





دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر

دانشکده علوم پایه

پایان نامه برای دریافت درجه ی کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی سلولی و مولکولی (M.Sc.)

گرایش ژنتیک

عنوان:

**بررسی ارتباط بین پلی مورفسم G/C pre-mir-146a و خطر ابتلا
به سرطان معده در بیماران مبتلا به سرطان معده در استان اردبیل**

استاد راهنما :

دکتر سید سعید حسینی اصل

استاد مشاور:

دکتر سید علی رحمانی

نگارش :

روح الله مرادپور حصاری

تابستان ۱۳۹۳

تقدیم به :

ساحت مقدس حضرت ولیعصر

تقدیم به :

پدرم

تقدیم به :

مادر مهربان و عزیز تر از جانم

که با مهربانه ترین نغمه های عشق به من طریق فکرت آموخت.

تقدیم به :

روح والای پدر زن عزیز و مادر زن مهربانم

تقدیم به :

همسر دلسوزم

خانم مهشید دمندان که در لحظه به لحظه درس و زندگی همیار و همکار من بود

تقدیم به :

یگانه دخترم

" سلنا "

و دسترنج استاد چراغ هدایت انسان اد

با سپاس از اساتید گرانقدرم

جناب آقای دکتر سید سعید حسینی اصل

جناب آقای دکتر سید علی رحمانی

سرکار خانم دکتر فائقه صادقی

که با روح والایشان به من طریقت علم

و

فراتر از فکرتشان طریق غواصی در دریای بیکران دانش

و

با روح و جسم مهربانشان روش دست گیری از بیماران را آموختند.

"بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم pre-mir-146a G/C و خطر سرطان معده در بیماران مبتلا به سرطان معده در استان اردبیل"

چکیده :

اهداف:

میکرو RNAها زیر گروه بزرگی از RNA های غیرکد کننده ۱۸-۲۵ نوکلئوتیدی هستند که از نظر تکاملی حفاظت شده می باشند (۵). پلی مورفیسم در Mir-RNA -146a ی انسانی اخیراً در سرطان مشاهده شده است. ما در مطالعه ای، ارتباط بین پلی مورفیسم Mir-RNA -146a G/C و خطر سرطان معده را بررسی کردیم. سرطان معده اغلب در ایران رایج است؛ بویژه در استان اردبیل از شیوع بالایی برخوردار است. نوع رایجی از پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی واریانتهای ژنتیکی در ژنوم انسان، پلی مورفیسم موجود در ژنوم pre-Mir-RNA انسانی است که کارایی سلول هدف را در mi-RNA تغییر میدهد، همچنین در تنظیم چرخه سلولی نیز نقش دارد، بنابراین نقش بحرانی را در سرطانزایی بازی میکند. Mir-RNA -146a طراحی شده با rs-2910164 بر روی کروموزوم ۵ انسان واقع شده است.

مواد و روش :

ما یک مطالعه مورد - شاهد بیمارستانی را با استفاده از روش RFLP-PCR انجام دادیم (۵۰ بیمار مبتلا به سرطان معده و ۵۰ فرد غیر مبتلا به سرطان معده). قطعه تکثیری ۱۴۷ جفت بازی بوسیله آنزیم Sac1 هضم شد. قطعه بدون برش توسط آنزیم، شامل ال ال G است. در جایگزینی ال ال C بجای ال ال G، تمایل به ایجاد یک جایگاه برش برای آنزیم Sac1 وجود دارد. بنابراین محصولات هضم شده با باندهای 122bp و 25bp مشاهده میشوند. اگر مقدار آنزیم مورد استفاده کافی نباشد، هموزیگوت ممکن است به شکل هتروزیگوت بنظر برسد، بنابراین تعدادی از نمونه های توالی یابی شده، برای ارزیابی صحت هضم آنزیمی انتخاب شده بودند. همه آنالیزهای آماری با نرم افزار spss انجام شد.

نتایج :

فراوانی ژنوتیپهای CC, GC, و GG بصورت ۱۸٪، ۳۴٪ و ۴۸٪ در میان بیماران و ۶٪، ۲۸٪ و ۶۶٪ در میان نمونه های کنترل بودند. فراوانی ژنوتیپ های Mir-RNA 146a در گروههای مورد، تا اندازه ای متفاوت از گروه کنترل ۱۸٪ در مقابل ۶٪ بود. (P-value =0.038) یعنی کمتر از ۰/۰۵ بوده و ژنوتیپ CC در بیماران به همراه شیوع سرطان معده از نظر آماری معنادار بود.

