دانشگاه علوم پزشکی و
خدمات بهداشتی درمانی استان اردبیل

وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد بیوشیمی‌بالینی

عنوان:

بررسی مقایسه‌ای سطوح سرمی پروتئین p_{53} و عوامل خطرزای تغذیه‌ای درژنوتیپ‌های مختلف هاپتوگلوبین در بیماران مبتلا به سرطان مری و افراد سالم در استان گلستان

اساتید راهنما:

دکتر رضا علی پناه مقدم

دکتر علی نعمتی

استاد مشاور:

دکتر تقی امیریانی

نگارش:

سارا حسین زاده

سال تحصیلی ۱۳۹٤

سپاس خدایی را که ستایشگران نمی‌توانند حق سپاسش را ادا کنند و حسابگران از شمارش نعمت‌های بی‌پایانش عاجزند و تلاشگران در ادای حقش فرومانند.
خدایی که افکار بلند به قله عظمتش دست نیابند و ژرف نگران به عمق ذاتش پی نبرند.
خدایی که نه کلام گنجایش تعریفش را دارد و نه زمان فرصت شمارشش را.
بر خود واجب می‌دانم تا از زحمات خانواده گرامی‌و کلیه کسانیکه در دوران تحصیل همواره مشوق و پشتیبان اینجانب بوده‌اند کمال تشکر و قدردانی را داشته باشم.

با تقدیر و تشکر فراوان از:

۱) تمام بیمارانی که با پذیرش مشارکت و همکاری، انجام این مطالعه را امکان پذیر نمودند.
۲) استاد راهنمای گرانقدرم جناب آقای دکتر رضا علی پناه مقدم و جناب آقای دکتر علی نعمتی و استاد مشاور محترم جناب آقای دکتر تقی امیریانی که با راهنمائی هایشان در تمام مراحل انجام مطالعه از تکمیل پرسشنامه‌ها گرفته تا انجام تحقیق و نهایتاً تدوین و تنظیم پایان نامه قدم به قدم راهگشا بودند.
۳) کارکنان مراکز درمانی بیمارستان صیاد شیرازی و کلینیک فوق تخصصی دزیانی گرگان
۴) آقایان دکتر رضا خاندوزی، دکتر غراوی که در انجام مراحل مختلف این پایان نامه ما را یاری و همراهی نمودند.

با تشکر از جناب آقای محمد آریایی که در انجام این کار همکاری کردند. با تشکر از دوستان خوبم به‌خصوص خانم‌ها سمیرا محمودی نیا، ناهید پورشریفی، سمیه حسینی، کر و پرسنل محترم آزمایشگاه آقای نوروزی که در انجام کارهای آزمایشگاهی کمال همکاری را مبذول فرمودند و از کمک و همفکری شان بهره‌های فراوان بردم، بی‌نهایت متشکر و قدردانم.

چکیده:

مقدمه: سرطان مری سومین سرطان شایع دستگاه گوارشی در سطح دنیا می‌باشد. فاکتورهای خطر سرطان مری شامل عوامل محیطی و بیولوژیکی و ژنتیکی بوده و عوامل محیطی از طریق افزایش استرس اکسیداتیو در ایجاد آن نقش دارند. یکی از پروتئین‌های سرمی مقابله کننده با استرس اکسیداتیو هاپتوگلوبین است. نشان داده شده که پروتئین p53 در جلوگیری از ایجاد تومور نقش مهمی‌دارد. مطالعه حاضر با هدف ارتباط عوامل خطرزای تغذیه‌ای و سطوح سرمی‌پروتئینp53 با ژنوتیپ‌های مختلف هاپتوگلوبین انجام گردید.

