١٣٤٣٩٧

دانشگاه پیام نور

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته بیوشیمی

دانشکده علوم پایه

گروه علمی زیست شناسی

عنوان پایان نامه:

بررسی متیلاسیون پروموتور ژن E-Cadherin در معتادین به مصرف کریستال

استاد راهنما:دکتر سیما افشار نژاد

تحت اطلاعات مدرن علمی بزرگ
تحت مدارک

استاد مشاور: دکتر مسعود صالح مقدم

۱۳۸۹/۱/۲۸

نگارش:شادی شهودی فر

شهریور 1388

۱۳۴۳۹۷

۸۸/۱۲۸۶۶

۱۳۸۸/۷/۱

دانشگاه پیام نور
خراسان رضوی
باسمه تعالی

تصویب پایان نامه / رساله

پایان نامه/ رساله تحت عنوان بررسی میتلاسیون پروموتور ژن E-CADFIERIN در معتادین به مصرف کریستال که توسط شادی شهودی فر در مرکز پیام نور تهیه و به هیات داوران ارائه گردیده است مورد تایید می باشد . تاریخ دفاع : ۸۸/۶/۲۶ نمره : نوزده ۱۹/- درجه ارزشیابی : عالی

اعضای هیات داوران :

نام و نام خانوادگی	هیات داروان	مرتبه علمی	امضاء
۱- دکتر سیما افشار نژاد	استاد رهنما	استاد یار	
۲- دکتر مسعود صالح مقدم	استاد مشاور	استاد یار	
۳- دکتر خدیجه جامی الاحمدی	استاد داور	استادیار	
۴- آقای جواد محمدی پور	نماینده گروه آموزشی		
۵-	نماینده تحصیلات تکمیلی		

تقدیم به دخترانم:

مانای مهربان

و

غزل شادان

سپاسگزاری:

سپاس بیکران هر آنکس مرا در رسیدن به آنچه که هستم یاری نمود

سپاس استاد گرانقدر سر کار خانم دکتر افشار

سپاس مادر فداکارم مریم که همانند نامش قدیسه است

سپاس ودرود همسر عزیز وصبورم محمد رضا که آرامشش آرام جان است

چکیده :

هروئین به عنوان یک غیرموتاژن که میزان ابتلا به سرطان را افزایش می دهدو یک عامل تحریک کننده تومور شناخته شده است. از سوی دیگرکاهش بیانE-adhering می تواند باتهاجم سلولهای سرطانی مرتبط باشد.

در این پایان نامه بر اساس یافته ها وتحقیقات ما چنین فرض نمودیم که ارزیابی متیلاسیونE-adhering به عنوان واسطه افزایش دهنده ریسک ابتلا به سرطان و هم چنین تحلیل دهنده اتصالات بافتی در مصرف کنندگان کریستال می تواند ارزشمند باشد.پس با جمع آوری ۵۰نمونه خون معتادین به مصرف کریستال،تحت درمان با متادون از مراکز درمان معتادین ونیز جمع آوری برخی اطلاعات اپیدمیولوژی کار آغاز گردید.یافته های ما به شرح ذیل بودند:۱. چهارده مورداز بیماران، پروموتور ژن e-کادهرین آنها متیله بود که ۳۱ % کل بیماران را شامل مي شوند.۲. بین مدت زمان مصرف ماده مخدرکریستال و متیلاسیون E-adhering ارتباط معنی داری وجود داشت($p<0.05$).

فهرست مطالب

عنوان صفحه

بخش اول

فصل اول : مقدمه

۱-۱.تاریخچه مصرف مواد مخدردرجهان..... ۲

۱-۲.تاریخچه مصرف مواد مخدردرایران..... ۴

۱-۳.بیان اهمیت موضوع اعتیاد..... ۷

۱-۴. اعتیاد..... ۹

۱-۵.تعاریف اعتیاد..... ۱۰

۱-۶.شروع اعتیاد..... ۱۲

۱-۷.طبقه بندی مواد اعتیاد آور..... ۱۴

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
۱-۸. تنباکو	۱۹
۱-۹.تریاک ومشتقات آن	۲۰
۱-۱۰. هروئین	۲۲
۱-۱۱.وابستگی به هروئین	۲۴