بحث و نتیجه گیری:

در این مطالعه بین پلی مورفیسم Mir 146a G/C و خطر سرطان معده در استان اردبیل ارتباط معنا دار آماری پیدا شد.

واژگان کلیدی: سرطان معده، میکروآران.ای ۱۴۶، پلی مورفیسم.

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

فصل اول: کلیات تحقیق

۲	بیان مساله
۳	۲-۱- ضرورت انجام تحقیق
۴	۳-۱- اهداف
۵	۴-۱- تعریف متغیرها
۵	۵-۱- پیش فرض های پژوهش
۶	۶-۱- تعریف اصطلاحات

فصل دوم: مبانی نظری و پیشینه تحقیق

۸	۱-۲- مبانی نظری
۹	۲-۲- RNA سرطان
۱۰	۲-۲-۱- علت شناسی سرطان
۱۰	۳-۲- آناتومی معده
۱۳	۳-۲-۱- انواع سرطان
۱۴	۳-۲-۲- سرطان معده
۱۵	۳-۳-۲- علایم سرطان معده
۱۵	۴-۳-۲- پیشرفت سرطان معده
۱۶	۳-۲-۵- انواع سرطان معده
۱۸	۳-۲-۶- علل سرطان معده
۲۳	۴-۲- آنکو میرها
۲۵	۲-۴-۱- بیوژنز میکرو RNA و مهار ترجمه:

۲-۵-مطالعات درجهان ۲۷

۲-۵-مطالعات درایران ۲۸

فصل سوم:مواد و روشها

۳-۱- نوع مطالعه: ۳۰

۳-۲- جامعه آماری و حجم نمونه:..... ۳۰

۳-۲-۱- جامعه آماری:..... ۳۰

۳-۲-۲- حجم نمونه: ۳۰

۳-۳-۱- روش گرد آوری اطلاعات: ۳۰

۳-۳-۱-۱- مواد لازم برای استخراج DNA: ۳۱

۳-۳-۱-۲- مواد لازم برای انجام PCR: ۳۱

۳-۳-۲- وسایل مورد نیاز: ۳۴

۳-۳-۱-۲- وسایل مورد نیاز برای ذخیره و جمع آوری نمونه ها: ۳۶

۳-۳-۲-۲- وسایل لازم جهت انجام واکنش PCR: ۳۶

۳-۳-۲-۳- مواد و وسایل لازم جهت تهیه ژل آگارز 1درصد: ۳۷

۳-۳-۲-۴- دستگاہهای مورد استفاده ۳۷

۳-۳-۳- روش کار و تحقیق ۳۸

۳-۳-۳-۱- نمونه گیری:..... ۳۸

۳-۳-۳-۲- استخراج DNA از 3 میلی لیتر خون محیطی:..... ۳۸

۳-۳-۳-۱- واکنش زنجیره ای پلیمرز PCR: ۴۲

۳-۳-۳-۲- کاربردهای PCR: ۴۵

۳-۳-۳-۳- کینتیک واکنش PCR:..... ۴۷

۳-۳-۳-۴- اجزای تشکیل دهنده واکنش PCR:..... ۴۸

۳-۳-۳-۵- دستورالعمل (پروتکل):..... ۵۰

۳-۳-۳-۶- الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز: ۵۲

۵۴:pcr تقویت اختصاصیت ۷-۴-۳-۳
۵۵:Trouble shooting ۸-۴-۳-۳
۵۵:pcr پرایمر ۵-۳-۳
۵۶: عوامل مهم در طراحی پرایمر: ۱-۵-۳-۳
۵۷:Primer Blast طراحی پرایمر توسط ۲-۵-۳-۳
۵۸: آنزیم های محدود الاثر: ۶-۳-۳
۶۱: RFLP-PCR روش ۱-۶-۳-۳
۶۳: روش تجزیه و تحلیل داده ها ۷-۳-۳
۶۳: محدودیتها ۸-۳-۳
۶۳: ملاحظات اخلاقی ۹-۳-۳

فصل چهارم: نتایج

۶۵:ارائه نتایج: ۱-۴
----	------------------------

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

۷۷:ارائه بحث و نتیجه گیری: ۱-۵
۸۳:پیشنهادات ۲-۵
۸۴:فهرست منابع فارسی: ۱-۵
۸۵:فهرست منابع انگلیسی: ۲-۵
۸۶:چکیده انگلیسی: ۳-۵