مواد و روش کار: در یک مطالعه مورد–شاهدی پس از تکمیل رضایت نامه ٤٤ فرد مبتلا به سرطان مری (گروه مورد) بعد از تشخیص سرطان مری و ٤٤ فرد سالم (گروه کنترل) از اسفند سال سال ۹۲ به مدت یک سال از دو بیمارستان صیاد شیرازی و کلینیک دزیانی شهرستان گرگان برای مطالعه انتخاب گردیدند. بعد از ثبت فاکتورهای آنتروپومتریک، اطلاعات دموگرافیک و غذائی به ترتیب توسط پرسشنامه‌های عمومی و بسامد غذایی جمع آوری شدند. نمونه‌های خونی از آنها برای اندازه گیری سطو ح سرمی پروتئین p53، MDA و نیترات و تعیین پلی مورفیسم هاپتوگلوبین اندازه گیری شدند. نتایج توسط آزمون‌های آماری توصیفی، تی مستقل، ANOVA و کای دو مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج: نتایج نشان داد که بین پلی مورفیسم هاپتوگلوبین و سرطان مری ارتباط معنی‌داری وجود دارد (p<۰/۰۵). در گروه مورد ژنوتیپ HP1-1 و در گروه کنترل ژنوتیپ HP2-2 بیشترین فراوانی را داشت. میانگین سطوح سرمی MDA در گروه مورد از نظر آماری بیشتر از گروه کنترل بود (p<۰/۰۵) (٦/٤٣±۰/۰۱nmol/ml در مقابل ٤/۰۸±۰/۱nmol/ml)، در صورتی سطوح سرمی نیترات در گروه مورد کمتر از گروه کنترل بود (p<۰/۰۵) (٤/٦٤±۰/۷۸ µmol در مقابل ۱۱/۱۵±۱/٤۲ µmol). با این که سطوح سرمی پروتئین p53 در گروه مورد کمتر از گروه کنترل بود این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود (۳۳/۳٦±۳/۸۹Pg/ml در مقابل۷/۱۸Pg/ml± ٤۰/۱۳). بیشتر بیماران مبتلا به سرطان مری از نظر تحصیلات در سطح بسیار پائینی (بی‌سواد) قرار داشتند. مصرف نمک، سیگار و قلیان در این بیماران از نظر آماری بیشتر از گروه کنترل بود(p<۰/۰۵). نتایج براساس عادات تغذیه‌ائی نشان داد که مصرف نان، برنج، سوسیس، کالباس، روغن جامد، چائی داغ، حبوبات و نوشابه‌های صنعتی در گروه بیماران از نظر آماری بیشتر و مصرف سبزیجات و میوه جات کمتر از گروه کنترل بود(p<۰/۰۵).

نتیجه گیری: نتایج مطالعه اخیر نشان داد که علاوه بر دارا بودن رابطه معنی‌داری بین پلی مورفیسم هاپتوگلوبین و سرطان مری و غیر معنی‌دار سطوح سرمی پروتئین p53 بین دو گروه، افزایش سطوح سرمی شاخص استرس اکسیداتیو، مصرف چائی داغ، غذای پرنمک، غذاهای حاوی نیترات و کاهش مصرف سبزیجات و میوه جات تازه را احتمالا بتوان بعنوان فاکتورهای خطرزای سرطان مری در نظر گرفت.

کلمات کلیدی: سرطان مری، استرس اکسیداتیو، هاپتوگلوبین، پروتئین p53، عوامل تغذیه ای، گرگان

