بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشکده پزشکی

گروه بیوشیمی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد (MSc) در رشته بیوشیمی بالینی

عنوان:

تاثیر اسید رتینوئیک تمام ترانس و DAPT (مهارکننده گاما سکرتاز) بر روی سلول های سرطانی معده

استاد راهنما:

دکتر مجتبی امانی

دکتر علی نیاپور

استاد مشاور:

دکتر فریس فراستی

نگارش:

الهام پات راد

سال تحصیلی ۹۲-۹۱

شماره پایان نامه: ۰۸

تقدیم به

تقدیم به روح پدر بزرگوارم

به پاس رنج سالیان

به او که سالار لحظه لحظه های زندگی من بود

او که در باغ زندگی غنچه حیاتش را به ثمر رساند

و با دست های طلایی اش همواره زمینه کسب

معرفت و علم را برایم فراهم نمود

مرد سخاوت و مهربانی ، مظهر استواری و اراده

او که سرگردانی و یاس در پناهش به شجاعت می گراید.

تقدیم به مادر عزیزتر از جان و مهربانم

او که شانه هایش تکیه گاه امن بودنم

آغوشش اعتبار سبز ماندنم می باشد

او که خستگی با وجودش بیگانه است

ومن هر زمان که از دلتنگی ام به او پناه بردم

محکم و استوار و صبورش یافتم

این بالاترین درسی بود که از بزرگترین آموزگار زندگی ام آموختم

تقدیم به برادران عزیزم

شریک تلخترین و شیرین ترین خاطراتم

که حضورشان شادی بخش لحظه هایم

وجودشان مایه غرور و افتخارم

و دوست داشتنشان شیرین ترین لذت زندگی من است

تقدیر و سپاس

حمد وسپاس پروردگار عالم را که به یمن عنایت خویش و لطف عزیزان توفیق یافتم این مجموعه را تقدیم به مشتاقان و علاقه مندان به علم و دانش نمایم.

اساتید راهنما جناب آقایان دکتر امانی و دکتر نیاپور که با رهنمود های ارزشمند در به ثمر رساندن پایان نامه مرا یاری فرمودند.

استاد مشاور جناب آقای دکتر فراستی که در هیچ یک از مراحل از هیچ گونه مساعدت و کمکی به من دریغ نکرده و همواره مشاوره های ارزشمندشان کارگشای من بوده است.

سپاسگزاری

برخود واجب میدانم از زحمات اساتید محترم داور جناب آقای دکتر عابدی ، جناب آقای دکتر محمدی و جناب آقای دکتر ماذنی که زحمت داوری این رساله را متقبل شدند کمال تشکر وسپاسگزاری را داشته باشم.

همچنین لازم است صمیمانه ترین تشکر خود را از زحمات بی دریغ سرکار خانم گلمغانی ، جنا ب آقای مهندس محمد نیا و جناب آقای جعفری ابراز نمایم.

از تمامی دوستان عزیزم در کمیته تحقیقات دانشجوییی ، آزمایشگاه جنین شناسی و سلول های بنیادی، آزمایشگاه فارماکولوژی و آزمایشگاه ژنتیک بیمارستان امام خمینی که به نحوی یاریگر من در به ثمر رساندن این پایان نامه بودند تشکر و سپاسگزاری می نمایم.

و در نهایت از هم اتاقی های عزیزم که در مدت دو سال مانند خواهری مهربان شریک تلخترین و شرین ترین لحظات زندگی من شدند، سرکار خانم دکتر ها زهرا نورانی ، بهاره جوانی، فرزانه جعفر زاده، الهام قلی زاده و ویدا نورانی بسیار متشکرم.

