

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه دکترای عمومی

عنوان:

**بررسی اثرات ضدسرطانی ترکیب رتینوئیک اسید تمام ترانس
وداکاربازین بر روی سلولهای سرطانی CD117 مثبت مشتق از زرده
مقاوم ملانوما A375**

استاد راهنما:

دکتر نوروز نجف زاده

اساتید مشاور:

دکتر محمد قاسم گل محمدی

دکتر محمد محمدزاده

نگارش: الهام محبی

تابستان 97

شماره‌ی پایان نامه: 0694

ماحصل آموخته هایم را تقدیم می کنم به آنان که مهر آسمانی شان آرام بخش آلام زمینی است

به استوارترین تکیه گاهم، دستان پرمهر پدرم

به سبزترین نگاه زندگیم، چشمان سبز مادرم

به همسفران مهربان زندگیم، خواهر و برادر عزیزم

که هرچه آموخته ام در مکتب عشق شما آموختم و هرچه بکوشم قطره ای از دریای بی کران

مهربانیان را سپاس نتوانم بگویم.

امروز هستی ام به امید شماست و فردا کلید باغ بهشتم رضای شما

ره آوردی گرانتر از این ارزان نداشتن تا به خاک پایتان نثار کنم باشد که حاصل تلاشم نسیم گونه

غبار خستگیان را بزداید.

بوسه بردستان پرمهرتان

تقدیر و سپاس

سپاس ایزد منان که به من این فرصت را داد تا به این مرحله از علم رسیده و از هیچ محبتی دریغ نکرد و در

تمام مراحل زندگی مرا قوت قلب بود

بسی شایسته است از استاد راهنمای اول، استادی فرهیخته و فرزانه جناب آقای دکتر نوروز نجف زاده که با

کرامتی چون خورشید ، سرزمین دل را روشنی بخشیدند و گلشن سرای علم و دانش را با راهنمایی های کار

ساز و سازنده بارور ساختند و بنده را همواره مورد لطف و محبت خود قرار داده اند؛ تقدیر و تشکر نمایم.

سپاس و تقدیر فراوان از دوست عزیزم خانم بهاره محمدی جوبنی که در انجام این تحقیق مرا یاری

رساندند.

بررسی اثرات ضد سرطانی ترکیب رتینوئیک اسید تمام ترانس وداکاربازین بر روی سلولهای سرطانی CD117⁺

مشتق از رده مقاوم ملانوما A375

چکیده

سابقه وهدف: ملانوما یکی از شایع ترین فرم های سرطان پوست می باشد که دارای انواع مختلف سلول می باشند که با مارکرهای سطحی شناخته شده اند. رسپتور CD117 در روی ملانوسیت ها قرار دارد که فاکتورهای رشد سلولهای بنیادی به آن متصل می شوند و باعث تکثیر، مهاجرت سلولهای ملانوسیت می شوند. داکاربازین داروی شیمی درمانی مورد تایید FDA برای درمان ملانوما می باشد. مطالعات نشان داده است که رسپتور RAR β در سلولهای ملانوما بیان می شود و رتینوئیک اسید با واسطه رسپتور RAR β باعث مهار فرایند گلیکولیز می شود، لذا در این مطالعه تاثیر ترکیب داکاربازین و رتینوئیک اسید تمام ترانس را بر روی سلولهای CD117⁺ بررسی کردیم.

مواد و روش ها: سلول های ملانوما A375 در محیط کشت DMEM کشت داده شده و سلول های CD117⁺ توسط تکنیک مکس جداسازی شدند. اثرات سمیت دارویی رتینوئیک اسید تمام ترانس (8، 12، 16، 24، 32 و 64 میکرومولار)، داکاربازین (400، 800، 1000، 1400، 1200 و 1800 میلی گرم) به طورمجزا و ترکیب دوزهای مختلف داکاربازین با رتینوئیک اسید با روش فعالیت متابولیکی (MTT)، رنگ آمیزی آکریدین نارنجی و اتدیوم بروماید انجام شد و بررسی توقف سیکل سلولی با رنگ آمیزی 2-4-دی آمینو-2- فنیل ایندول دی هیدرو کلراید (DAPI) به روش فلوسایتومتری مطالعه شد.

