاربردی.....
۶	۱-۴-۴- اهداف فرعی.....
۷	۱-۵- فرضیات.....
	فصل دوم: بررسی متون
۹	۲-۱- مبانی نظری.....
۹	۲-۱-۱- میزان بروز و اپیدمیولوژی.....
۹	۲-۱-۲- پاتولوژی.....
۱۱	۲-۱-۳- اتیولوژی.....

- ۱۳-۴-۱-۲ مورفولوژی..... ۱۳
- ۱۴-۵-۱-۲ تظاهرات بالینی..... ۱۴
- ۱۶-۶-۱-۲ تشخیص..... ۱۶
- ۱۸-۷-۱-۲ درمان..... ۱۸
- ۱۹-۲-۲ مطالعات جهان..... ۱۹
- ۲۱-۳-۲ مطالعات ایران..... ۲۱
- فصل سوم: مواد و روشها**
- ۲۳-۱-۳ نوع مطالعه..... ۲۳
- ۲۳-۲-۳ جامعه آماری، حجم نمونه..... ۲۳
- ۲۳-۳-۳ روش گردآوری اطلاعات..... ۲۳
- ۲۳-۱-۳-۳ مواد لازم..... ۲۳
- ۲۷-۲-۳-۳ وسایل مورد نیاز..... ۲۷
- ۲۸-۳-۳-۳ دستگاه‌های مورد استفاده..... ۲۸
- ۲۸-۳-۳-۴ روش کار..... ۲۸
- ۲۸-۱-۳-۳-۴ نمونه گیری:..... ۲۸
- ۲۸-۲-۳-۳-۴ استخراج DNA از سرم..... ۲۸
- ۲۹-۳-۳-۴ مراحل ( Bi-sulfate Treatment of DNA )..... ۲۹
- ۳۱-۴-۳-۳-۴ واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)..... ۳۱
- ۳۱-۵-۳-۳-۴ الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز..... ۳۱

۳۲-۳-۳-۵- ملاحظات اخلاقی..... ۳۲

۳۲-۳-۳-۶- روش تجزیه و تحلیل داده ها..... ۳۲

#### فصل چهارم: نتایج

۳۴-..... ارائه نتایج

#### فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

۴۷-۵-۱- بحث و نتیجه گیری..... ۴۷

۵۰-۵-۲- محدودیتها..... ۵۰

۵۰-۵-۳- پیشنهادات..... ۵۰

۵۱-..... منابع

۵۳-..... چکیده انگلیسی

## فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول ۱-۲ فاکتورهای خطر ساز کارسینوم معده	۱۱
جدول ۲-۲ سیستم طبقه بندی برای کارسینوم معده	۱۷
جدول ۳-۱ توالی الیگونوکلوئوتیدهای مورد استفاده در بررسیهای PCR	۲۵
جدول ۳-۲ شرایط دمایی جهت تکثیر ژن	۲۵
جدول ۴-۱ ارتباط میان جنسیت و نوع آدنوکارسینوم	۳۸
جدول ۴-۲ ارتباط میان گروه سنی و نوع آدنوکارسینوم	۳۸
جدول ۴-۳ ارتباط میان محل تومور و جنسیت	۳۹
جدول ۴-۴ ارتباط میان محل تومور و نوع آدنوکارسینوم	۴۰
جدول ۴-۵ ارتباط میان جنسیت و وجود DNA آزاد	۴۱
جدول ۴-۶ ارتباط میان گروه سنی و وجود DNA آزاد	۴۱
جدول ۴-۷ ارتباط میان نوع آدنوکارسینوم و وجود DNA آزاد	۴۲
جدول ۴-۸ ارتباط میان محل تومور و وجود DNA آزاد	۴۲
جدول ۴-۹ ارتباط میان جنسیت و وضعیت متیلاسیون P16	۴۳
جدول ۴-۱۰ ارتباط میان گروه سنی و وضعیت متیلاسیون P16	۴۳
جدول ۴-۱۱ ارتباط میان نوع آدنوکارسینوم و وضعیت متیلاسیون P16	۴۴
جدول ۴-۱۲ ارتباط میان محل تومور و وضعیت متیلاسیون P16	۴۴
جدول ۵-۱ درصد متیلاسیون P16 در نمونه های تومورال	۴۹
جدول ۵-۲ درصد متیلاسیون P16 در نمونه های سرمی	۴۹

