بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم بهزیستی وتوانبخشی

مرکز تحقیقات ژنتیک

پایان نامه کارشناسی ارشد

ژنتیک انسانی

بررسی عدم ثبات ژنومی (شکنندگی کروموزومی و انیوزومی) در ۲۰ بیمار مبتلا به پارکینسون با شروع زودرس و مقایسه آن با ۲۰ فرد نرمال

نگارنده:

سعید قدیمی حدادان

استاد راهنما:

دکتر فرخنده بهجتی

استاد مشاور:

دکتر محمد روحانی

شهریور ۱۳۹۲

شماره ثبت: ۱۷۹-۱۰۰۰

تقدیم به

مقدس‌ترین واژه‌ها در لغت‌نامه دلم:

مادرم: مهربانم که زندگیم را مدیون مهر و عطوفت او می‌دانم

پدرم: مهربانی مشفق، بردبار و حامی

خواهر و برادرانم: همراهان همیشگی و پشتوانه‌های زندگی‌ام

چکیده:

بیماری پارکینسون یکی از شایع‌ترین بیماری‌های تحلیل برنده عصبی است. مطالعات گذشته حاکی از آن است که بیماری‌های تحلیل‌برنده عصبی با افزایش آسیب‌های کروموزومی همراه هستند که در نهایت، ناپایداری ژنومی را به دنبال دارد. در پژوهش حاضر، وجود تغییرات سیتوژنتیکی در لنفوسیت‌های خون محیطی افراد مبتلا به بیماری پارکینسون با شروع زودرس با استفاده از دو روش سنجش میکرونوکلئوس و رنگ‌آمیزی جامد مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور برای هر یک از دو گروه مورد و شاهد ۲۰ نمونه جمع‌آوری شد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تفاوت میزان میکرونوکلئوس در دو گروه مورد و شاهد از نظر آماری معنی‌دار است($p=۰/۰۰۰$). ولی تفاوت دیده شده در میزان شکنندگی کروموزومی با استفاده از تکنیک رنگ‌آمیزی جامد از نظر آماری معنی‌دار نبود($p=۰/۴۳۶$).

کلید واژه: بیماری پارکینسون؛آسیب‌های کروموزومی؛ ناپایداری ژنومی؛ سنجش میکرونوکلئوس.

