



تحصیلات تکمیلی

پایان نامه کارشناسی ارشد در زیست شناسی - ژنتیک

عنوان:

بررسی پلی مورفیسم ژن $CYP2C19^*3$ در اقوام ایرانی

اساتید راهنما:

دکتر محمدحسین سنگتراش

دکتر مسعود هوشمند

استاد مشاور:

دکتر مجید فردایی

تحقیق و نگارش:

مهشید ده بزرگی

(این پایان نامه از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه سیستان و بلوچستان بهره مند شده است)

بسمه تعالی

این پایان نامه با عنوان بررسی فارماکوژنتیک پلی مورفیسم $CYP2C10^*3$ در جمعیت ایرانی قسمتی از برنامه آموزشی دوره کارشناسی ارشد زیست شناسی-ژنتیک توسط دانشجو مهشید ده بزرگی با راهنمایی استاد پایان نامه دکتر مسعود هوشمند / دکتر محمدحسین سنگتراش تهیه شده است. استفاده از مطالب آن به منظور اهداف آموزشی با ذکر مرجع و اطلاع کتبی به حوزه تحصیلات تکمیلی دانشگاه سیستان و بلوچستان مجاز می باشد.

مهشید ده بزرگی

این پایان نامه 6 واحد درسی شناخته می شود و در تاریخ..... توسط هیئت داوران بررسی و درجه به آن تعلق گرفت.

تاریخ

امضا

نام و نام

خانوادگی

استاد راهنما:

استاد راهنما:

استاد مشاور:

داور 1 :

داور 2 :

نماینده

تحصیلات

تکمیلی:



تعهد نامه اصالت اثر

اینجانب مهشید ده بزرگی تعهد می کنم که مطالب مندرج در این پایان نامه حاصل کار پژوهشی اینجانب است و به دستاوردهای پژوهشی دیگران که در این نوشته از آن استفاده شده است مطابق مقررات ارجاع گردیده است. این پایان نامه پیش از این برای احراز هیچ مدرک هم سطح یا بالاتر ارائه نشده است.

کلیه حقوق مادی و معنوی این اثر متعلق به دانشگاه سیستان و بلوچستان می باشد.

نام و نام خانوادگی دانشجو: مهشید ده بزرگی

تقدیر و سپاس :

پروردگرم تو را سپاس که لذت آنچه دست نیافتنی می پنداشتم را به من چشاندی

اکنون که به مدد الطاف الهی مراحل انجام این پژوهش به پایان رسیده است بر خود لازم می دانم تا از تمامی کسانی که یاری و همراهی آنها موجب به ثمر رسیدن تلاشهایم گردید تشکر و قدردانی نمایم

پدر مادر و خواهر عزیزم که همواره در تمامی مراحل زندگی قدم به قدم با من همراه بودند و تمامی موفقیت هایم را مرهون محبت های بی دریغ آنها هستم.

دایی عزیزم و همسر گرانقدرشان که پیمودن این راه بدون محبت و همراهی ایشان ممکن نبود

اساتید بزرگوام جناب آقای دکتر سید مسعود هوشمند به پاس رهنمود های علمی و حمایت ها و پشتیبانی و بزرگواری ایشان.

و جناب آقای محمد حسن سنگتراش و تمامی اساتید گرانقدرم از ابتدا تا به امروز که از درگاه خداوند موفقیت و عزت روزافزون ایشان را آرزومندم.

تقدیم به

پدر و مادر بزرگوارم که وجودشان تجلی واژه ایثار است

چکیده:

فارماکوژنتیک علم مطالعه دارو ها و بررسی اثر متقابل دارو ها و ژنوتیپ افراد است ، دارو های واحد اثرات متفاوتی در افراد مختلف دارند، برخی افراد برای دستیابی به اثر درمانی مشابه با دیگران به دوز کمتر یا بیشتری از دارو نیاز دارند. گاهی یک دارو هیچ اثر درمانی در برخی ندارد، گاهی دارویی که بیشتر مردم بدون مشکل مصرف می کنند برای اندکی از بیماران سبب واکنش های مضر می شود، گروهی از این واکنش های مضر دارویی و عدم پاسخ به یک دارو در نتیجه سرعت های متفاوت متابولیسم دارو هایی است که وارد بدن می شوند.