فهرست مندرجات

عنوان صفحه

فصل اول:مقدمه و بیان مساله

۱.۱ سرطان ۲

۱.۱.۱سرطان دستگاه گوارش ۵

۱.۱.۱.۱سرطان معده..... ٦

۲.۱ مسیر پیام رسان Notch ۹

۱.۲.۱ Notch و سلول های بنیادی..... ۱۰

۲.۲.۱ Notch در تکثیر و تمایز ۱۰

۳.۲.۱ ساختار رسپتورها و لیگاندهای مسیر Notch ۱۰

٤.۲.۱ فعال سازی مسیر Notch ۱۳

۱.٤.۲.۱.شکافت S1 با واسطه آنزیم فورین ۱٤

۲.٤.۲.۱ شکافت S2 با واسطه متالوپروتئاز..... ۱۵

۳.٤.۲.۱ شکافت S3 با واسطه γ- سکرتاز ۱٦

۵.۲.۱ وقایع هسته ای مسیر پیام رسان Notch ۱۷

٦.۲.۱ Notch و سرطان ۱۸

۱.٦.۲.۱ Notch و سرطان معده ۲۱

۷.۲.۱ مورد هدف قرار دادن Notch به عنوان یک روش درمانی ۲۲

۱.۷.۲.۱ مهارکننده های γ-سکرتاز ۲۲

۳.۱ مسیر پیام رسان رتینوئیک اسید ۲۵

۱.۳.۱ پیام رسانی رتینوئیک اسید به صورت فیزیولوژیکی ۲۵

۲.۳.۱ رتینوئیدها و متابولیسم آنها ۲۶

۳.۳.۱ رسپتورهای مسیر سیگنالینگ اسید رتینوئیک ۳۰

۴.۳.۱ رتینوئیک اسید و سرطان ۳۲

۵.۳.۱ اسید رتینوئیک تمام ترانس (ATRA)(Tretinion) ۳۳

۴.۱ انواع مرگ سلولی و تعاریف آن ۳۵

۱.۴.۱ نکروز(Necrosis) ۳۵

۲.۴.۱ آپوپتوز(Apoptosis) ۳۵

۳.۴.۱ فعالیتهای اساسی آپوپتوز ۳۶

۴.۴.۱ اجزاء آپوپتوز در سلولهای پستانداران ۳۶

۱.۴.۴.۱ کاسپازها ۳۷

۲.۴.۴.۱ خانواده پروتئینهای Bcl-2 ..... ۳۷

۳.۴.۴.۱ کوفاکتورهای فعال کننده کاسپازها ۳۸

۵.۴.۱ مسیرهای درگیر در آپوپتوز ۳۸

۵.۱ اهداف و فرضیات ۳۹

۱.۵.۱ اهداف و فرضیات ۳۹

۲.۵.۱ اهداف اختصاصی ۳۹

۳.۵.۱ فرضیات ٤۱

فصل دوم: بررسی متون

۱.۲ بررسی متون علمی ٤٤

فصل سوم: مواد و روش ها

۱.۳ مواد و تجهیزات مورد استفاده ۵۰

۱.۱.۳ مواد مورد استفاده ۵۰

۲.۱.۳ ظروف و مواد مصرفی ۵۱

۳.۱.۳ تجهیزات مورد استفاده ۵۲

۲.۳ اطلاعات مربوط به متدولوژی پایان نامه: ۵۵

۱.۲.۳جدول متغییرها ۵۵

۲.۲.۳ نوع مطالعه ۵۵

۳.۲.۳ جامعه آماری و روش حجم نمونه ۵۵

٤.۲.۳ زمان و مکان مطالعه ۵۵

۵.۲.۳ ملاحظات اخلاقی ۵٦

۳.۳ روش انجام کار ٥٦

۱.۳.۳ تهیه رده سلولی ٥٦

۱.۳.۳ ذوب کردن ویال حاوی سلول ٥٧

۲.۳.۳ تعویض محیط کشت ٥٨

۳.۳.۳ پاساژ سلولی ٥٨

٤.۳.۳ منجمدکردن سلول ها.....٥٩

٥.۳.۳ شمارش سلولی به روش Trypan blue dye exclusion ٦٠

٦.۳.۳ روش سنجش میزان حیات سلولی MTT ٦٢

۱.٦.۳.۳تعیین غلظت موثر رتینوئیک اسید بر روی رده سلولی AGS.....٦٣

۲.٦.۳.۳ تعیین غلظت موثرDAPTبر روی رده سلولی AGS ٦٤

۳.٦.۳.۳ بررسی اثر همزمان RA و DAPT بر روی رده سلولی AGS ٦٥

۸.۳.۳ بررسی فعالیت کاسپاز ۷و۳ در روند آپوپتوز.....٦٧

۹.۳.۳ بررسی آپوپتوز بااستفاده از تکنیک RT-PCR.....٧١

۱.۹.۳.۳ استخراج RNA.....٧١

۲.۹.۳.۳. تعیین غلظت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری نانودراپ....٧٢

۳.۹.۳.۳.سنتز cDNA از RNA استخراج شده.....٧٣

٤.۹.۳.۳ RT-PCR.....٧٥

۱۰.۳.۳ تجزیه و تحلیل داده ها ۷۸

فصل چهارم: نتایج

۱.٤ تاثیر غلظت های متفاوت اسید رتینوئیک تمام ترانس(ATRA) بر میزان حیات سلول های سرطانی معده از رده AGS.....۸۰