فهرست جدول ها

عنوان	صفحه
جدول ۱-۱- عنوان ، نقش، نوع و ابزارسنجش متغیرها	۵.....
جدول ۱-۳- توالی الیگونوکلئوتیدی مورد استفاده در PCR استاندارد	۳۲.....
جدول ۲-۳- کد گذاری الی الی های G/C پلی مورفیسم Mir-146a پس از PCR استاندارد.	۳۲.....
جدول ۳-۳- نمای شماتیک از تعداد، زمان و دمای انجام واکنش PCR.	۳۲.....
جدول ۱-۴- ویژگیهای سن و جنس گروه مورد و گروه کنترل	۷۶.....
جدول ۲-۴- توزیع ژنوتیپی ژن hsa-Mir-146a در مورد- شاهد و تخمین خطر واریانته های ژنوتیپی.	۷۷.

فهرست نمودار ها

- نمودار ۴-۱- توزیع سنی در گروه بیماران شرکت کننده در این پژوهش ۷۰
- نمودار ۴-۲- توزیع جنسی در گروه بیماران شرکت کننده در این پژوهش ۷۱
- نمودار ۴-۳- توزیع جنسی در گروه شاهد شرکت کننده در این پژوهش ۷۲
- نمودار ۴-۴- توزیع فراوانی ژنوتیپ GG و GC و CC در میان گروه بیماران ۷۳
- نمودار ۴-۵- توزیع فراوانی ژنوتیپ GG و GC و CC در میان گروه کنترل ۷۴

فهرست شکل ها

- شکل ۱-۲- آناتومی ساختمان معده ۱۰
- شکل ۲-۲- دیاگرام مکان کروموزومی hsa-Mir-146a روی کروموزوم ۱۵ نسان ۱۹
- شکل ۳-۲- مدل بیوژنز میکرو RNA و نحوه عملکرد آن ۲۶
- شکل ۱-۳- میکروتیوب های باکس DNA مارکر ۲۸
- شکل ۲-۳- دستگاه دستگاه مولد نور ماورا بنفش ۲۸
- شکل ۳-۳- دستگاه میکرو سانتریفیوژ ۲۹
- شکل ۴-۳- دستگاه ترموسایکلر ۲۹
- شکل ۵-۳- مدلی از سمپلر و تعدادی سر سمپلر ۳۰
- شکل ۶-۳- میکروتیوب ۳۰
- شکل ۷-۳- تانک الکتروفورز افقی ۳۱
- شکل ۸-۳- مراحل مختلف واکنش زنجیره ای پلی مرز ۳۵
- شکل ۹-۳- نمای شماتیک از باکس مربوط به میکروتیوب های پرایمر ۴۲
- شکل ۱-۴- نمونه های الکتروفورز شده از محصول نهایی PCR با ژنوتیپ GG به صورت unCut-unCut بر روی ژل آگارز 1٪ ۶۷
- شکل ۲-۴- نمونه های الکتروفورز شده از محصول نهایی RFLP-PCR با ژنوتیپ CC به صورت Cut-Cut با آنزیم sac1 بر روی ژل آگارز 3٪ ۶۸
- شکل ۳-۴- نمونه های الکتروفورز شده از محصول نهایی RFLP-PCR با ژنوتیپ GC به صورت Cut- unCut با آنزیم sac1 بر روی ژل آگارز 3٪ ۶۹

فصل اول

کلیات تحقیق

۱-۱- بیان مسأله :

- سرطان معده ، اغلب چهارمین سرطان رایج و دومین علت مرگ و میر در جهان است. اخیراً این روند بیماری در کشورهای غربی و در جمعیت کشور ژاپن کاهش یافته است. دلیل آن واضح نیست ، اما می تواند به علت تکنیکهای محافظتی و انجماد مناسب مواد غذایی باشد . از فاکتورهای دیگر، وضعیت مناسب تغذیه و دسترسی کافی به میوه جات و سبزیجات تازه است . تنوع وسیعی در مورد ابتلا به سرطان معده در مناطق مختلف جغرافیایی وجود دارد . بالاترین ریسک ابتلا به سرطان معده با بیش از ۲۰ نفر از هر ۱۰۰/۰۰۰ نفر در مردان ؛ در کشورهای ژاپن ، کره ، چین ، شیلی ، کاستاریکا و برزیل دیده میشود و حد متوسط ابتلا به سرطان معده بین ۱۰ تا ۲۰ نفر، در کشورهای ایتالیا، اکراین ، آلمان ، هلند و ترکیه بوده و کمترین ریسک ابتلا به کمتر از ۱۰ نفر ، مربوط به کشورهای امریکا ، کانادا ، سوئد ، دانمارک ، مصر ، هند و استرالیاست. در ایران ، در مناطق شمالی و شمال غربی ، بالاترین ریسک ابتلا به سرطان معده را داریم. اردبیل ، که یک استان در شمال غربی ایران است، بالاترین شیوع سرطان معده در ایران، در بین زنان و مردان را دارد. این موضوع حائز اهمیت است که میزان شیوع بالای سرطان معده در اردبیل ، منجر به میزان بالای سرطان دهانه معده (gastric-cardia) نسبت به سرطان نواحی دیگر معده است. البته میزان شیوع سرطان نواحی

