



# دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی بالینی

عنوان:

ارزیابی میزان تماس افراد مبتلا به سرطان کولورکتال با سموم ارگانوکلره مورد

استفاده در کشاورزی در استان کرمان طی سال ۱۳۹۵-۱۳۹۶

توسط: مسلم ابوالحسنی زراعتکار

استاد راهنما: دکتر غلامرضا اسدی کرم

استاد مشاور: دکتر محمود آقایی

سال تحصیلی: ۱۳۹۵-۱۳۹۶



**Kerman University of Medical Science**

**Faculty of Medicine**

**In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree  
(MSC)**

**Title:**

**Evaluation of colorectal cancer patients with organochlorine exposure used in  
agriculture in Kerman province during 2016-2017**

**BY:**

**Moslem Abolhassani**

**Supervisor:**

**1- Dr. Gholamreza Asadikaram**

**Advisor:**

**1- Dr. Mahmoud Aghaee**

**Year:**

**2017**

## چکیده فارسی:

**مقدمه و اهداف:** در بروز سرطان کولورکتال عوامل متعددی دخیل می‌باشند از جمله مهمترین فاکتورها می‌توان به عوامل محیطی و عوامل ژنتیکی اشاره کرد. استرس اکسیداتیو به علت نقش بالقوه آن در پیشرفت سرطان و همچنین سموم ارگانوکلره باعث نقش این سموم در ایجاد سرطان از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو و آسیب به DNA از عوامل مهم بروز سرطان کولورکتال می‌باشند. علاوه بر این القای متیلاسیون ژن‌های سرکوب کننده تومور توسط استرس اکسیداتیو و آفت‌کش‌های کشاورزی می‌تواند در بروز سرطان کولورکتال نقش داشته باشد. متیلاسیون ژن p16 که موجب سرکوب بیان این ژن شده در بروز سرطان کولورکتال نقش دارد. هدف مطالعه حاضر مقایسه فعالیت استیل کولین استراز، فعالیت آریل استرازی پاراکسوناز-۱، سطح سرمی مالون‌دی‌آلدهید و سطح سرمی ظرفیت تام‌آنتی‌اکسیدانی در افراد مبتلا به سرطان کولورکتال نسبت به گروه کنترل، به همراه اندازه‌گیری سطح سرمی آفت‌کش‌های ارگانوکلره و ارتباط متیلاسیون ژن p16 با فاکتورهای استرس اکسیداتیو و سموم ارگانوکلره در بروز سرطان کولورکتال در مقایسه با گروه کنترل بود.

**روش‌ها:** در این مطالعه مورد-شاهدی، در مجموع ۴۲ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال و ۳۰ فرد سالم انتخاب گردید. از افراد مورد مطالعه اطلاعات دموگرافیک از طریق پرسشنامه تهیه شد. فعالیت آنزیمی استیل کولین استراز براساس روش اصلاح شده المن اندازه‌گیری شد. با استفاده از فنیل استات فعالیت آریل استرازی پاراکسوناز-۱ مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین سطح سرمی مالون‌دی‌آلدهید براساس روش تیوباربیئوریک اسید و ظرفیت تام‌آنتی‌اکسیدانی براساس روش FRAP توسط بیوتوکل کیت Naxifer اندازه‌گیری شد. پس از استخراج سموم ارگانوکلره از سرم، میزان این سموم با استفاده از روش گاز کروماتوگرافی اندازه‌گیری شد. DNA ژنومی استخراج شد و متیلاسیون ژن p16 بعد از تیمار با بی‌سولفیت سدیم با استفاده از Nested-PCR و Methylation-Specific PCR بررسی شد.

**یافته‌ها:** میانگین سنی و شاخص توده بدنی افراد مبتلا به سرطان کولورکتال به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود ( $P=0/0001$ ). بررسی فاکتورهای استرس اکسیداتیو نشان داد که سطح فعالیت آنزیم استیل کولین استراز و فعالیت آریل استرازی پاراکسوناز-۱ در گروه بیمار به طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه کنترل بود ( $P=0/0001$ ). اما سطح سرمی

مالون دی‌آلدئید و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در گروه بیمار بالاتر از گروه کنترل بود ( $P = 0/0001$ ). در بررسی ضریب همبستگی فاکتورها در گروه بیمار، همبستگی معنی‌دار و معکوس بین میزان پلاسمایی TAC و سن مشاهده شد. همچنین همبستگی معکوسی بین TAC و فعالیت آریل‌استرازی پاراکسوناز-۱ دیده شد. نتایج بدست آمده از اندازه‌گیری سموم ارگانوکلره نشان داد که سطح سرمی هر هفت سم اندازه‌گیری شده در این مطالعه در گروه بیمار به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل است ( $P = 0/0001$ ). همچنین همبستگی معکوسی بین میزان سموم Beta-HCH و Gama-HCH با فعالیت AChE در گروه بیمار مشاهده گردید. در بررسی متیلاسیون پروموتور ژن p16 مشخص شد که سطح سرمی MDA در افراد متیله به طور معنی‌داری در مقایسه با افراد هتروزیگوت کاهش یافته است. همچنین فعالیت آریل‌استرازی پاراکسوناز-۱ در افراد متیله در مقایسه با افراد سالم کاهش معنی‌داری نشان داد. همچنین میزان Gama-HCH در حالت متیله ژن p16 در مقایسه با افراد غیرمتیله و افراد هتروزیگوت افزایش معنی‌داری نشان داد.