۲.٤ تاثیر غلظت های متفاوت مهارکننده گاما سکرتاز(DAPT) بر میزان حیات سلول های سرطانی معده از رده AGS ۸۲

۳.٤ بررسی اثر توام RA و DAPT بر میزان حیات سلول های سرطانی معده از رده AGS ۸٤

٤.٤ بررسی آپوپتوز با استفاده از رنگ آمیزی AO/EB ۸٦

٤.٥ بررسی آپوپتوز با استفاده از کیت Caspase-Glo 3/7 .....۹۰

٦.٤ بررسی آپوپتوز با استفاده از تکنیک RT-PCR ۹۲

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

۱.٥نتیجه گیری.....۹۹

۲.٥ محدودیت ها.....۱۰۰

۳.٥ پیشنهادات ۱۰۰

٤.٥ منابع.....۱۰۲

فهرست جداول و نمودارها

عنوان صفحه

جدول ۱-۳ خصوصیات رده سلولی AGS.....۵۶

جدول ۲-۳ گروه بندی انجام شده برای بررسی اثر همزمان DAPT و RA ۶۵

جدول ۳-۳ نام و مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در واکنش های RT-PCR.....۷۵

جدول ۳-٤ برنامه دمایی و زمانی مراحل واکنشRT- PC ۷۶

جدول ٤-۱ القاء آپوپتوز در سلول های سرطانی رده AGS ۸۶

نمودار ٤-۱ میزان حیات سلول های AGS در غلظت های مختلف RA با روش MTT.....۸۱

نمودار ٤-۲ میزان حیات سلول های AGS در غلظت های مختلف DAPT با روش MTT.....۸۳

نمودار ٤-۳ میزان حیات سلول های AGS در غلظت ثابت μM ۱۰از DAPT و غلظت های متفاوت رتینوئیک اسید با روش MTT.....۸۵

نمودار ٤-٤ فعالیت کاسپاز های ۳ و۷ به دنبال تیمار سلول های رده AGS ۹۱

فهرست اشکال

عنوان صفحه

شکل ۱-۱. شش علامت کلیدی سرطان.....۵

شکل ۱-۲. دستگاه گوارش.....٦

شکل ۱-۳. نمونه ای از آدنوکارسینومای معده به همراه تصویر اندوسکوپیک.....۸

شکل ۱-٤. رسپتورهای Notchانسانی.....۱۲

شکل ۱-۵ لیگاند Notch.....۱۳

شکل ۱-٦ هسته مرکزی مسیر پیام رسان Notch ۱۷

شکل ۱-۷. دوگانگی عملکرد Notch در سرطان ۲۱

شکل ۱-۸. فرمول باز مولکولی مهارکننده γ سکرتاز(DAPT).....۲٤

شکل ۱-۹. فعالیت کمپلکس γ-سکرتاز بلوکه شده توسط DAPT.....۲۵

شکل ۱-۱۰. متابولیسم مسیر رتینوئیک اسید و عملکرد عوامل موثر بر آن.....۲۸

شکل ۱-۱۱. ساختار شیمیایی برخی از رتینوئیدهای سنتزی و فیزیولوژیکی.....۲۹

شکل ۱-۱۲. نحوه فعال سازی و عملکرد هترودایمرهای RAR/RXR.....۳۱

شکل ۱-۱۳. ساختار مولکولی رسپتورهای هسته ای و مکانیسم اتصال بهDNA.....۳۲

شکل ۱-۱٤. ساختار مولکولی اسید رتینوئیک تمام ترانس(ATRA).....۳٤

شکل ۱-۱۵. a) تصویر SEM یک سلول آپوپتوتیک. b) تصویر SEM یک سلول نکروتیک...۳۵

شکل ۱-۱٦. شکل شماتیک نشان دهنده تفاوتهای سلولی میان فرایندهای آپوپتوز و نکروز.....۳٦

شکل ۱-۱۷. شکل شماتیک نشان دهنده مسیر داخلی و خارجی آپوپتوز.....۳۹

شکل ۳-۱ برخی از تجهیزات مورد استفاده.....٥٤

شکل ۳-۲. سلول های کشت شده لاین سلولی.....۵٦

شکل ۳-۳. نمایی از هموسایتومتر و نحوه شمارش سلول ها در این سیستم.....٦۱

شکل ۳-٤. نمونه ای از پلیت MTT شده.....٦۳

شکل ۳-۵. چهارچوب آزمایش انجام شده در جهت تعیین غلظت موثر رتینوئیک اسید.....٦٤

شکل ۳-٦. چهارچوب آزمایش انجام شده در جهت تعیین غلظت موثره DAPT.....٦۵

شکل ۳-۷. چهارچوب آزمایش انجام شده در جهت بررسی اثر همزمان RA و DAPT.....٦٦

شکل ۳-۸. نحوه برهم کنش سوبسترا در کیت.....٦۸

شکل ۳-۹. شکل شماتیک نشان دهنده روش کار کیت ۷۰

شکل٤-۱القاء آپوپتوز در سلول های سرطانی AGS در غلظت ۲۵ میکرومولار از رتینوئیک.....۸۷