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

چکیده

فصل اول : طرح تحقیق

۱-۱-مقدمه ۱

۱-۲- بیان مسئله ۱

۱-۳- اهداف و فرضیات و سوالات اساسی تحقیق ۳

۱-۳-۱ -هدف اصلی ۳

۱-۳-۲- اهداف اختصاصی ۴

۱-۳-۳- سئوالات تحقیق ۴

۱-۳-۴- اهداف کاربردی ۵

۱-۳-۵- تعریف واژه ۵

فصل دوم : بررسی متون ٦

۲-۱- بررسی متون ۷

۲-۱-۱-تعریف سرطان مری ۷

۲-۱-۲- انواع سرطان مری ۷

۲-۱-۳- مراحل پیشرفت و وضعیت آناتومیکی سرطان مری ۸

۲-۱-۴- پاتولوژی سرطان مری ۹

۲-۱-۵- بافت شناسیسرطان مری: ۹

۲-۱-۶- میزان شیوع انواع سرطان مری درجهان ۹

۲-۱-۷-میزان شیوع انواع سرطان مری در ایران ۱۰

۲-۱-۸- آمار سرطان مری در ایران ۱۰

۲-۱-۹- عوامل مؤثر در بروز سرطان سلول‌های سنگفرشی مری در استان گلستان ۱۱

۲-۱-۱۰-هیدروکربن‌های آروماتیک پلی سیکلیک (PAH): ۱۴

۲-۱-۱۱-ترکیبات N- nitroso : ۱۴

۲-۱-۱۲- نقش عوامل ژنتیکی در ایجاد سرطان سنگفرشی مری: ۱۵

۲-۱-۱۳- مکانیسم ایجاد سرطان مری ۱۶

عنوان	صفحه

۲-۱-۱۴-روشهای تشخیص سرطان مری: ۱۷
۲-۱-۱۵- چرخه سلولی ۱۸
۲-۱-۱۶-ژن سرکوبگر تومور P53 ..... ۲۰
۲-۱-۱۷-هاپتوگلوبین ۲۲
۲-۱-۱۸- رفتارهای تغذیه ای ۲۳
۲-۱-۱۹-استرس اکسیداتیو ۲۵
۲-۲-بررسی متون ۲۶

فصل سوم: شیوه اجرای طرح ۲۹
۳-۱-جدول متغیرها ۳۰
۳-۱-نوع مطالعه ۳۰
۳-۲-تعیین حجم نمونه ۳۰
۳-۳- مراحل نمونه‌گیری ۳۱
۳-۳-۱-اندازه گیری‌های تن سنجی(آنتروپومتریک): ۳۲
۲-۳-۲-بررسی غذائی ۳۲
۳-۴-معیارهای ورود ۳۲
۳-۵-معیارهای خروج ۳۳
۳-۶- ملاحظات اخلاقی ۳۳
۳-۷-مکان و زمان انجام مطالعه ۳۳
۳-۸-اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید ۳۳
۳-۸-۱-محلول سازی: ۳۴
۳-۸-۲ - روش کار ۳٤
۳-۹-اندازه گیری p53 به روش الایزا ۳۵
۳-۹-۱-محلول سازی ۳۶
۳-۹-۲-روش اجرا ۳۷
۳-۱۰-اندازه گیری نیترات به روش کالریمتریک ۳۹
۳-۱۰-۱ -محلول سازی ۴۰
۳-۱۰-۲- روش اجرا ۴۳

عنوان	صفحه

۳-۱۰-۳-اندازه گیری نیتریت نمونه‌ها ۴۴
۳-۱۱-استخراج DNA ٤٦
۳-۱۱-۱- تعیین غلظت DNA تخلیص شده ۴۸
۳-۱۲-آماده سازی پرایمرها ٤٩
۳-۱۲-۱-طرز تهیه Master Mix 1.5 ..... ۵۱
۳-۱۲-۲- طرزتهیه محلول PCR برای تعیین فنوتیپ هاپتوگلوبین ۵۱
۳-۱۲-۳- برنامه PCR برای تعیین فنوتیپ هاپتوگلوبین ۵۲
۳-۱۲-۴-بررسی نتایج PCR فنوتیپ هاپتوگلوبین توسط الکتروفورز ۵۲
۳-۱۲-۵- آنالیز محصولPCR هاپتوگلوبین توسط آنزیم‌های محدودالاثر ۵۵
۳-۱۲-۶-PCR-RFLP با استفاده از آنزیم Fast Digest Dra I ۵۵
۳-۱۲-۷- الکتروفورزمحصولPCR-RFLP باآنزیم Fast Digest Dra I ۵۶
۳-۱۲-۸-PCR-RFLP با استفاده ازآنزیمMls I ۵۷
۳-۱۲-۹- الکتروفورزمحصولPCR-RFLP باآنزیم Mls I ۵۸

فصل چهارم: نتایج ۵۹
۴-۱ - نتایج دموگرافیک ٦٠
۴-۱- ۱- توصیف جامعه مورد مطالعه ۶۰
۴-۲-نتایج بسامد غذائی مصرفی ٦٤
۴-۳-نتایج بیوشیمایی ٦٨

فصل پنجم: بحث ۷۹
۵-۱ فاکتورهای بیوشیمیائی ۸۰
۵-۲ دموگرافیک و آنتروپومتریک ۸٤
۵-۳- فاکتورهای غذائی ۸٦
۵-۴-نتیجه گیری ۸۸
۵-۵-محدودیت ۸۹
۵-۶-پیشنهادات ۸۹
۵-۷-منابع ۹۰
Abstract: ۱۰۰