بخش دوم

فصل اول : کلیات

۲-۱.کریستال وکراک (هروئین بلور شده)	۲۷
۲-۲.ژنتیک توکسیکولوژی هروئین	۳۱
۲-۳. لکوسیت ها	۳۳

فهرست مطالب

عنوان صفحه

۲-۳-۱. ساختمان وعملکرد پروتئینهای غشایی لکوسیتها..... ۳۳

۲-۳-۲.خانواده های پروتئینی..... ۳۳

۲-۳-۳.اتصال وعبور لکوسیت از جداررگ..... ۳۷

۲-۴.گلیکوپروتئین های اتصالی ۳۷

۲-۴-۱. گلیکوپروتئین های اتصالی ومتاستاز..... ۳۸

۲-۵.کاتنین ها..... ۳۹

۲-۶.۱ ینتگرین ها..... ۴۲

۲-۷.کادهرین ها ۴۸

۲-۷-۱.ساختمان کادهرین ها..... ۵۱

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

۲-۸.E-کادهرین..... ۵۱

۲-۹.فرایند متیلاسیون..... ۵۵

۲-۹-۱. جزایرCpG ۵۵

۲-۹-۱-۱. معرفی جزایر CpG..... ۵۵

۲-۹-۱-۲. تعداد جزایر CpG..... ۵۶

۲-۹-۱-۳. توزیع جزایر CpG..... ۵۶

۲-۹-۱-۴. متیله یا غیر متیله بودن جزایر CpG..... ۵۷

۲-۱۰.کمپلکسهای شکل آرایی مجدد وتغییر کروماتین ۵۸

۲-۱۰-۱. متیلاسیون DNA..... ۵۸

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

۲-۱۰-۲ .آنزیم DNA - متیل ترانسفراز[1] (DNMT) ۵۸

۲-۱۱. پروتئینهای متصل شونده به متیل CpG ۶۱

۲-۱۲. آنزیمهای تغییرات هیستون ها..... ۶۴

۲-۱۳.کمپلکس های شکل آرایی مجدد کروماتین وابسته به ATP..... ۶۴

۲-۱۴.وظایف متیلاسیون DNA..... ۶۷

۲-۱۴-۱.-متیلاسیون ودفاع ژنومی..... ۶۷

۲-۱۴-۲.متیلاسیون و تکامل..... ۶۸

۲-۱۴-۳.متیلاسیون و غیر فعال شدن کروموزوم X..... ۶۸

۲-۱۴-۴.متیلاسیون و بیماری..... ۶۹

فهرست مطالب

عنوان صفحه

۲-۱۴-۵.متیلاسیون و مقاومت در برابر نوکلئازها..... ۷۱

۲-۱۴-۶. متیلاسیون و بیان ژنهای مخصوص هر بافت..... ۷۲

۲-۱۴-۷.متیلاسیون DNA ، سن و رژیم غذایی..... ۷۲

۲-۱۴-۸.متیلاسیون DNA، ساختار کروماتین را تحت تأثیر قرار می دهد.....۷۳

۲-۱۴-۹. متیلاسیون DNA عملکرد کروماتین راتحت تأثیر قرار می دهد.....۷۵

۲-۱۵. نقش هیستون داستیلازها و استیلازها در سرکوب نسخه برداری.....۷۷

۲-۱۶. محدودیت سرکوب رونویسی ناشی از متیلاسیون DNA ۷۸

۲-۱۷.ابقاء متیلاسیون DNA و سرکوب نسخه برداری در کروموزوم..... ۷۹

۲-۱۸. هایپرمتیلاسیون DNA در تومورزایی..... ۸۱

فهرست مطالب

عنوان صفحه

۲-۱۹.هایپرمتیلاسیون DNA و سرطان..... ۸۲

فصل دوم : مواد و روش ها

۲-۲۰.روش کار..... ۸۶

۲-۲۱. طراحی پرایمرها..... ۸۷

۲-۲۲. مشخصات پرایمرها..... ۸۹

۲-۲۳. انتخاب نمونه..... ۸۹

۲-۲۴. جمع آوری اطلاعات اپیدمیولوژی بیماران..... ۹۰

۲-۲۵. استخراج DNA از خون تام..... ۹۲

۲-۲۵-۱.نمونه مورد آزمایش..... ۹۲