فهرست مطالب

فصل اول: کلیات تحقیق ۱

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۲- بیان مسئله ۴

۱-۳- بیان واژه‌ها ۶

۱-۴- اهمیت و ضرورت ۷

۱-۵- اهداف پژوهش ۸

۱-۵-۱- هدف کلی ۸

۱-۵-۲- اهداف اختصاصی ۹

۱-۵-۳- اهداف کاربردی ۹

۱-۶- فرضیه‌ها و سؤالات ۹

۱-۶-۱- فرضیات ۹

۱-۶-۲- سؤالات ۹

فصل دوم: پیشینه تحقیق ۱۰

۲-۱- تاریخچه ۱۱

۲-۲- آسیب شناختی بیماری پارکینسون ۱۲

۲-۳- همه‌گیر شناسی بیماری پارکینسون ۱۲

۲-۴- ژنتیک بیماری پارکینسون ۱۳

۲-۴-۱- ژن‌های دخیل در بیماری پارکینسون ۱۳

۲-۴-۲- ژن SNCA ۱۴

۲-۴-۳- ژن PARKIN ۱۴
۲-۴-۴- ژن LRRK2 ..... ۱۵
۲-۴-۵- ژن PINK1 ..... ۱۵
۲-۴-۶- ژن DJ-1 ..... ۱۶
۲-۴-۷- ژن ATP13A2 ..... ۱۶
۲-۵- ناهنجاری‌های ساختاری کروموزوم‌ها ۱۷
۲-۵-۱- بازآراییهای نامتعادل ۱۷
۲-۵-۱-۱- حذف ۱۷
۲-۵-۱-۲- دو برابر شدگی ۱۸
۲-۵-۱-۳- کروموزوم‌های حلقوی ۱۹
۲-۵-۱-۴- ایزو کروموزوم‌ها ۲۰
۲-۵-۱-۵- کروموزوم‌های دو سانترومری ۲۱
۲-۵-۲- بازآراییهای متعادل ۲۲
۲-۵-۲-۱- وارونگی‌ها ۲۲
۲-۵-۲-۲- جابجایی‌ها ۲۴
۲-۵-۲-۳- دخول ۲۴
۲-۶- نقش بازآراییهای ژنومی در بروز بیماری پارکینسون ۲۵
۲-۷- ریز هسته و ارتباط آن با بیماری پارکینسون ۲۵
۲-۸- شکستگی DNA و تأثیر آن بر ناپایداری کروموزومی ۲۶
فصل سوم: روش‌شناسی تحقیق ۲۸

۳-۱- نوع مطالعه ۲۹
۳-۲- جامعه آماری ۲۹
۳-۳- نمونه آماری ۲۹
۳-۴- روش جمع‌آوری داده‌ها ۳۰
۳-۵- ملاحظات اخلاقی ۳۰
۳-۶- روش اجرای پژوهش ۳۰
۳-۷- مواد و روش‌ها ۳۱
۳-۷-۱- روش رنگ‌آمیزی جامد(Solid Staining) ۳۱
۳-۷-۱-۱- کشت خون محیطی ۳۲
۳-۷-۱-۲- هاروست(برداشت) ۳۲
۳-۷-۱-۳- لام‌گیری ۳۴
۳-۷-۱-۴- رنگ‌آمیزی ۳۵
۳-۷-۱-۵- آنالیز ۳۶
۳-۷-۲- سنجش میکرونوکلئوس‌ها ۳۹
۳-۷-۲-۱- کشت خون محیطی ۳۹
۳-۷-۲-۲- هاروست(برداشت) ۴۲
۳-۷-۲-۳-لام‌گیری ۴۳
۳-۷-۲-۴- رنگ‌آمیزی ۴۴
۳-۷-۲-۵- آنالیز ۴۵
فصل چهارم: توصیف و تحلیل داده‌ها ۴۸

۴-۱- نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی جامد..... ۴۹
۴-۱-۱- میانگین شکست کروموزومی در دو گروه بیمار و کنترل..... ۵۱
۴-۱-۲- مقایسه میانگین شکست کروموزومی در دو گروه بیمار و کنترل..... ۵۲
۴-۲- نتایج حاصل از سنجش میکرونوکلئوس..... ۵۳
۴-۲-۱- میانگین درصد میکرونوکلئوس در دو گروه بیمار و کنترل..... ۵۳
۴-۲-۲- مقایسه میانگین درصد میکرونوکلئوس در دو گروه بیمار و کنترل..... ۵۴
فصل پنجم: بحث و نتیجه‌گیری و پیشنهادات..... ۵۶
۵-۱- بحث..... ۵۷
۵-۲- نتیجه‌گیری..... ۵۸
۵-۳- پیشنهادات..... ۵۸
منابع ۶۰
چکیده انگلیسی..... ۶۵

