

به نام آنکه جان را فکرت آموخت
چراغ دل به نور جان برافروخت



دانشگاه علوم پزشکی و
خدمات بهداشتی درمانی استان اردبیل

عنوان:

بررسی سطح سرمی ویتامین D (25-Hydroxy Vitamin D) و ارزیابی پلی مورفیسمهای BsmI (rs1544410 G>A) و FokI (rs10735810 T>C) گیرنده ویتامین D در بیماران مبتلا به سرطان

مدولاری تیروئید

اساتید راهنما:

دکتر محمد مازنی

دکتر سعید حسینی اصل

استاد مشاور:

دکتر مهدی هدایتی

نگارنده :

مهرنوش رضانی

شماره پایان نامه: ۱۸۰

سپاسگزار کسانی هستم که سرآغاز تولد من هستند. از یکی زاده می شوم و از دیگری جاودانه، استادی که سپیدی را بر تخته سیاه زندگیم نگاشت و مادری که تار مویی از او پپای من سیاه نماند.

تقدیم به

مقدس ترین واژه ها در لغت نامه دلم، مادر، پدر و خاله ی مهربانم، همسر عزیزم و برادرانم که در تمام طول این مسیر همراه و همگام من بوده اند.

تشکر و قدر دانی

بر خود لازم می دانم از زحمات بی دریغ اساتید راهنمای عزیز آقای دکتر محمد مادی و دکتر سعید حسینی اصل، که در انجام تمامی مراحل این پروژه مرا از راهنمایی های ارزنده و به جای خود محروم نموده اند کمال تشکر و قدردانی را ابراز نمایم.

همچنین از استاد مشاور بزرگوار و مهربان آقای دکتر مهدی هدایتی که مرا مورد راهنمایی های خردمندانه خود قرار داده اند،

از اساتید گرامی گروه بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل آقایان ، دکتر مجتبی امانی، دکتر رضا علی پناه و دکتر علی نعمتی که افتخار شاگردی ایشان را داشته ام، به خاطر تمام الطافی که به این جانب داشته اند،

از جناب آقای دکتر اکبر پیرزاد، دکتر محمد قاسم گل محمدی، دکتر هادی پیری مسئولین محترم دانشگاه علوم پزشکی اردبیل،

داوران محترم دکتر رضا علی پناه مقدم، دکتر پرهام محمدی و دکتر کیوان امیرشاهرخی

از سرکار خانم دکتر نریمان مصفا استاد تمام وقت گروه ایمنولوژی دانشگاه شهید بهشتی،

از سرکار خانم مرجان یگانه مسئول آزمایشگاه پژوهشکده غدد و متابولیسم دانشگاه شهید بهشتی

نهایت تشکر و سپاسگزاری را دارم.

چکیده

بررسی سطح سرمی ویتامین D (25-Hydroxy Vitamin D) و ارزیابی پلی مورفیسمهای FokI (rs10735810 T>C) و BsmI (rs1544410 G>A) گیرنده ویتامین D در بیماران

مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید

سابقه و هدف: سرطان تیروئید شایع ترین بدخیمی غدد درون ریز می باشد. اثرات ضد سرطانی ویتامین D را در سرطان های مختلف نشان داده شده است. پلی مورفیسم های مهم گیرنده ویتامین D میتواند استعداد ابتلا به سرطان های مختلف را تحت تاثیر قرار دهد. مطالعه حاضر با هدف تعیین ارتباط سطح سرمی ویتامین D و پلی مورفیسم های FokI، BsmI و Tru9I گیرنده ویتامین D انجام گردید.

مواد و روش ها: مطالعه از نوع مورد-شاهدی بوده و در تابستان ۹۴ در پژوهشکده غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام گردید. تعداد ۴۰ بیمار و ۴۰ فرد سالم وارد مطالعه شدند. DNA ژنومی نمونه ها پس از استخراج به روش نمک اشباع/ پروتئیناز K با روش PCR- Sequencing (Polymerase Chain Reaction-sequencing) مورد بررسی قرار گرفت. سطح سرمی ویتامین D با استفاده از تکنیک الیزا تعیین گردید.