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

۲-۲۵-۲.روش استخراج DNA از خون تام..... ۹۲

۲-۲۵-۳.اطمینان از عملکرد آزمایش استخراج DNA..... ۹۳

۲-۲۶. درمان بی سولفیت..... ۹۴

۲-۲۶-۱.روش درمان بی سولفیت به ترتیب مراحل..... ۹۷

۲-۲۶-۲.نمک زدایی و تخلیص DNA ۹۸

۲-۲۶-۳.روش نمک زدایی DNA ۹۸

۲-۲۶-۴.متوقف کردن درمان بی سولفیت..... ۹۹

۲-۲۶-۵.تشکیل رسوب DNA و اتمام مراحل..... ۹۹

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

۲-۲۶-۶.بررسی میزان خلوص DNA درمان شده..... ۱۰۰

۲-۲۷.راه اندازی و بهینه سازی تکنیک MSP..... ۱۰۱

۲-۲۷-۱.تعیین بهترین دمای Tm برای MSP..... ۱۰۲

۲-۲۷-۲. تعیین غلظت های مناسب مواد مورد استفاده در آزمایش MSP..... ۱۰۴

۲-۲۷-۳.بهینه سازی Template (Template optimization) برای MSP ۱۰۵

۲-۲۷-۴.تعیین غلظت مناسب MgCl2 (MgCl2 Optimization).....۱۰۷

۲-۲۸.روش انجام MSP.....۱۰۹

۲-۲۹.مواداستفاده شده در U-MSP..... ۱۱۰

۲-۳۰. برنامه Methylation Specific PCR (MSP)..... ۱۱۱

۲-۳۱. ردیابی محصولات PCR..... ۱۱۲

۲-۳۲.الکتروفورز با ژل آکریل آمید(PAGE).....۱۱۴

۲-۳۲-۱.ترکیب ژل پلی آکریل آمید..... ۱۱۵

۲-۳۲-۲.در صد ژل و اندازه حفرات ژل PAGE..... ۱۱۶

۲-۳۲-۳.مواد مورد نیاز برای تهیه ژل پلی آکریل آمید..... ۱۱۶

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

۲-۳۲-۴.وسایل مورد نیاز برای تهیه ژل پلی آکریل آمید..... ۱۱۶

۲-۳۲-۵.الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید..... ۱۱۸

۲-۳۳.روش رنگ آمیزی نیترات نقره..... ۱۲۱

۲-۳۴.نتایج حاصل ازانجام PCRبتااکتین بر روی DNA استخراج شده از خون تام۱۲۴

۲-۳۵.نتایج مربوط به بهینه نمودن MSP..... ۱۲۵

۲-۳۶.مقایسه دو شرایط انجام الکتروفورز آگاروز و پلی آکریل آمید برایMSP ۱۲۸

بخش سوم : تجزیه وتحلیل آماری اطلاعات

۴-۱.جداول ونمودارها.....۱۳۲-۱۴۴

بخش پنجم : بحث و نتیجه گیری

۴-۱.استراتژی تحقیق و مطالعه حاضر.....۱۴۶

۴-۲.انتخاب ژن مورد آزمایش.....۱۴۷

۴-۳.انتخاب ناحیه پروموتور ژن ۱۴۸

۴-۴.متیلاسیون ژن E-کادهرین.....۱۴۹

۴-۵.انتخاب روش MSP.....۱۴۹

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

۴-۵-۱.معایب و مزایای MSP نسبت به روشهای MSRE وساترن بلاتینگ..... ۱۵۱

۴-۶.بررسی استفاده از مواد و تکنیکهای دیگر مورد استفاده در مراحل کار..... ۱۵۳

۴-۷.بحث و بررسی در مورد نتایج پرونده های معتادین و بعضا تاثیر آنها در متیلاسیون ژن e-کادهرین..... ۱۵۵

