دانشگاه علوم پزشکی فسا

دانشکده پزشکی

عنوان : **بررسی تغییرات اپی ژنتیک و وضعیت متیلاسیون ژن فاکتور رشد مغزی(BDNF) در افراد سیگاری و قلیانی**

پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در

رشته بیوشیمی بالینی

نگارنده:

فریده محمدیان

استاد راهنما

سرکار خانم دکتر بهنوش میلاد پور

استادمشاور

خانم دکتر سودابه کاووسی

سال ۱۳۹۷

چکیده

مقدمه: سیگار کشیدن یکی از بزرگترین ریسک فاکتورهای قابل پیشگیری برای مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته است . تقریبا ۱/۵ مرگ در ایالت متحده مربوط به سیگار کشیدن است. (۵) فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از مغز یا BDNF (یک پروتیین دیمریک کوچک) یک عضو از خانواده نوروتروفین از فاکتورهای رشد است . این فاکتور به شدت در سیستم عصبی مرکزی و محیطی بیان شده و از فراوان ترین نوروتروفین ها در مغز است. این فاکتور در رشد ،پیشرفت، احیا ، بقا، نگهداری و عملکرد نورون ها موثر است. بیان BDNF میتواند بوسیله تغییرات اپی ژنتیک کروماتین تنظیم میشودکه مهم ترین آن متیلاسیون DNA میباشد. مطالعات نشان می دهند دود سیگار یک تغییر دهنده محیطی قوی از متیلاسیون DNA است. اهداف ما در این مطالعه: (۱) بررسی تغییرات اپی ژنتیک از نوع متیلاسیون در اگزون I ژن BDNF در افراد سیگاری، قلیانی و سیگاری – قلیانی ۲) ارتباط سطح بیان و سطح سرمی پروتیین BDNF با سطح متیلاسیون DNA

روش کار: در این تحقیق حجم نمونه برای گروه سیگاری۱۳۷ نفر و برای گروه کنترل ۹۰ نفر بود. از افراد موردمطالعه نمونه گیری انجام شد. جهت انجام (MS-PCR(Methylation-specific PCR بایستی بر روی DNA استخراج شده تغییر بواسطه سدیم بی سولفیت انجام گیرد. به دنبال تیمار DNA با سدیم متا بی سولفیت، بازهای سیتوزین غیرمتیله به یوراسیل تبدیل می شوند درحالیکه سیتوزین های متیله بدون تغییر باقی می مانند. براساس پرایمرهای اختصاصی که برای حالت متیله و غیر متیله طراحی شده اند، این دو در واکنش PCR از هم افتراق داده می شوند. میزان سطح سرمی BDNF به‌وسیله کیت اندازه گیری در انسان از شرکت Abcam به روش الایزا طبق پروتکل کیت محاسبه گردید. به منظور ارزیابی تغییرات ممکن در بیان ژن BDNF ، با استفاده از تکنیکqRT-PCR بیان ژن را در سطح mRNAدراین افراد اندازه گرفته شد.

نتایج: نتایج حاصل از افراد سیگاری نشان دهنده آن بود که ژن BDNF در این افراد در ناحیه پروموتر اگزون I متیله شده بود که با نتایج الایزا در سرم آن ها همخوانی داشت به طوریکه مقدار BDNF در سرم این افراد نسبت به کنترل به طور معنی داری کاهش یافته بود.(P-value =۰٫۰۰۱) نتایج حاصل از متیلاسیون در افراد قلیانی تفاوت معنی داری نسبت به افراد کنترل نشان نداد که نتایج حاصل از الایزا نیز آن را تایید نمود.(P-value =۰٫۵۹۵)

نتیجه گیری : به طور خلاصه نتایج ما نشان می دهد که بین وضعیت متیلاسیون نواحی پروموتر اگزون I ژن BDNF درسلول های خون محیطی در افراد سیگاری ارتباطی وجود دارد. بر اساس این مطالعه سیگار به دلایل مواد خطرناک و مضری که دارد می تواند بر بیان فاکتور رشد مغزی BDNF تاثیر داشته باشد به نحوی که بیان ان را کاهش دهد. از انجا که BDNF نقش مهمی در سیستم عصبی مرکزی و محیط دارد، تغییر بیان آن می تواند نقش مهمی بر نحوه عملکرد این سیستم های عصبی داشته باشد.

Abstract:

Introduction: Cigarette smoke is a powerful environmental modifier of DNA methylation. Nerve growth factors of BDNF, GDNF and NGF are the neurotrophin family of growth factors and are important in growth, progression, regeneration, survival, maintenance and function of neurons. In this study we aimed to evaluate the epigenetic changes of these growth factors in cigarette smokers.

Materials and methods: To assess the BDNF, GDNF and NGF DNA methylation, peripheral blood sample were obtained from ۱۳۷ cigarette smoker individuals and ۹۰ healthy nonsmokers as controls. DNA methylation was evaluated with MS-PCR. Gene expression and serum level were carried out with qRT-PCR and ELISA assay respectively.

Results: The results from MS-PCR showed that DNA methylation in exon ۱ in promoter one of BDNF gene in heavy smokers is significantly (p-value <۰٫۰۵) higher than the healthy nonsmokers as control. Serum level of BDNF in heavy smokers is significantly (p-value <۰٫۰۵) lower than the healthy nonsmokers. Serum level of the BDNF was significantly (p-value <۰٫۰۵) lower than the healthy nonsmokers. The results from GDNF and NGF did not show any significant differences between heavy smokers and the control groups.

Conclusion: In conclusion, considering increasing methylation of BDNF and decreasing gene expression and serum concentration of that in heavy smokers and to note the role of BDNF in the growth of neurons, it is needed to control severity of smoking in individuals. Heavy smokers may be need to check serum BDNF ordinary to prevent the side effects of BDNF defect.