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول شماره۱-۴. عوامل مؤثر در بروز سرطان سلولهای سنگفرشی مری در استان گلستان به ترتیب اهمیت(۳۵) ۱۲
جدول شماره۱-۵. عوامل خطر سرطان مری در مناطق پرخطر سرطان مری و مناطق کم خطر سرطان مری در جهان ۱۳
جدول ۳-۱- جدول متغیرها ۳۰
جدول ۳-۲- تهیه استاندارد نیترات ۴۲
جدول ۳-۳- تهیه استاندارد نیتریت ۴۴
جدول ۳-۱- مشخصات پرایمرهای الل هایHP1& HP2 ..... ۴۹
جدول ۳-۲- درصد ژل آگارز برای تفکیک قطعه‌های خطی DNA از یکدیگر ۵۳
جدول ۴-۱-۱ مقایسه میانگین سن در دو گروه مورد وکنترل ۶۰
جدول ۴-۱-۲-مقایسه میانگین جنس در دو گروه مورد و کنترل ۶۲
جدول۴-۱-۳- مقایسه میانگین و انحراف معیار سن و فاکتورهای آنتروپومتریک در دو گروه مورد مطالعه ۶۲
جدول۴-۱-۴-مقایسه میانگین و انحراف معیار فاکتورهای دموگرافیک در دو گروه مورد مطالعه ۶۳
جدول۴-۲-۱- مقایسه میانگین و انحراف معیار بسامد مصرف سهم‌های مواد غذائی در دو گروه مورد مطالعه ۶۴
جدول ۴-۲-۲- همبستگی نوع ماده مصرفی با متغیرهای p53, MDA و نیترات ۶۵
جدول ۴-۳-۱ تعیین ارتباط پلی مورفیسم‌هاپتوگلوبین با سرطان مری ۶۹
جدول ۴-۳-۲- مقایسه میانگین و انحراف معیار سطح سرمی *p53* در دوگروه مورد مطالعه ۷۰
جدول ۴-۳-۳- مقایسه میانگین و انحراف معیار سطح سرمی *MDA* دردوگروه مورد مطالعه ۷۰
جدول ۴-۳-۵- میانگین سطح p53 بر اساس فنوتیپ‌های هاپتوگلوبین در گروه مورد ۷۱
جدول ۴-۳-۶- میانگین سطح p53 بر اساس فنوتیپ‌های هاپتوگلوبین در گروه کنترل ۷۲
جدول ۴-۹- مقایسه میانگین و انحراف معیار سطوح سرمی MDA بر اساس فنوتیپ‌های هاپتوگلوبین ۷۲
جدول ۴-۳-۷-میانگین سطح MDA بر اساس فنوتیپ‌های‌هاپتوگلوبین در گروه مورد ۷۳

عنوان	صفحه

جدول ۴-۳-۸-میانگین سطح MDA بر اساس فنوتیپ‌های هاپتوگلوبین در گروه کنترل ۷۳
جدول ۴-۳-۹- مقایسه چندگانه فنوتیپ‌های مختلف هاپتوگلوبین از نظر سطح MDA در دو گروه بر اساس آزمون آماری TUKEY ۷۴
جدول ۴-۳-۱۰- مقایسه میانگین و میانگین رتبه سطح *نیترات* بر اساس فنوتیپ‌های مختلف هاپتوگلوبین بر اساس آزمون کروسکال والیس ۷۵
جدول ۴-۳-۱۱-بررسی همبستگی MDA، p53 و نیترات در گروه مورد ۷۵
جدول ۴-۳-۱۲-بررسی همبستگی MDA، p53 و نیترات در گروه کنترل ۷۶

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار۳-۱- استانداردMDA ۳۵

نمودار ۳-۲- استاندارد p53..... ۳۹

نمودار ۳-۳- استاندارد (نیترات + نیتریت) ۴۵

نمودار ۳-۴- استاندارد نیتریت ۴۶

نمودار ۴-۱-نمودار همبستگی MDA و نیترات در گروه مورد ۷۶

نمودار ۴-۲- نمودار همبستگی MDA و نیترات در گروه شاهد ۷۷

نمودار ۴-۳-نمودار همبستگی p53 و نیترات در گروه مورد ۷۷

نمودار ۴-۴-نمودار همبستگی p53 و نیترات در گروه شاهد..... ۷۸