شکل٤-۲ القاء آپوپتوز در سلول های سرطانی AGS در غلظت ۱۰میکرومولار از DAPT ۸۸

شکل ٤-۳. القاء آپوپتوز در سلول های سرطانی AGS در غلظت ۱۰ میکرومولار DAPT و ۲۵ میکرومولار RA به طور هم زمان ۸۹

شکل٤.٤. RT-PCR انجام شده برای ژن های Caspase 3 و Bcl-2 .....۹۲

فهرست اختصارات

Abbreviation

AO	Acridine Orange
ADAM	A Desintegrin and Metallopeptidase
APL	Acute Promyeloid Leukemia
ARAT	Acyl-CoA retinol acyl transferase
ATRA	All-Trans Retinoic Acid
ASR	Age Standardized Incidence Rate
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
°C	Centigrade
COX	Cyclooxygenase
Caspase	Cystein-dependent aspartat specific proteas
CRBP 1	Cytoplasmic retinol-binding protein 1
CSL	CBF-1/Su(H)/Lag-1
DLS	Delta and OSM-11-like
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DOS	Delta/Serrate/LAG-2
DR	Direct Repeat
EGF	Epidermal Growth Factor
FBS	Fetal Bovin Serum
GSI	Gamma-secretase inhibitor
HNSCC	Head and neck squamous carcinoma cell
IR	Inverted Repeat
LNR	LIN-12 /Notch related
LRAT	Lecithin-retinol acyl transferase

miR-34	micro RNA-34
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-y1]-2,5 dipenyltetrazolium bromide
NECD	Notch Extracellular Domain
NICD	Notch Intracellular Domain
NRR	Negative Regulatory Region
PBS	Phosphat buffered saline
RA	Retinoic Acid
RAER	Retinoic acid elements response
RAM	RBP-Jκ associated molecules
RAR	Retinoic acid Receptor
RBP4	Retinol-binding protein 4
STRA 6	Stimulated by retinoic acid gene 6
TAD	Transcriptional Activation Domain

تاثیر اسید رتینوئیک تمام ترانس و DAPT (مهارکننده گاما سکرتاز) بر روی سلول های سرطانی معده

چکیده

مقدمه: سرطان معده شایع ترین سرطان جهان و دارای بالاترین میزان مرگ ومیرهای مربوط به سرطان می باشد. مسیر پیام رسانی سلولی Notch نقش مهمی در حفظ تعادل میان تکثیر سلولی و آپوپتوز ایفا می کند. فعالیت نا بجای این مسیر در توسعه و پیشرفت بسیاری از بدخیمی‌ها از جمله سرطان معده نقش دارد. در تحقیقات اخیر مسیر سیگنالیگ Notch به عنوان یک هدف دارویی برای درمان بسیاری از سرطان ها مورد توجه قرار گرفته است. فعالیت این مسیر مستلزم ایجاد شکافتی توسط کمپلکس گاما سکرتاز می باشد. DAPT، **یا** دی پپتید N-[N-(3, 5-difluorophenacetyl) - L-alanyl]-S-phenyl glycine-t-butyl ester در واقع یک ترکیب شیمیایی است که با مهار عملکرد آنزیم γ-secretase از تولید NICD جلوگیری و باعث مهار مسیر پیام رسانی Notch می شود. از طرف دیگر رتینوئیک اسید و مشتقات آن (رتینوئیدها) به دلیل داشتن ویژگی های ضد تکثیری، آنتی اکسیدانی، پروآپوپتوتیک و اثر تمایزی به عنوان یک ماده شیمی درمانی و Chemopreventive. بالقوه مورد استفاده قرار می گیرند. اخیرا رتینوئیک اسید تمام ترانس (ATRA) به عنوان یک داروی تایید شده برای درمان بیماران مبتلا به لوسمی پرومیولوتیک حاد (APL) استفاده می شود

مواد و روش ها: در این مطالعه سلول های سرطانی معده رده AGS با غلظت های مختلف(۲.۵، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ میکرومولار) از رتینوئیک اسید تمام ترانس، (٤، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ میکرومولار) از DAPT به مدت ۷۲ ساعت تیمار شدند. سمیت ایجاد شده با روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین از رنگ آمیزی اکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید برای شناسایی سلول های آپوپتوتیک مورد استفاده قرار گرفت. همچنین میزان فعالیت Caspase 3, 7 با استفاده از کیت لومینسانس ارزیابی شده و در جهت تایید فرایند آپوپتوز القاء شده با روش RT-PCR نیز مورد تایید قرار گرفت.