یافته ها: فراوانی ژنوتیپی و آللی مربوط به پلی مورفیسم های FokI و BsmI بین گروه تست و کنترل تفاوت معنی داری را نشان نداد. در مورد پلی مورفیسم Tru9I فراوانی ژنوتیپی Tt در گروه تست ۴۵ درصد و در گروه کنترل ۱۷/۵ درصد و فراوانی آللی t در گروه تست ۲۵ درصد و در گروه کنترل ۸/۷ درصد بود که این تفاوت از لحاظ آماری معنی دار بود ($P=0/006$). میانگین سطح سرمی ویتامین D در گروه تست ۲۳/۳۲ ng/ml و در گروه کنترل ۱۸/۹۵ ng/ml بدست آمد که این تفاوت از لحاظ آماری معنی دار بود ($P=0/02$).

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد سطح سرمی ویتامین D بر خلاف انتظار ارتباط معکوس با سرطان مدولاری تیروئید دارد و پلی مورفیسم Tru9I به صورت معنی داری با افزایش ریسک ابتلا به سرطان مدولاری تیروئید همراه می باشد.

واژگان کلیدی: سرطان مدولاری تیروئید، ویتامین D، گیرنده ویتامین D، پلی مورفیسم

فهرست مطالب:

۱	فصل اول (طرح تحقیق):	۱
۲	۱-۱. مقدمه	۲
۳	۱-۲. بیان مسئله	۳
۵	۱-۳. تعریف واژه ها	۵
۵	۱-۴. اهداف تحقیق	۵
۶	۱-۵. فرضیات یا سؤالات تحقیق	۶
۷	فصل دوم (پیشینه تحقیق):	۷
۸	۲-۱. غده تیروئید	۸
۹	۲-۲. بافت شناسی غده تیروئید	۹
۱۱	۲-۲-۱. سلولهای C یا پارافولیکولار	۱۱
۱۲	۲-۳. هورمونهای تیروئید	۱۲
۱۳	۲-۳-۱. مراحل مختلف سنتز هورمونهای تیروئید	۱۳
۱۴	۲-۳-۲. اعمال فیزیولوژیک هورمونهای تیروئید	۱۴
۱۵	۲-۳-۳. تنظیم ترشح هورمونهای تیروئید	۱۵
۱۷	۴-۲. بیماریهای تیروئید	۱۷
۱۸	۴-۱-۲. پرکاری تیروئید	۱۸
۱۹	۲-۴-۲. کم کاری تیروئید	۱۹
۲۰	۲-۴-۳. سرطان تیروئید	۲۰
۲۴	۲-۴-۳-۱. انواع سرطانهای تیروئید	۲۴
۲۵	کارسینوم پاپیلاری	۲۵
۲۵	کارسینوم فولیکولار	۲۵
۲۶	کارسینوم آناپلاستیک یا تمایز نیافته	۲۶
۲۶	کارسینوم مدولاری	۲۶
۲۷	انواع سندرم های نئوپلازی اندوکرین چندگانه نوع	۲۷

۲۹ ۲-۵. ویتامین D
۳۰ ۲-۵-۱. گیرنده ویتامین D (VDR)
۳۱ ۲-۵-۲. پلی مورفیسم های ژن VDR
۳۳ ۳-۵-۱. متابولیسم ویتامین D
۳۴ ۴-۵-۱. ویتامین D / رسپتور ویتامین D و سرطان
۳۵ ۵-۵-۲. اثرات ضد سرطانی ویتامین D
۳۵ ۱-۵-۵-۲. تنظیم سیکل سلولی به وسیله ویتامین D
۳۷ ۲-۵-۵-۲. اثرات ضد التهابی، مهاجم و متاستاز
۳۷ ۳-۵-۵-۲. اثرات ویتامین D بر روی آپوپتوز
۳۹ فصل سوم (شیوه اجرای تحقیق)
۴۰ ۱-۳. جامعه آماری و روش نمونه گیری
۴۰ ۲-۳. برآورد حجم نمونه
۴۱ ۳-۳. جمع آوری نمونه خون و جداسازی سرم
۴۱ ۴-۳. استخراج DNA از خون محیطی با استفاده از روش نمک اشباع
۴۲ ۱-۴-۳. نحوه انجام استخراج DNA با روش نمک اشباع
۴۴ ۲-۴-۳. بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده
۴۴ ۱-۲-۴-۳. روش نورسنجی
۴۵ ۳-۵. طراحی پرایمرها
۴۵ ۶-۳. آماده کردن پرایمرها
۴۶ ۷-۳. PCR
۴۶ ۱-۷-۳. روش انجام PCR
۴۹ ۱-۸-۳. تهیه ژل پلی اکریل آمید
۵۵ ۹-۳. اندازه گیری ویتامین D سرم
۵۸ فصل چهارم (نتایج و یافته ها):
۶۰ ۴-۴. نتایج PCR نمونه ها برای پروموتور ژن ویتامین D