## فهرست نمودارها

عنوان	صفحه
شکل ۱-۴ توزیع گروه سنی در بیماران شرکت کننده در پژوهش.....	۳۵
شکل ۲-۴ توزیع جنسی بیماران شرکت کننده در پژوهش.....	۳۵
شکل ۳-۴ فراوانی انواع آدنوکارسینومای معده در بیماران مبتلا.....	۳۶
شکل ۴-۴ توزیع محل تومور در بیماران شرکت کننده در پژوهش.....	۳۶
شکل ۵-۴ فراوانی DNA آزاد در سرم بیماران مورد مطالعه.....	۳۷
شکل ۶-۴ فراوانی متیلاسیون پروموتور ژن P16 در سرمهای واجد DNA آزاد.....	۳۷
شکل ۷-۴ نمونه های الکتروفورز شده از محصول نهایی MS-PCR ژن P16.....	۴۵

## چکیده:

**مقدمه و هدف:** سرطان معده، دومین علت مرگ ناشی از سرطان در دنیاست که شیوع جغرافیایی بسیار متفاوتی دارد. با وجودی که در بسیاری از کشورهای جهان، روند کاهشی در شیوع کلی مرگ و میر ناشی از سرطان معده وجود دارد، با این حال سرطان معده به عنوان یکی از عوامل کشنده اصلی در میان سرطان ها باقی مانده است. شواهد زیادی وجود دارد که سرطان معده نتیجه ی تغییرات ژنتیکی و اپی ژنیک متعدد بر روی انکوژن ها، ژنهای سرکوب کننده ی تومور، ژنهای ترمیم کننده ی DNA و مولکولهای چسبندگی سلولی است.

این مطالعه، بررسی وضعیت هایپرمتیلاسیون در ژن P16 به عنوان ژن سرکوب کننده ی تومور در بیماران مبتلا به سرطان معده در استان اردبیل با هدف دستیابی به یک فاکتور پیش آگهی جهت تشخیص زودرس تومور معده است.

**مواد و روش ها:** از ۸۲ بیمار مبتلا به سرطان معده ی مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی (ره) (کلینیک ارس) که بیماری آنها از نظر پاتولوژی تأیید شده بود، نمونه خون گرفته شد. جداسازی سرم از خون توسط سانتریفیوژ انجام شد. نمونه های سرم جهت استخراج DNA و انجام روشهای مولکولی به آزمایشگاه ژنتیک بیمارستان امام خمینی (ره) انتقال یافت. پس از استخراج DNA سرمی و مواجهه با بی سولفات، توسط روشهای PCR مختص متیلاسیون (MS-PCR)، وجود هایپرمتیلاسیون در پروموتور ژن P16 بررسی شد.

**نتایج:** پس از بررسی DNA مربوط به ژن P16 در سرم افراد مبتلا مشخص گردید که این DNA در ۵۹/۸٪ از آنها وجود دارد که از میان آنها ۲۰٪ هیپرمتیله بودند پس از بررسی داده ها ارتباط میان نوع آدنوکارسینوم و وضعیت متیلاسیون p16 معنی دار بوده است. در بررسی سایر داده ها هیچ گونه ارتباط آماری معنی داری میان وضعیت متیلاسیون ژن P16 با سایر داده ها شامل جنسیت، گروه سنی و محل تومور وجود نداشت.

**نتیجه گیری:** با توجه به یافته های این آزمایش، می توان در درصدی از بیماران، پزشک معالج را در تشخیص پیش رس سرطان معده یاری نمود.