نتایج: مقدار IC₅₀ در سلول های سرطانی CD117⁺ تیمار شده با غلظت های مختلف ATRA¹ و داکاربازین تعیین شد و در این مطالعه ما نشان دادیم که ترکیب ۲۰ میکرو مولار رتینوئیک اسید با داکاربازین باعث کاهش معنی دار IC₅₀ در مقایسه با گروه داکاربازین به تنهایی شد ($P < 0.05$). نتایج ما نشان داد که در گروه ترکیبی با افزایش غلظت رتینوئیک اسید، داکاربازین باعث افزایش تعداد سلولهای آپوپتوتیک و نکروتیک می شود. علاوه بر این، داکاربازین باعث توقف سیکل سلولی در مرحله S شد و ترکیب داکاربازین با رتینوئیک اسید باعث توقف معنی داری سیکل سلولی در مرحله G0/G1 شد.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که ترکیب رتینوئیک اسید با داکاربازین توانایی القاء مرگ سلولهای سرطانی CD117⁺ ملانوما را دارند و ممکن است در آینده در درمان ملانوما استفاده شود.

واژگان کلیدی: سلولهای بنیادی سرطان، رده سلولی A375، مارکر CD117، رتینوئیک اسید تمام ترانس،

داکاربازین

¹ All-Trans Retinoic Acid

فصل اول: طرح تحقیق 1

Error! Bookmark not defined. 1-1 مقدمه و بیان مسئله

Error! Bookmark not defined. 2-1 تعریف واژه‌های کلیدی

Error! Bookmark not defined. 1-2-1 داکارباژین

Error! Bookmark not defined. 2-2-1 رتینوئیک اسید تمام ترانس

Error! Bookmark not defined. 3-2-1 ملانوما

Error! Bookmark not defined. CD117 4-2-1

Error! Bookmark not defined. 3-1 اهداف و فرضیات

Error! Bookmark not defined. 1-3-1 هدف کلی

Error! Bookmark not defined. 2-3-1 اهداف اختصاصی

Error! Bookmark not defined. 3-3-1 اهداف کاربردی

Error! Bookmark not defined. 4-3-1 فرضیات یا سؤالات تحقیق

فصل دوم: پیشینه تحقیق Error! Bookmark not defined.

Error! Bookmark not defined. 1-2 ملانوما

Error! Bookmark not defined. 2-2 چرخه سلولی

Error! Bookmark not defined. 3-2 آپتوز

Error! Bookmark not defined. 4-2 سلول‌های بنیادی سرطان

Error! Bookmark not defined. 5-2 مارکرهای سلول‌های بنیادی

Error! Bookmark not defined. 6-2 رتینوئیک اسید تمام ترانس

Error! Bookmark not defined. 7-2 رتینوئیک اسید و ملانوما

<u>Error! Bookmark not defined.</u>	<u>8-2 مطالعات جهان</u>
<u>Error! Bookmark not defined.</u>	<u>9-2 مطالعات ایران</u>
<u>Error! Bookmark not defined.</u>	<u>فصل سوم: شیوه اجرای تحقیق</u>
<u>Error! Bookmark not defined.</u>	<u>1-3 نوع پژوهش</u>
<u>Error! Bookmark not defined.</u>	<u>2-3 مکان و زمان انجام مطالعه</u>
<u>Error! Bookmark not defined.</u>	<u>3-3 فهرست تجهیزات آزمایشگاهی مورد استفاده</u>
<u>Error! Bookmark not defined.</u>	<u>4-3 فهرست وسایل و ظروف آزمایشگاهی مورد استفاده</u>
<u>Error! Bookmark not defined.</u>	<u>5-3 فهرست مواد، ترکیبات شیمیایی و کیت های آنزیمی مورد استفاده در تحقیق</u>
	<u>defined.</u>
<u>Error! Bookmark not defined.</u>	<u>6-3 رده سلولی</u>
<u>Error! Bookmark not defined.</u>	<u>7-3 روش تهیه مواد استفاده شده در تحقیق</u>
<u>Error! Bookmark not defined.</u>	<u>1-7-3 روش تهیه ی 1 لیتر محلول PBS (1X)</u>
<u>Error! Bookmark not defined.</u>	<u>2-7-3 روش تهیه 1 لیتر محیط کشت DMEM</u>
<u>Error! Bookmark not defined.</u>	<u>3-7-3 روش تهیه ی تریپسین-EDTA</u>
<u>Error! Bookmark not defined.</u>	<u>4-7-3 نحوه تهیه بافر جدا کننده مورد استفاده در MACS</u>
<u>Error! Bookmark not defined.</u>	<u>5-7-3 روش تهیه ی رنگ MTT</u>
<u>Error! Bookmark not defined.</u>	<u>6-7-3 روش تهیه ی محلول DAPI با غلظت 5 میلی گرم بر میلی لیتر</u>
	<u>defined.</u>
<u>Error! Bookmark not defined.</u>	<u>7-7-3 روش تهیه ی 10 سی سی آکریدین اورنج-تدیوم بروماید</u>
	<u>defined.</u>
<u>Error! Bookmark not defined.</u>	<u>3-7-8 نحوه ی تهیه بافر (0.5M) EDTA</u>
<u>Error! Bookmark not defined.</u>	<u>8-3 کشت سلولی</u>
<u>Error! Bookmark not defined.</u>	<u>1-8-3 نحوه ی پاساژ دادن سلول ها</u>

Error! Bookmark not defined...... 2-8-3 تعویض محیط کشت سلول

Error! Bookmark ... 4-8-3 روش انجام تکنیک MACS (Magnetic Activate Cell Sorting)
not defined.