۶۱	۴-۵. نتایج حاصل از تعیین توالی
۶۳	۴-۶. آنالیزهای آماری
۶۳	۴-۶-۱. نتایج حاصل از سنجش غلظت سرمی ویتامین D
۶۴	۴-۶-۱. بررسی تعادل هاردی- واینبرگ
۶۴	۴-۶-۲. فراوانی ژنوتیپی در جمعیت بیمار و سالم
۶۶	۴-۶-۳. فراوانی آللی در جمعیت بیمار و سالم
۶۷	فصل پنجم (بحث و نتیجه گیری):
۶۸	بحث
۷۲	رفرنس ها:

فهرست جداول، نمودارها و اشکال:

- شکل ۱-۲. غده تیروئید..... ۹
- شکل ۲-۲. غده تیروئید از نظر بافت شناسی شامل سه بخش است..... ۱۰
- شکل ۲-۳. میزان ترشح تیروئید را TSH تنظیم می نماید..... ۱۶
- نمودار ۱-۲. شیوع سرطان تیروئید در مناطق مختلف جهان در سال..... ۲۱
- نمودار ۲-۲. شیوع سرطان تیروئید در بین کشورهای اروپایی در سال ۲۰۰۸..... ۲۲
- جدول ۱-۲. شیوع سرطان تیروئید در ایران به تفکیک استانها..... ۲۳
- نمودار ۳-۲. سن توزیع سرطان تیروئید در بیماران مبتلای ایرانی..... ۲۴
- شکل ۴-۲. جایگاه و ساختار ژن VDR..... ۳۱
- شکل ۵-۲. جایگاه پلی مورفیسم های ژن VDR..... ۳۲
- شکل ۶-۲. شکل شماتیک سنتز ویتامین D..... ۳۴
- شکل ۷-۲. اثر ویتامین D بر سیکل سلولی..... ۳۷
- جدول ۱-۳. توالی و ویژگی های پرایمر های مورد استفاده..... ۴۵
- جدول ۲-۳. محتوی میکروتیوب های آماده PCR..... ۴۶
- جدول ۳-۳. مواد لازم برای PCR..... ۴۷
- جدول ۴-۳. برنامه PCR برای FokI و BSMI..... ۴۷
- شکل ۱-۴. الکتروفورز قطعات بر روی ژل پلی..... ۶۰
- شکل ۲-۴. نتیجه تعیین توالی DNA در ناحیه اگزون ۲..... ۶۱
- شکل ۳-۴. نتیجه BLAST کردن نمونه ها در حالت هتروزیگوت..... ۶۱

شکل ۴-۴) تعیین توالی ناحیه تکثیر شده در ژن ویتامین D..... ۶۳

شکل ۴-۵) میانگین سطح سرمی ویتامین D در گروه تست و کنترل..... ۶۴

جدول ۴-۱: فراوانی ژنوتیپی پلی مورفیسم های FokI، BsmI و Tru9I..... ۶۵

جدول ۴-۲: فراوانی آللی پلی مورفیسم های FokI، BsmI و Tru9I..... ۶۶

فهرست اختصارات

- CGRP:** calcitonin gene related peptide
- TSH:** TSH-thyroid stimulating hormone
- TRH:** thyrotropin releasing hormone
- TPO:** Thyroid peroxidase
- Tg:** Thyroglobulin
- TR:** thyroid receptor
- COR:** Corepressor complex
- COA:** Corepressor activator
- RIA:** radioimmunoassay
- MEN2A:** Multiple endocrine neoplasia type 2A
- MTC:** Medullary thyroid carcinoma
- FMTC:** Familial medullary thyroid carcinoma
- HSCRD:** Hirschsprung' disease
- CLA:** Cutaneous lichen amyloidosis
- DBP:** vitamin D binding protein
- EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic acid
- SDS:** Sodium dodecyl sulphate
- HRP:** Horseradish peroxidase
- TMB:** 3,3',5,5' tetramethyl-benzidine
- SNP:** Single Nucleotide Polymorphisms