البته افق های بعدی این طرح، بررسی کمی متیلاسیون در سرم می باشد تا شاید به داده هایی پر ارزشتر و یا ارتباطاتی معنی دار پی برده شود.

**واژه های کلیدی:** سرطان معده، هایپرمتیلاسیون، P16، MS-PCR، اردبیل



فصل اول :

طرح تحقیق

## ۱-۱- مقدمه

سرطان معده دومین علت مرگ ناشی از سرطان در دنیا است که شیوع جغرافیایی بسیار متفاوت دارد (۱). به دلایل ناشناخته، میزان مرگ و میر ناشی از سرطان معده در ۷۵ سال گذشته به طور چشمگیری کاهش پیدا کرده است. با این حال، ۲۱۲۶۰ مورد جدید از سرطان معده در سال ۲۰۰۷ در ایالات متحده تشخیص داده شده و ۱۱۲۱۰ آمریکایی به دلیل ابتلا به سرطان معده جان خود را از دست داده اند (۲).

بر اساس مطالعات انجام شده در کشورمان، توسط وزارت بهداشت و درمان، مشخص شده است که آدنوکارسینوم معده، کشنده ترین سرطان در ایران است که تفاوت زیادی در میزان مرگ و میر در استان های مختلف وجود دارد. بر اساس این مطالعات، استان اردبیل بالا ترین میزان شیوع سرطان معده را در ایران دارا می باشد (۳).

شواهد زیادی وجود دارد که سرطان معده نتیجه ی تغییرات ژنتیکی و اپی ژنیک متعدد بر روی انکوژن ها، ژنهای سرکوب کننده ی تومور، ژنهای ترمیم کننده ی DNA و مولکولهای چسبندگی سلولی است (۴).

## ۱-۲- بیان مسئله:

با وجودی که در بسیاری از کشورهای جهان، روند کاهشی در شیوع کلی و مرگ و میر ناشی از سرطان معده وجود دارد، با این حال سرطان معده به عنوان یکی از عوامل کشنده اصلی در میان سرطان ها باقی مانده است. میزان بقای ۵ ساله ی در حدود ۲۰٪، دلیلی برای این مطلب است. این سرطان مسئول ۲٪ تمامی مرگ های ناشی از سرطان در ایالات متحده است ( ۱ ) .

به دلایل نامعلوم، شیوع آمار مرگ و میر ناشی از سرطان معده در ایالات متحده کاهش پیدا کرده است، به طوریکه در مردان از ۲۸ نفر در هر صد هزار نفر به ۵/۸ در هر صد هزار نفر رسیده است و این آمار در زنان از ۲۷ نفر در هر صد هزار نفر به ۲/۸ نفر در هر صد هزار نفر کاهش پیدا کرده است. با این حال ۲۱۲۶۰ مورد جدید از سرطان معده در سال ۲۰۰۷ تشخیص داده شده است و ۱۱۲۱۰ آمریکایی در اثر این بیماری جان خود را از دست داده اند ( ۲ ) .

بر اساس مطالعات انجام شده در ایران، در استان اردبیل سرطان معده شایعترین سرطان در مردان ( ۱/۴۹٪ ) همچنین شایعترین سرطان در زنان ( ۴/۲۵٪ ) بوده است ( ۵ ) .

شواهد فراوانی به این موضوع دلالت می کند که سرطان معده نتیجه ی تغییرات ژنتیکی و اپی ژنیک انکوژن ها، ژنهای سرکوب کننده ی تومور، ژن های ترمیم کننده ی DNA، تنظیم کننده های چرخه سلولی و مولکول های چسبندگی سلولی می باشد ( ۴ ) .

p16 (مهار کننده پروتئین کیناز وابسته به cyclin-D) یک ژن سرکوب کننده تومور بوده و حذف و جهش آن در تومور های مختلفی گزارش شده است ( ۶ ) . ژن p16 تنظیم کننده چرخه سلولی بوده که با مهار عملکرد پروتئین کیناز ۴ و ۶ وابسته cyclin-D باعث القای توقف چرخه سلولی در مرحله G<sub>1</sub>