**نتیجه‌گیری:** از آنجاییکه سطح سرمی سموم ارگانوکلره در افراد مبتلا به سرطان کولورکتال در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد و یافته‌ها بیانگر کاهش فعالیت استیل‌کولین‌استراز و کاهش فعالیت آریل‌استرازی پاراکسوناز-۱ به همراه افزایش سطح سرمی مالون دی‌آلدئید و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در افراد مبتلا به سرطان کولورکتال در مقایسه با گروه کنترل بود می‌توان نتیجه گرفت که سموم ارگانوکلره در القای استرس اکسیداتیو و بروز سرطان کولورکتال نقش دارند. از طریق مطالعه حاضر نشان داد که سم Gama-HCH در متیلاسیون ژن p16 که به عنوان یک ژن سرکوب‌کننده تومور عمل می‌کند، نقش بسزایی دارد با توجه به کاهش بیان ژن طی متیلاسیون می‌توان اینگونه استناد کرد که سموم ارگانوکلره در کشاورزی از طریق متیلاسیون ژن p16 در القای سرطان کولورکتال نقش بسزایی ایفا می‌کنند.

**کلید واژه‌ها:** سرطان کولورکتال؛ استرس اکسیداتیو؛ آفت‌کش‌های ارگانوکلره؛ متیلاسیون؛ p16؛



**Abstract:**

**Objectives:** There are several factors involved in colorectal cancer. Among the numerous agents, environmental elements and genetic factors have an important role in colorectal cancer incidence. Oxidative stress has the potential role in tumor initiation, promotion and malignant conversion during the development of cancer. As well as wide usage pesticides in agriculture induce oxidative stress and disrupt cellular signaling. These factors can lead to damage all components of the cell, including lipids, proteins, and DNA. In addition, the induction of methylation of tumor suppressing genes by oxidative stress and agricultural pesticides can play a substantial role in the development of colorectal cancer. The p16 gene methylation occurrence, which suppresses expression of this gene, plays a vital role in the development of colorectal cancer. The aim of our study was to investigate the relationship between acetylcholinesterase activity, arylesterase activity of paraoxonase-1, serum levels of malondialdehyde and total antioxidant capacity in serum as oxidative stress parameters, as well as the measurement of serum levels of organochlorine pesticides as an important elements, which caused oxidative stress and DNA methylation, along with the evaluation of p16 gene methylation status, and the association of p16 gene methylation with stress oxidation factors and organochlorine toxins in the patient with colorectal cancer compared with the control group.

**Methods:** In this case-control study, a total of 42 patients with colorectal cancer and 30 healthy subjects were selected. The enzymatic activity of acetylcholinesterase was measured according to Ellman's modified method. The arylesterase activity of paraoxonase-1 was evaluated by using the phenylacetate as substrate. Serum levels of malondialdehyde and total antioxidant capacity were also measured based on the Naxifer kit protocol. After serum extraction of organochlorine pesticides, the serum levels of these pesticides were measured by Gas chromatography method. Genomic DNA extracted after treatment with Sodium-bisulfite was investigated using Nested methylation-specific PCR.

**Results:** The mean age and BMI of subjects with colorectal cancer were significantly higher than

the control group ( $P < 0.0001$ ). Current results demonstrated that the acetylcholinesterase activity and arylesterase activity of paraoxonase-1 in the patient group were significantly lower than the control group ( $P < 0.0001$ ). Comparing the patient group with control group illustrated that the serum level of malondialdehyde and total antioxidant capacity in the serum of patient group were significantly higher than the control group ( $P < 0.0001$ ). Correlation coefficient of the factors in the patient group showed a significant and inverse correlation between plasma level of TAC and age. Also, there was a significant and inverse correlation between TAC and paraoxonase-1 arylesterase activity. Present results of organochlorine pesticides showed that the serum level of each of the seven pesticides selected in this study was significantly higher in the patient group compared to the control group ( $P < 0.0001$ ). Also, there was a significant negative correlation between serum Beta-HCH and Gama-HCH levels with AChE activity in the patient group. Current finding was determined that the serum level of MDA and the activity of arylesterase paraoxonase-1 in different states of methylation were significantly different. Also, the level of Gama-HCH was significantly different in methylated states of P16 gene.

**Conclusion:** Regarding the significant high levels of organochlorine pesticides in the patient group compared with the control group and increasing the BMI and body fat mass in the patient group, we conclude that, it can hold organochlorine toxins for a long time and thus contribute to cell damages. Increasing serum levels of organochlorine pesticides along with increased levels of MDA and TAC and decreasing activity of AChE and arylesterase activity of paraoxonase-1 in the patient group indicated that organochlorine pesticides have an important role in the induction of stress oxidative agents. Also, the reduction of AChE activity in people with colorectal cancer can be attributed to exposure to organochlorine pesticides and the development of oxidative stress. Therefore, the role and importance of high levels of organochlorine in these diseases was established. Also, in this study, the p16 gene methylation rate was increased. One of the effective factors in p16 gene methylation was organochlorine pesticides, especially Gama-HCH.

**Key words:** colorectal cancer; acetylcholinesterase; paraoxonase; total antioxidant capacity; malondialdehyde; pesticides; methylation; p16;