Error! Bookmark not defined...... 5-8-3 روش MTT

Error! Bookmark not defined...... 6-8-3 بررسی چرخه سلولی با دستگاه فلو سایتومتری

Error! Bookmark not 3-8-7 بررسی آپوپتوز سلولی با رنگ آمیزی آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید
defined.

Error! Bookmark not defined...... 9-3 آنالیز آماری

Error! Bookmark not defined...... فصل چهارم: نتایج

Error! Bookmark not defined...... 1-4 کشت سلول های ملانوما A375

Error! Bookmark not 2-4 نتایج حاصل از تکنیک MACS (Magnetic Activate Cell Sorting)
defined.

3-4 تاثیر غلظت های مختلف داکارباژین، رتینوئیک اسید تمام ترانس و گروه ترکیبی بر میزان آپوپتوز سلولهای

Error! Bookmark not defined...... CD117⁺

Error! Bookmark not 4-4 نتایج رنگ آمیزی آکریدین اورنج- اتیدیوم بروماید و بررسی میزان آپوپتوز
defined.

Error! Bookmark not defined...... 5-4 نتایج اثر گروه های دارویی بر توقف سیکل سلولی

Error! Bookmark not defined...... فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

Error! Bookmark not defined...... 1-5 بحث

Error! Bookmark not defined...... 2-5 نتیجه گیری

Error! Bookmark not defined...... 3-5 محدودیت های تحقیق

Error! Bookmark not defined...... 4-5 پیشنهادات

58 منابع

62 پیوست ها

فهرست نمودارها

نمودار 1-4 آنالیز سمیت سلولی غلظتهای مختلف DAC، DAC/ATRA و ATRA بر روی سلولهای CD117⁺.....
43

نمودار 2-4 مقایسه درصد آپوپتوز سلولهای CD117⁺ در گروههای مختلف داکاربازین به تنهایی و غلظت های مختلف داکاربازین گروه ترکیبی 10 و 20 میکرومولار رتینوئیک اسید.....
44

نمودار 3-4. منحنی توزیع سلولها در مراحل مختلف سیکل سلولی در فلوسیتومتری.....
48

فهرست تصاویر

شکل 1-4 سلولهای ملانوما

40.....A375

شکل 2-4. جدا سازی سلولهای CD117⁺ با روش MACS.....
41

شکل 3-4 سلولهای زنده، آپوپتوتیک و نکروتیک در گروه های مختلف بعد از تیمار با داکاربازین و ترکیب آن با رتینوئیک اسید بعد از رنگ آمیزی با آکریدین ارنج / اتدیوم بروماید.....
45

فهرست جداول

جدول 1-4 سلولهای CD117⁺ با غلظت‌های مختلف atRA/DAC, ATRA و DAC تیمار شدند و میزان IC₅₀ توسط سنجش MTT (48h) محاسبه شد. *P> 0.05.....42

جدول 2-4 درصد میانگین وانحراف معیار توقف سیکل سلولی در اثر گروه های مختلف دارویی.....47

تعریف علائم اختصاری:

µg	Microgram
µM	Micro Molar
ASC	Adult Stem Cell
ATRA	All-trans Retinoic Acid
bFGF	Fibroblast Growth Factor
CDK	Cyclin Dependent Kinase
CSC	Cancer Stem Cell
DAPI	4', 6-Di Amidino-2-Phenyl Indole
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
EDTA	Ethylene Di Amine Tetra Acetic acid
HA	Hyaluronic Acid
IC₅₀	Half-maximal inhibitory concentration
MACS	Magnetic Activating Cell Sorting

MTT	3-(4, 5, dimethylthiazol-2yl)-2, 5- diphenyl-tetrazolium bromide
PBS	Phosphate Buffer Saline
RAR-β	Retinoic Acid Receptor
ROS	Reactive Oxygen Species
RXR	Retinoic acid X Receptor
SCF	Stem Cell Factor
UV	Ultraviolet