گروهی از دارو ها به صورت پیش دارو مصرف می شوند که باید در کبد متابولیزه شده و به فرم فعال دارو تبدیل شوند تا اثرات درمانی خود را بگذارند و بعضی دارو ها به صورت فعال وارد بدن می شوند که باید به سرعت در کبد متابولیزه و از بدن دفع شوند. وجود SNP ها و آللهای متفاوت در افراد مختلف سرعت این واکنش های متابولیسم را تغییر می دهد و باعث عدم تاثیر دارو یا اثرات جانبی مضر مثل over dose می گردد. SNP ها از نسلی به نسل دیگر قابل به ارث رسیدن هستند بنابراین قومیت های مختلف می توانند الگوی وراثتی مشابهی از نظر آلی یا SNP برای یک ژن داشته باشند

در این پژوهش ما 300 نفر از قومیت های مختلف ایرانی را جهت یافتن آلل CYP2C19*3 مورد بررسی قرار دادیم. در این پژوهش برای یافتن پلی مورفیسم (636 G>A) ، DNA را از خون استخراج کردیم ، سپس اگزون 4 از ژن CYP2C19 را تکثیر و سپس با دو تکنیک RFLP و SSCP این پلی مورفیسم را جستجو کردیم و در نهایت برای تأیید نتایج دو تکنیک قبل از روش sequencing استفاده کردیم، که همه این روش ها یک نتیجه را تأیید کردند که در هیچ یک از این افراد و قومیت های ایرانی SNP یافت نشد و تمام نمونه ها نرمال گزارش شدند.

مشابه این نتایج در شمال هندوستان، عربستان، و در نژاد قفقازی مثل امریکا، کانادا، دانمارک، آلمان ، پرتغال، استرالیا و زیمبابوه گزارش شده است .

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول: مقدمه	1
1-1 - مقدمه	2
فصل دوم: مروری بر منابع	5
1-2- فاماکولوژی چیست؟	6
Single nucleotide polymorphism (SNP)-2-2	8
cytochrome P450 -3-2	13
CYP2C19-1-3-2	14
2-3-2 الی های ژن CYP2C19	18
4-2 اهمیت بالینی آزمایش های ژنتیکی	21
5-2 داروها	22
Clopidogrel-1-5-2	26
1-1-5-2 تجمع پلاکتی	28
2-1-5-2 مکانیسم عمل clopidogrel	30
3-1-5-2 مکانیسم مقاومت به clopidogrel	30
Diazepa-2-5-2	30
Escitalopra و Amitriptyline-3-5-2	31

- 31.....6-2- فراوانی ها
- 37..... فصل سوم: مواد و روشها
- 38.....1-3- نمونه‌گیری جهت بررسی ملکولی و نگهداری نمونه‌ها
- 38.....2-3- استخراج DNA از سلول‌های خونی
- 38.....1-2-3- استخراج DNA به روش کیت شرکت ژن پژوهان پویا
- 38.....1-1-2-3- مواد و محلول‌های مورد نیاز
- 39.....2-1-2-3- وسایل مورد نیاز
- 39.....3-1-2-3- روش کار
- 40.....3-3- چگونگی نگهداری DNA
- 40.....1-3-3- نگهداری در 4 سانتیگراد
- 41.....2-3-3- نگهداری DNA بصورت منجمد
- 41.....3-3-3- نگهداری DNA در کلروفرم
- 41.....4-3- ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده و تعیین کمیت آن
- 41.....1-4-3- روش الکتروفورز
- 42.....2-4-3- روش اسپکتروفتومتری
- 43.....5-3- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز: (PCR)
- 44.....1-5-3- اساس و روش کار PCR
- 45.....2-5-3- نحوه عمل PCR

- 47.....3-5-3 مواد و محلولهای مورد نیاز برای آزمایش PCR
- 47.....1-3-5-3 بافر
- 47.....MgCl₂-2-3-5-3
- 48.....3-3-5-3 -- پرایمرها 10 پیکومول
- 48.....4-3-5-3 Taq DNA polymerase U / μlit1 آنزیم
- 48.....5-3-5-3 محلول dNTP
- 48.....DNA-6-3-5-3 الگو
- 49.....7-3-5-3 آب مقطر استریل دیونیزه
- 50.....4-5-3 مواد لازم جهت انجام PCR
- 51.....5-5-3 -- برنامه زمانی واکنش PCR
- 52.....6-5-3 کاربردهای مهم PCR
- 52.....6-3 الکتروفورز
- 53.....1-6-3 مواد مورد نیاز
- 53.....2-6-3 وسایل مورد نیاز
- 54.....3-6-3 تهیه ژل آگارز
- 54.....4-6-3 نحوه انجام الکتروفورز
- 54.....5-6-3 مشاهده الکتروفورز روی ژل
- 56.....6-6-3 تهیه محلول های لازم و ژل آگارز جهت الکتروفورز