۴-۸.مقایسه نتایج بدست آمده در این پایان نامه با نتایج گزارش شده در سایر تحقیقات مرتبط انجام شده در جهان..... ۱۵۶

۴-۹.بررسی اهمیت نتایج حاصل از این پایان نامه..... ۱۶۰

۴-۱۰.نتیجه گیری..... ۱۶۰

۴-۱۱.پیشنهادات..... ۱۶۱

منابع..... ۱۶۲

بخش اول

مقدمه

۱-۱.تاریخچه مصرف مواد مخدر در جهان

براساس اسناد تاریخی، سابقه آشنائی بشر با موادمخدر به ۴ هزار سال قبل از میلاد برمی گردد. با بررسی آثارمکتوب و لوحه های گلی که از سومریان باقی مانده است چنین استنباط می شود که سومریان اولین کسانی بودند که تریاک را کشف کردند و علاوه بر اینکه از آن به عنوان یک داروی مسکن استفاده می کردند تدریجاً به عنوان یک مخدر نیز مورد استفاده قرار می دادند و نام گیاه شادی بخش نیز بر آن نهادند.علاوه بر سومریان، اقوام آشور، مصر، یونان و رم نیز تریاک را می شناختند و از آن استفاده می کردند . یونانیها تریاک را اپیوم نامیده و اطباء بزرگی نظیر سقراط ترکیباتی از تریاک را برای بیماریهای مختلف جسمی و روانی تجویز میکردند. لوح های نقاشی کشف شده از یونان قدیم و مصر باستان حکایت از آن دارد که طبیبان، از بوته خشخاش و بوته شاه دانه به عنوان یک گیاه داروئی استفاده می کردند.[۱]

« پلین » دانشمند رومی، اولین شخصی بود که شیره غلیظ خشخاش را به نام « اپیوم » جهت استفاده علمی در داروهای مسکن عرضه کرد، اپیوم از ریشه اپوس به معنای شیره گرفته شده و در برخی موارد از آن به نام هیپون و یا افیون نیز نام برده شده است.[۱] با شروع انقلاب صنعتی (اواخر قرن ۱۷ و اوایل قرن ۱۸) وگسترش تجارت

وارتباطات واز همه مهم تر نیاز صنایع نو پا ،درانقلاب صنعتی روند جدیدی در مسایل مختلف جهانی آغاز شد.

آنچه مسلم است در قرون قبل از میلاد، کشت و استفاده از بوته های موادمخدر، صرفاً جنبه داروئی داشته است، اما پس از سازمان یافتن استعمار از کشورهای انگلیس، فرانسه و پرتغال در قرن ۱۶ - ۱۷ و بخصوص ۱۸ میلادی (انقلاب صنعتی)، استعمار از این مواد افیونی برای سلطه بر ملت های ضعیف استفاده نمود.[۱]

مساله مواد مخدر و مصرف آن تاریخچه ای طولانی دارد. این مواد اعم از مواد مخدر و محرک مکرراً به عنوان شفابخش، مسکن، شادی آور و نیز ماده مقدس مورد استفاده بشر قرار گرفته است. از جمله می توان به اشعار کهن موجود اشاره کرد و از هوم در آیین زرتشت نام برد. سابقه آشنایی بشر با خشخاش به حدود هفت هزار سال قبل بازمی گرددبطوریکه وجود لوحه های گلی باستانی از تمدن های آن زمان موید این امر است. همچنین استفاده غذایی و دارویی از انواع مواد مخدر در چین و هند و کشورهای دیگر در چند هزار سال پیش نیز مورد تایید قرار گرفته است. نکته قابل توجه اینکه در دروان صفویه مصرف تریاک به صورت خوردن حب و یاشربتهای مخصوص به نام کوکنار (جوشانده خشخاش) معمول بوده و از کشیدن تریاک ذکری به میان نیامده است.[۱]