فهرست جداول

جدول۴-۱.درصد میکرونوکلئوس و شکستگی کروموزومی در افراد بیمار و سالم..... ۵۰

جدول۴-۲.میانگین شکست کروموزومی در دو گروه بیمار و کنترل..... ۵۱

جدول۴-۳.آزمون ANOVA برای مقایسه میانگین شکست کروموزومی ۵۲

جدول۴-۴.میانگین درصد میکرونوکلئوس در دو گروه بیمار و کنترل..... ۵۳

جدول۴-۵.آزمون ANOVA برای مقایسه میانگین درصد میکرونوکلئوس..... ۵۵

فهرست شکل‌ها و نمودارها

شکل۲-۱.شماتیکی از حذف انتهایی(A) و بینابینی(B) در یک کروموزوم..... ۱۸

شکل۲-۲.شماتیکی از دو برابر شدگی کروموزومی..... ۱۹

شکل۲-۳.چگونگی تشکیل کروموزوم حلقوی..... ۲۰

شکل۲-۴.تقسیم نادرست سانترومر و ایجاد ایزوکروموزوم..... ۲۱

شکل۲-۵.چگونگی تشکیل کروموزوم دو سانترومری..... ۲۲

شکل۲-۶.شماتیکی از وارونگی کروموزومی..... ۲۳

شکل۳-۱.گستره متافازی با پراکندگی کروموزومی کم..... ۳۷

شکل۳-۲. گستره متافازی با پراکندگی کروموزومی زیاد..... ۳۸

شکل۳-۳. گستره متافازی با پراکندگی کروموزومی مناسب..... ۳۸

شکل۳-۴.یک سلول دو هسته‌ای فاقد میکرونوکلئوس..... ۴۶

شکل۳-۵. یک سلول دو هسته‌ای حاوی میکرونوکلئوس..... ۴۶

شکل۳-۶. یک سلول دو هسته‌ای با دو میکرونوکلئوس..... ۴۷

نمودار۴-۱.میانگین شکست کروموزومی در دو گروه بیمار(PD) و کنترل(Control)..... ۵۱

نمودار۴-۲.میانگین درصد میکرونوکلئوس در دو گروه بیمار(PD) و کنترل(Control)..... ۵۴

فصل اول:

کلیات تحقیق

۱-۱- مقدمه:

بیماری پارکینسون[1] دومین اختلال تحلیل‌برنده عصبی[2] شایع پس از آلزایمر وشایع‌ترین علت اختلال حرکتی است. این بیماری به عنوان یک بیماری پیشرونده که با تخریب سلول‌های عصبی(نورون‌ها) همراه می‌باشد، تعریف شده است. حدوداً ۵ میلیون نفر در سراسر جهان به این بیماری مبتلا هستند. این بیماری معمولا در سنین بالای ۵۵ سال بروز پیدا می‌کند. تخمین زده می‌شود که افراد جوان مبتلا به پارکینسون (مبتلا شده در سن ۵۵ یا کمتر)۱۰ تا ۱۵ درصد کل این بیماران را تشکیل می‌دهند. کاهش میزان انتقال‌دهنده عصبی موسوم به دوپامین[3] و تشکیل رسوبات سیتوپلاسمی به نام اجسام لوی[4] از نشانه‌های مهم و عمده آسیب‌شناختی بیماری پارکینسون است. این نشانه‌های آسیب‌شناختی در بخش‌های مختلف مغز به ویژه در ناحیه‌ای از آن به نام جسم سیاه[5] قابل مشاهده است. اختلالات حرکتی در بیماران پارکینسونی، مربوط به آسیب‌های وارده به سلول‌های عصبی تولیدکننده دوپامین در ناحیه جسم سیاه مغز است در حالی که اختلالات غیر حرکتی مانند افسردگی و فراموشی به آسیب‌هایی غیر از آسیب‌های سلول‌های عصبی مربوط می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد که سلول-های عصبی آزادکننده دوپامین با افزایش سن افراد به طور طبیعی کاهش می‌یابد اما در بیماران مبتلا به پارکینسون ۶۰ تا ۸۰ درصد این سلول‌ها تخریب می‌شوند. به طور کلی می‌توان گفت که کاهش تعداد سلول‌های عصبی آزادکننده دوپامین درنواحی مختلف مغز به ویژه در جسم سیاه، نقش اصلی را در بروز بیماری پارکینسون دارد. دوپامینی که توسط جسم سیاه تولید و آزاد می‌شود به قسمت‌های دیگری از مغز به ویژه به ناحیه‌ای موسوم به کورپوس استراتوم می‌رود و فعالیت سلول‌های آنها را کنترل می‌کند. این پیام‌ها به حرکت