56.....	1-6-6-3 بافر TBE
56.....	Loading buffer-2-6-6-3
57.....	DNA Stain رنگ -3-6-6-3
57.....	Restriction Fragment Length Polymorphism(RFLP) -7-3
59.....	1-7-3 کاربرد های RFLP
59.....	2-7-3 معایب و مزایای تکنیک RFLP
59.....	8-3 آنزیم های محدودالاکتر (Restriction Enzymes)
61.....	BamHI-1-8-3
61.....	1-1-8-3 مکانیسم عمل BamHI و اصول RFLP
63.....	2-1-8-3 مواد لازم.
64.....	1-2-1-8-3 مواد تشکیل دهنده BamHI1X buffer
64.....	3-1-8-3 وسایل لازم.
64.....	4-1-8-3 مراحل انجام RFLP
65.....	1-4-1-8-3 الکتروفورز.
66.....	2-4-1-8-3 مواد و وسایل لازم جهت تهیه و رنگ آمیزی ژل آکریلامید.
66.....	3-4-1-8-3 روش تهیه ژل اکریلامید 8%.
68.....	4-4-1-8-3 رنگ آمیزی ژل آکریلامید
69.....	5-4-1-8-3 تهیه محلول ها

- 69.....1-5-4-1-8-3- محلول اکريلاميد.
- 69.....2-5-4-1-8-3- محلول APS (آمونيو م پر سولفات).
- 69.....3-5-4-1-8-3- محلول TBE 10X.
- 69..... Single-strand conformation polymorphism(SSCP)-9-3
- 71.....1-9-3- مزایا و معایب تکنیک SSCP.
- 71.....2-9-3- موارد بهینه سازی شرایط الکتروفورز در sscp.
- 73.....3-9-3- مواد و وسایل لازم جهت تهیه ژل و دناتوره کردن DNA در SSCP.
- 73.....4-9-3- تهیه محلول های لازم.
- 73.....1-4-9-3- تهیه رنگ SSCP.
- 73.....2-4-9-3- تهیه NaOH جهت تک رشته کردن DNA.
- 73.....5-9-3- مراحل تکنیک SSCP.
- 75.....10-3- توالی یابی.
- 75.....1-10-3- روش Chain-Termination.
- 76.....2-10-3- روش توالی یابی Dye-Termination.
- 76.....11-3- آنالیز توالی DNA.
- 77.....1-11-3- روش خواندن توالی.
- 83..... فصل چهارم: نتایج.
- 84..... PCR-1-4.

84.....	PCR-RFLP-2-4
86.....	SSCP-3-4
87.....	sequencing-4-4
90.....	فصل پنجم: بحث
96.....	مراجع

فهرست جدول ها

عنوان جدول	صفحه
1-2- لیست واکنش های متابولیسم به وسیله گروهی از آنزیم های متابولیزه کننده دار	12
2-2- توضیحات ژن CYP2C19.....	16
3-2- مهمترین آلل های CYP2C19 و طبقه بندی آنها.....	20
4-2- ژنوتیپ و فنوتیپ آلل های متابولیزه کننده داروی ژن CYP2C19.....	21
5-2- دارو هایی که مانع از انجام عملکرد نرمال CYP2C19 می شوند.....	23
6-2- دارو هایی که باعث تحریک و افزایش عملکرد CYP2C19 می شوند.....	24
7-2- دارو هایی که توسط CYP2C19 متابولیزه می شوند به اضافه بیماری های مرتبط با داروها.....	25
8-2- فراوانی آلل های CYP2C19.....	32
9-2- توزیع ژنوتیپی CYP2C19 در میان جمعیت مصر.....	34
10-2- مقایسه فراوانی آلل های CYP2C19 در نژاد های مختلف.....	35
11-2- فراوانی آلل های CYP2C19 در میان نژاد های مختلف چینی.....	36
1-3- مواد و غلظت هایی که جهت PCR اگزون 4 آلل CYP2C19*3 بکار برده شد.....	51
2-3- برنامه حرارتی دستگاه ترموسایکلر جهت PCR ، اگزون 4 ، CYP2C19*3.....	52
3-3- آنزیم های محدودالاثرو.....	61
4-3- مواد و حجم های لازم آنها در RFLP.....	63