نتایج: بررسی نتایج MTT نشان دهنده بیشترین میزان مرگ در غلظت های ۱۰میکرومولار DAPT و ۲۵ میکرومولارATRAبود.به همین دلیل ادامه آزمایش با این دو غلظت و ترکیب آنها انجام گرفت که نتایج حاصل از رنگ آمیزی آکریدین اورنج اتیدیوم بروماید نشان دهنده افزایش تعداد سلول های

آپوپتوتیک پس از تیمار با ترکیب دو غلظت ۱۰ میکرومولار DAPT و ۲۵ میکرومولار ATRA بود. علاوه بر این نشان دادیم که تیمار سلول های سرطانی معده با ترکیب DAPT و ATRA احتمالا از طریق افزایش فعالیت کاسپاز ۳ و ۷ می توانند باعث القاء آپوپتوز در این سلول ها شود. همینطور نتایج RT-PCR نشان داند که در گروه ترکیبی این دو ماده میزان بیان Caspase 3 در مقایسه با گروه کنترل افزایش می یابد

نتیجه گیری: طبق نتایج این مطالعه مشخص شد که دو ماده DAPT و ATRA ,و ترکیب آنها احتمالا از طریق القاء آپوپتوز اثرات سمی خود را بر روی سلول های سرطانی معده از رده AGS اعمال می نمایند. و میتوانند در حوزه شیمی درمانی به عنوان موادی ارزشمند مد نظر قرار گیرند.

کلمات کلیدی: سرطان معده، اسید رتینوئیک تمام ترانس، DAPT، آپوپتوز

فصل اول

مقدمه و بیان مساله

۱.۱ سرطان

سرطان در لغت به معنای خرچنگ و به عبارت دیگر درد بی درمان است. اما در بیولوژی، سرطان مجموعه ای از بیماری های مختلف است که در بافت ها و اندام های گوناگون بدن شکل می گیرد[۱]. وجه اشتراک بین تمام انواع این ناهنجاری ها، رشد بی قاعده و لجام گسیخته سلولهای بدن است که اغلب بدون وجود درمانی مؤثر، به مرگ منتهی می شود. سالانه در ایالت متحده آمریکا سرطان یک پنجم مرگ و میر ها رابه خود اختصاص میدهد[۲]. در سطح جهان در هر سال از هر ۱۰۰۰۰۰ نفر به طور میانگین ۱۰۰ تا ۳۵۰ نفر جان خود را بر اثر سرطان از دست می دهند. در ایران سرطان سومین عامل مرگ و میر پس از بیماری های قلبی و سایر عوامل میباشد. اگرچه رشد مرگ و میر های ناشی از این بیماری در دهه های اخیر چشم گیر و غیر قابل اغماض بوده است[۳]. انواع سرطان را می توان بر مبنای منشأ سلولی آن تقسیم بندی نمود. اکثر سرطان ها جزء یکی از۳ گروه عمده زیر قرار می گیرند.

۱. کارسینوما[1] که شامل تقریباً ۹۰ درصد سرطان های انسانی و در حقیقت بدخیمی سلول های اپیتلیال هستند.
۲. سارکوما [2] که به ندرت در انسان مشاهده می شوند و شامل تومورهای جامد از بافتهای پیوندی نظیر عضله، استخوان، غضروف و بافت فیبروزی هستند.
۳. لوسمی[3] و لنفوما[4] که تقریباً۷ درصد بدخیمی های انسان را به ترتیب با منشأ سلولهای تشکیل دهنده خونی و سلولهای سیستم ایمنی شامل می شوند.

تومورها را بر اساس منشأ بافتی آنها (مانند کارسینومای ریه و سینه) و نوع سلول های درگیرشده، تقسیم بندی گسترده تری نیز می‌نمایند. برای مثال فیبروکارسینوما [5] از فیبروبلاست و اریتروئید لوسمی، از

1 Carcinomas
2 Sarcoma
3 Leukemia
4 Lymphomas
5 Fibrocarcinoma