1. Parkinson's disease(PD)
2. Neurodegenerative
3. Dopamine
4. Lewy bodies
5. Substantia Nigra

بدن تعادل می‌بخشند. در بیماری پارکینسون با تحلیل سلول‌های جسم سیاه، دوپامین کافی به کورپوس استراتوم نمی‌رسد و در نتیجه این قسمت از مغز دچار اختلال عملکرد می‌شود. کندی حرکات، لرزش در مواقع استراحت و سفتی عضلانی نتیجه این اختلال عملکرد می‌باشد. علت ابتلا به بیماری پارکینسون به طور کامل مشخص نشده است ولی به دلیل تنوع در نشانه‌های بیماری گفته می‌شود که وجود شاخص‌های گوناگون باعث بروز این بیماری می‌شود. پارکینسون یک بیماری پیچیده است و با اینکه بیشتر مطالعات انجام گرفته بر دخالت عوامل محیطی در این بیماری بحث می‌کند اما تحقیقات نشان داده است که فاکتورهای ژنتیکی نیز می‌تواند در بروز بیماری پارکینسون نقش داشته باشد. طبق مطالعات انجام شده، احتمال ابتلا به پارکینسون با وجود سابقه فامیلی از این بیماری، ۳ تا ۴ برابر افزایش می‌یابد. با بررسی‌های مولکولی انجام گرفته چندین ژن دخیل در بروز بیماری پارکینسون شناسایی شده است از جمله ATP13A2, PARKIN, PINK1, DJ1, LRRK2 ،SNCA . مطالعات اخیر بیان کننده دخالت ناهنجاری‌های کروموزومی در بیماری‌های تحلیل‌برنده عصبی از جمله پارکینسون می‌باشد. مطالعات انجام شده بر روی لنفوسیت‌های افراد مبتلا به پارکینسون نشان می‌دهد که در این افراد فراوانی ریزهسته‌ها[1] و میزان شکستگی‌های تک‌رشته‌ای DNA نسبت به افراد نرمال افزایش می‌یابد. ریزهسته‌ها در اثر شکستگی کروموزومی یا جدایی نادرست کروموزوم‌ها ایجاد می‌شوند. این حالت باعث افزایش ناپایداری کروموزومی و شکستگی DNA می‌شود. از ناهنجاری‌های کروموزومی شایع در بیماری پارکینسون می‌توان به سه برابر[2] و دو برابر[3] شدن ژن SNCA و شکستگی و حذف ژن‌های PARKIN و DJ1 اشاره کرد. همچنین مدارک مختلف نشان می‌دهدکه در پارکینسون، برخی مسیرهای ترمیم‌کننده

1. Micronucleus
2. Triplication
3. Duplication

آسیب‌های DNA معیوب می‌باشد، این شرایط باعث افزایش آسیب‌های اکسیداتیو و به تبع آن افزایش ناپایداری کروموزومی[1] می‌شود[۱،۲،۳] .

در این تحقیق برآنیم تا عدم ثبات کروموزومی را در بیماران مبتلا به پارکینسون بررسی کنیم.

۱-۲- بیان مسئله:

بیماری پارکینسون که شایع‌ترین شکل پارکینسونیسم(تقریباً ۷۵٪ موارد) است، به نشانگان عمدتاً غیرارثی اختلال حرکتی با شروع دیررس، همراه با از بین رفتن نورون‌ها و تشکیل اجسام لوی در ساقه مغز و سایر نقاط مغز گفته می‌شود.

بیماری پارکینسون دومین اختلال تحلیل‌برنده عصبی شایع پس از آلزایمر است. بروز بیماری در حدود ۱۵ در ۱۰۰۰۰۰ در جمعیت عمومی می‌باشد که در جمعیت بالای ۶۵ سال به ۱۶۰ در ۱۰۰۰۰۰ افزایش می‌یابد.

شناسایی ژن‌های مرتبط با اشکال ارثی بیماری پارکینسون عقیده قدیمی مبنی بر علت غیرژنتیکی بیماری پارکینسون را به چالش کشانده است. با بررسی‌های مولکولی انجام گرفته چندین ژن دخیل در بروز بیماری پارکینسون شناسایی شده است از جمله ATP13A2, PARKIN, PINK1, DJ1, LRRK2,SNCA.