93.....مقایسه فراوانی آلل CYP2C19*3 در میان جمعیت های مختلف

فهرست شکل ها

عنوان شکل	صفحه
1-2- نمایش پلی مورفیسیم در یک جفت کروموزوم همولوگ.....	8
2-2- ساختار پروتئین CYP.....	13
3-2- سیکل کاتالیتیکی CYP450.....	14
4-2- مکان ژن CYP2C19 بر روی کروموزوم 10.....	15
5-2- طرحی از متابولیسم دارو توسط CYP2C19.....	22
6-2- مکانیسم عمل clopidogrel.....	29
1-3- دستگاه الکتروفورز.....	42
2-3- دستگاه اسپکتروفتومتر.....	43
3-3- مراحل PCR.....	45
4-3- بلاست پرایمر اگزون 4 آلل 3* CYP2C19 در UCSC.....	50
5-3- بلاست پرایمر اگزون 4 آلل 3* CYP2C19 در NCBI.....	50
6-3- دستگاه GEL DOC.....	55
7-3- بررسی ژنوتیپ با تکنیک RFLP.....	58
8-3- شکل شیشه ها و spacer ها جهت تهیه محفظه ژل اکرلامید.....	67
9-3- تانک عمودی جهت انجام الکتروفورز ژل اکرلامید.....	68

70.....	10-3- اصول آنالیز SSCP.....
77.....	11-3- صفحه نرم افزار FINCH TV.....
78.....	12-3- توالی نوکلئوتیدی قطعه مورد نظر.....
79.....	13-3- صفحه NCBI.....
80.....	14-3- صفحه NCBI.....
80.....	15-3- صفحه NCBI.....
81.....	16-3- صفحه NCBI.....
82.....	17-3- صفحه NCBI.....
84.....	1-4- عکس ژل آگارز مربوط به محصول PCR اگزون 4 ژن CYP2C19.....
86.....	2-4- عکس ژل پلی اکریلامید در تکنیک PCR-RFLP.....
87.....	3-4- ژل SSCP.....
88.....	4-4- توالی اگزون 4 ، ژن CYP2C19 در نرم افزار Finch TV.....
89.....	5-4- بلاست توالی حاصل از Finch TV در NCBI.....

فصل اول:

مقدمه

فارماکولوژی یا داروشناسی (Pharmacology) شاخه ای از پزشکی است که به مطالعه واکنش متقابل داروها یا مواد شیمیایی بر موجودات زنده، که منجر به ایجاد اثرات زیست شناسی این ترکیبات می گردد، می انجامد. فارماکوژنتیک یکی از زیر شاخه های فارماکولوژی است که به مطالعه نقش ژن ها بر بازدهی و تاثیرات جانبی داروها می پردازد و در واقع مطالعه ارتباط بین ساختار ژنتیکی یک فرد و پاسخ به دارو می باشد (120).

از دیدگاه عملی، با در نظر گرفتن سهم ژنتیک برای عوارض جانبی دارو و اثر بخشی درمانی دو مفهوم را می توان در نظر گرفت: فارماکوژنتیک و فارماکودینامیک. فارماکوژنتیک سرنوشت دارو به دنبال ورود به بدن بیمار را توصیف می کند، در واقع مطالعه آنچه که بدن روی دارو انجام می دهد: میزان و سرعت جذب، توزیع و پخش، متابولیسم و دفع. فارماکودینامیک مطالعه اثرات فیزیولوژیک دارو روی بدن است و مکانیسم های عملکرد دارو را توصیف می کند. در واقع آنچه دارو روی بدن انجام می دهد (121).

آمارهای جهانی نشان می دهد که سالانه در جهان بیش از صد هزار مرگ و میر در اثر واکنش های دارویی نامطلوب رخ می دهد. برخی از ژن ها ، « پلی مورفسیم » یا چند شکلی ژنتیکی دارند. برای مثال، آنزیمی که در متابولیسم سوبستراهای خارج و داخل سلول درگیر است و در کبد، روده و مغز بیان میشوند، سیتوکروم P450 است. ولی از آنجایی که در پستانداران بیشتر داروها در کبد توسط این آنزیم متابولیزه می شوند، نقش عمده آن در کبد می باشد. CYP مخفف سیتوکروم P450 است که یکی از زیر گروهها یا ایزوزیمهای واقع در شبکه آندوپلاسمی است (122).

واکنش های متابولیسم دارو به دو فاز تقسیم می شوند: فاز 1= (اکسایش - هیدروکسیل دار شدن - هیدرولیز) که اغلب به تولید ملکول فعال زیستی منجر می شوند و گاهی فرآورده های فاز 1 نقش حد واسط را در غیر فعال سازی و تجزیه دارو به عهده دارند. فاز 2= (واکنش های کونژگه شدن مثل

استیل دار شدن - گلوکوکورونیدار شدن - سولفاسیون) که محصولات محلول در آبی تولید می کنند که به راحتی دفع می شوند.