دیگر معده (non-cardia) نسبت به (cardia cancer) در خوزستان و جنوب غربی ایران به میزان ۸۵ درصد، بیشتر از شمال غربی ایران بویژه، استان اردبیل است (۱). سرطان معده، یک بیماری مولتی فاکتوریال و توسعه یافته است که در نتیجه آسیبهای سلولی مداوم ایجاد میشود (۲). این سرطان مثل سایر سرطان ها، با جهش های ژنتیکی ایجاد می شود؛ اما عوامل خارجی نیز بر عملکرد ژنها تأثیر می گذارند. این عوامل خارجی "تغییرات اپی ژنتیک" نامیده می شوند که توسط متیلاسیون DNA ایجاد می گردند (۳).

۱-۲- ضرورت انجام تحقیق :

برای روشن شدن مکانیسم های تنظیمی بیوژنز میکرو RNA ها و نقش آنها در سرطان معده، به تحقیقات بیشتری نیاز است. تشخیص مولکولهای هدف میکرو RNA ها و بررسی اثرات تداخلی مولکولی آنها در مسیرهای انتقال پیام، به درک بهتر مکانیسم سرطان کمک خواهد کرد. با در نظر گرفتن این واقعیت که اغلب روشهای رایج برای غربالگری سرطان معده در مراحل اولیه قادر به تشخیص بیماری نمی باشند، لذا شناسایی میکرو RNA های توموری که طی پیشرفت تدریجی بیماری در جریان خون منتشر می شوند، روش کلیدی در تشخیص به موقع سرطان معده محسوب می شود؛ علاوه بر این، میکرو RNA ها در درمان سرطان نیز مورد استفاده قرار می گیرند و با ایجاد تغییرات مؤثر در این مولکولها، می توان بر مولکولهای هدف آنها تأثیر گذاشت، البته موانع و مشکلاتی نیز در این رابطه وجود دارد. از جمله اینکه، یک میکرو RNA می تواند بیان تعداد زیادی ژن هدف را کنترل کند، لذا تغییر یا چندشکلی در آن می تواند باعث هدف قرار دادن ژنهایی به غیر از ژن های هدف اصلی شود. از سوی دیگر، یک ژن منفرد ممکن است توسط چند میکرو RNA کنترل شود، پس بنابراین باید دانست که آیا جایگزینی C به جای G در

توالی ژن mir-146a می تواند کاندیدی برای افزایش خطر ابتلا به سرطان معده باشد یا نه؟

۱-۳- اهداف:

اهداف علمی:

تعیین چند ریختی *mir-146a* و ارتباط آن با خطر ابتلا به سرطان معده.

اهداف کاربردی:

استفاده از پلی مورفیسم در توالی *mir-146a* در مبتلایان به سرطان معده، به عنوان یک فاکتور پیش آگهی .

۱-۴- متغیرها:

- تغییر نسخه های توالی های کد کننده ی *mir-146a*

- چند ریختی تک نوکلئوتیدی C به جای G رخ داده در توالی *mir-146a* .

- متغیرهای GG و CC و GC و GG+GC و CC+GC که به صورت جداگانه بررسی می شوند.

جدول ۱-۱- عنوان، نقش، نوع و ابزار سنجش متغیرها

ابزار سنجش متغیر:	متغیرها از نظر نوع:				متغیرها از نظر نقش آنها در تحقیق:		عنوان متغیر
	کیفی		کمی		وابسته	مستقل	
	اسمی	رتبه‌ای	گسسته	پیوسته			
روش مولکولی: RFLP-PCR	✓					✓	الل G/C Mir-146a
مطالعات پاتولوژی	✓				✓		میزان پیشرفت سرطان معده

۱-۵- پیش فرض های پژوهش :

وجود ژنوتیپ CC در توالی چند ریختی موجود در mir-146a ، با احتمال خطر سرطان معده در استان اردبیل ارتباط دارد .