اما همانطور که ذکر شد، اشکال تک ژنی تنها در تعداد کمی از بیماران مبتلا به بیماری پارکینسون دیده می‌شود. نکته جالب توجه اینکه در تعداد کمی از بیماران بیش از یک ژن معیوب دیده می‌شود. همچنین در بیماران مبتلا به پارکینسون ناپایداری کروموزومی و شکستگی‌ها بسیار مشاهده می‌شود. از تغییرات سیتوژنتیکی دخیل در پارکینسون می‌توان به تریپلیکاسیون، دوپلیکاسیون و حذف ژن‌ها اشاره کرد.

1. Chromosome instability

با توجه به اهمیت شکست‌های کروموزومی در رخداد بیماری پارکینسون و همچنین اینکه بررسی‌های سیتوژنتیکی محدودی بر روی بیماری پارکینسون انجام گرفته است، مطالعات سیتوژنتیکی بیماران مبتلا به پارکینسون از نظر ناپایداری کروموزومی ضروری به نظر می‌رسد که با توجه به یافتن نواحی جدید شکستگی می‌توان ژن‌های دخیل در بروز بیماری پارکینسون را یافت.

۱-۳- بیان واژه‌ها:

بیماری تحلیل‌برنده عصبی: بیماریی که با مرگ و اختلال عملکرد سلول‌های عصبی(نورون‌ها)[1] همراه است.

انتقال‌دهنده عصبی(Neurotransmitter): ترکیباتی که به ارتباط الکتریکی- شیمیایی یک سلول عصبی با سلول مجاورش کمک می‌کنند.

اجسام لوی(Lewy bodies): تجمع غیرطبیعی پروتئینی که در سلول‌های مغزی افراد مبتلا به بیماری پارکینسون دیده می‌شود.

دوپامین(Dopamine): یکی از انتقال دهنده‌های عصبی مغز می‌باشد.

ریزهسته(Micronucleus): ساختار ریز شبیه به هسته سلول که از شکست یا عدم تفکیک صحیح کروموزومی نشأت گرفته و حاوی تمام یا قسمتی از یک کروموزوم می‌باشد.

تغییرات سیتوژنتیکی: تغییرات ژنتیکی که در سطح کروموزوم رخ می‌دهد.

تریپلیکا سیون(Triplication): سه برابر شدن تمام یا بخشی از یک کروموزوم را گویند.

دوپلیکا سیون(Duplication): دو برابر شدن تمام یا بخشی از یک کروموزوم را گویند.

1. Neuron

۱-۴- اهمیت و ضرورت:

بیماری پارکینسون دومین بیماری تحلیل‌برنده عصبی شایع می‌باشد. این بیماری معمولا در سنین بالای ۵۵ سال بروز می‌کند، و به طور تقریبی ۱٪ الی ۲٪ از افراد بالای ۶۵ سال و ۳ تا ۵٪ افراد بالای ۸۵ سال به این بیماری مبتلا می‌شوند. شکل زودرس این بیماری معمولا در سنین زیر ۵۵ سال بروز می‌کند و ۱۰ الی ۱۵٪ موارد را شامل می‌شود. حدود ۵ میلیون نفر در سراسر جهان به این بیماری مبتلا هستند و بیشترین فراوانی بیماران در کشورهای اروپای غربی و آمریکا دیده می‌شود[۴].

غربالگری برای جهش بسیاری از اشکال تک‌ژنی بیماری پارکینسون در دسترس است. اما بررسی‌های ژنتیکی برای این بیماری با مشکلات فراوانی مواجه است و در بالین عملا کمتر مورد نیاز است. یکی از مشکلات، فقدان علامت شاخص بالینی برای افتراق اشکال ژنتیکی از موارد غیرژنتیکی بیماری پارکینسون است. همچنین تفسیر نتایج بررسی‌های ژنتیکی با توجه به موضوعاتی از قبیل کاهش نفوذ جهش‌های ژن‌های غالب، نقش نامشخص جهش‌های هتروزیگوت در ژن‌های مغلوب و تظاهرات متفاوت بیماری و تاثیر ژن‌های مستعدکننده و عوامل محیطی بسیار پیچیده است. همچنین، نتیجه منفی یک آزمایش به طور کامل جهش را رد نمی‌کند و حساسیت و ویژگی بسیاری از آزمایش‌ها چندان بالا نیست. به علاوه، نتایج بر نوع درمان تاثیر نمی‌گذارد و در حال حاضر روش محافظت نورونی برای بیماری وجود ندارد.از طرفی دیگر بررسی ژن‌های پارکینسون از نظر فنی بسیار مشکل و پرهزینه است. بسیاری از ژن‌های بیماری پارکینسون بزرگ هستند و طیف وسیعی از جهش-ها، شامل تغییرات کمی و کیفی، در آنها وجود دارد.