CYP450 گروه بزرگی از آنزیم ها است که مسئول انجام متابولیسم دارو های وارد شده به بدن از طریق فاز 1 می باشد. نقش این آنزیم ها وارد نمودن یک تک اتم اکسیژن مشتق شده از اکسیژن ملکولی به درون ساختار گسترده بسیاری از ترکیبات آلی است محصول نهایی معمولا شامل یک مشتق هیدروکسیل دار شده محلول در آب و قطبی از سوبسترای مربوطه می باشد

CYP450 احتمالا به منظور مقابله با متابولیت های گیاهی سمی تکامل یافته و گونه های مختلف آنها ممکن است در تعیین نوع پاسخ نسبت به مواد شیمیایی موجود در رژیم غذایی و محیط و همین طور نسبت به دارو های تجویزی اهمیت داشته باشند. حدود 60 نوع ژن P450 در انسان آنزیم هایی را رمز می کنند که مجموعا مسئول متابولیسم 60% از کل دارو های تجویزی می باشد این ژن ها در چندین خانواده مختلف گروه بندی می شوند(20)

در بین ژنهای CYP ، CYP2C19 تا 90 درصد متابولیت ضعیف تولید می کند. CYP2C19 یک نقش غالب در فعالسازی کلوپیدوگرل بازی می کند(123). یکی از پلی مورفیک ترین ژن های CYP ژن های CYP2C19 است که شامل 490 اسید آمینه می باشد و روی بازوی بلند کروموزوم 10 قرار دارد. در میان آنها 2 آل متغیر فاقد عملکرد 3*2, CYP2C19 برای اکثریت قومیت ها به عنوان ژنوتیپ معیوب محاسبه میشود. آل 3* CYP2C19 تغییرش در اگزون 4 است که کدون خاتمه زودرس ایجاد می کند و در بین آسیایی ها تکرار بیشتری دارد(124).

CYP2C19 انواع گوناگونی از دارو ها را متابولیزه می کند از جمله: دارو های ضد تشنج نظیر مفنیتوئین- باز دارنده های پمپ پروتون مانند اومپرازول (مورد استفاده در درمان زخم معده) - پروگانیل (داروی ضد مالاریا) - و برخی دارو های ضد افسردگی . در این مورد افراد از نظر فنوتیپ به چند دسته شامل: متابولیزه کننده های ضعیف - متوسط - و شدید تقسیم می شوند. میزان فراوانی متابولیزه کننده های ضعیف در بین قفقازی ها و افریقایی-آمریکایی ها 3-5% است و در شرقی ها در سطح بالا و در ساکنان جزایر پولینزی بسیار بالا است.

متابولیزه کننده های ضعیف به دز کمتری از دارو ها نیاز دارند بک ریسک قابل توجه که متابولیزه کننده های ضعیف با آن مواجه اند بروز حالت بی حسی طولانی مدت به میزان غیر قالب قبول پس از دریافت یک دز استاندارد از دیازپام در نتیجه متیل زدایی آهسته این دارو به وسیله CYP2C19 است در مقابل پرو گوانیل نوعی پیش دارو بوده که برای تبدیل شدن به ملکول سیکلو گوانیل باید به وسیله CYP2C19 فعال سازی شود از این رو در متابولیزه کننده های ضعیف تاثیر داروی مذکور کمتر است (20)

عملکرد توارث در این ژن ها باعث می شود افراد دارای نسبت فامیلی نزدیک دارای خصوصیات مشابهی در مورد متابولیسم دارو باشند متابولیزه کننده های ضعیف باید دو کپی از ژنی که دارای نقص در متابولیسم است را از دو والد خود دریافت کند بنابر این والدین او هر یک باید دارای حد اقل یک ژن ناقص باشند . داشتن یک الل حاوی نقص در عملکرد متابولیسم دارو ایجاد متابولیزه کننده های متوسط را می کند . در متابولیزه کننده های فوق سریع مشخص شده که دارای بیش از دو کپی از ژن متابولیزه کننده دارو هستند در حالی که بیشتر افراد تنها دارای دو کپی از ژن هستند در این صورت و با داشتن تعداد کپی های زیاد از هر ژن شما می توانید مقدار بیشتری آنزیم سنتز کرده و این مقدار بیشتر آنزیم باعث متابولیزه سریع تر دارو می شود در این حالت حد اقل یکی از والدین باید متابولیزه کننده فوق سریع باشد.

سوال مهم تحقیق این است که : پلی مورفیسم CYP2C19*3 چقدر در ایران شایع است؟ و در کدام قومیت بیشترین فراوانی را دارد؟