با توجه به مطالب فوق، می‌توان نتیجه گرفت که بیماری پارکینسون شیوع نسبتا بالایی در جهان دارد و اغلب افراد مبتلا مسن هستند. از طرفی با گذشت زمان امید به زندگی افزایش می‌یابد. بنابراین تعداد مبتلایان به

پارکینسون در سال‌های آتی افزایش خواهد یافت. همچنین بیماری پارکینسون درمان قطعی ندارد و بهترین راه درمان این بیماری پیشگیری می‌باشد. روش‌های تشخیصی موجود نیز به دلایلی که در زیر به آنها اشاره می‌شود، مفید به فایده نیستند:

الف) با روش‌های موجود، بیماری معمولا در مراحل پیشرفته شناسایی می شود.

ب) برخی از روش‌های موجود پرهزینه هستند.

ج) برخی از روش‌های تشخیصی همچون MRI امن نیستند.

بنابراین روش تشخیصی مبتنی بر سیتوژنتیک می‌تواند مفید واقع شود. چون اولا ایمن هستند؛ ثانیا با این روش می‌توان بیماری را در مراحل اولیه تشخیص داده و از پیشرفت آن جلوگیری کرد. در روش سیتوژنتیکی، تشخیص آسیب‌های ساختاری و خودبخودی کروموزوم‌ها و ناهنجاری‌های تعدادی کروموزوم‌ها با اندازه‌گیری فراوانی ریزهسته‌ها صورت می‌گیرد.

۱-۵- اهداف پژوهش :

۱-۵-۱- هدف کلی:

بررسی عدم ثبات ژنومی(شکنندگی کروموزومی و انیوزومی[1]) در ۲۰ بیمار مبتلا به پارکینسون با شروع زودرس و مقایسه آن با ۲۰ فرد نرمال.

[1] Aneusomy : به حالتی گفته می شود که در آن تعداد کروموزوم های یک فرد کمتر یا بیشتر از تعداد طبیعی باشد.

۱-۵-۲- اهداف اختصاصی:

۱) بررسی میزان انیوزومی و وابستگی آن به سن شروع بیماری.

۲) بررسی میزان شکنندگی کروموزومی در بین گروه‌های مختلف سنی مبتلا به پارکینسون.

۱-۵-۳- اهداف کاربردی:

ایجاد روش تشخیص سریع و پیش از شروع علائم بیماری در افراد مستعد.

۱-۶- فرضیه‌ها و سوالات:

۱-۶-۱- فرضیات:

۱) میزان شکنندگی کروموزومی در مبتلایان به بیماری پارکینسون بیشتر از میزان آن در افراد نرمال است.

۲) هر چه میزان شکنندگی کروموزومی و انیوزومی بیشتر باشد، شدت بیماری نیز بیشتر است.

۳) هر چه سن ابتلا به بیماری پارکینسون پایین باشد، میزان ناپایداری‌های کروموزومی در سلول‌های فرد مبتلا بیشتر است.

۱-۶-۲- سؤالات:

۱) آیا ارتباط معناداری بین میزان میکرونوکلئوس‌ها در سلول با شدت و سن شروع بیماری وجود دارد؟

۲) آیا ارتباط معناداری بین سن و نقایص کروموزومی وجود دارد؟

فصل دوم:

پیشینه تحقیق