دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجهٔ کارشناسی ارشد در رشته‌ی بیوشیمی بالینی

تاثیر داروی سیتارابین بر فعالیت میتوکندری سلول‌های $CD34^+$ و $CD34^-$ رده سلولی *KG1-a*

نگارش:

سونا رضایی

اساتید راهنما:

دکتر مجتبی امانی

دکتر محمد محمد زاده

استاد مشاور:

دکتر کیوان امیر شاهرخی

اسفند ماه ۱۳۹۹

شماره پایان نامه: ۰۸۹

تقدیم به پدر بزرگوارم

او که سالار لحظه لحظه‌های زندگی من است

و با دست‌های طلایی‌اش همواره زمینه کسب

معرفت و علم را برایم فراهم نمود

تقدیم به مادر عزیز تر از جان و مهربانم

او که شانه‌هایش تکیه گاه امن من است

او که خستگی با وجودش بیگانه است

و من هر زمان که از دلتنگی‌ام به او پناه بردم

محکم و استوار و صبورش یافتم

تقدیم به برادر عزیزم

شریک تلخ ترین و شیرین ترین خاطراتم

که حضورش شادی بخش لحظه‌هایم

وجودش مایه غرور و افتخارم

تقدیر و سپاس

شکر شایان نثار ایزد منان که توفیق را رفیق راهم ساخت تا این پایان نامه را به پایان برسانم. از اساتید فاضل و اندیشمند جناب آقایان دکتر مجتبی امانی و دکتر محمد محمد زاده به عنوان اساتید راهنما که همواره نگارنده را مورد لطف و محبت خود قرار داه اند، کمال تشکر را دارم.

سپاسگزاری

برخود واجب می‌دانم از زحمات اساتید محترم داور جناب آقای دکتر ،جناب آقای دکتر پرهام محمدی و جناب آقای دکتر رضا علی پناه مقدم و همچنین دکتر علی اکبر فضایلی که زحمت داوری این رساله را متقبل شدند کمال تشکر و سپاسگزاری را داشته باشم.

در نهایت از دوستان، همکلاسی و هم اتاقی‌های عزیزم! سرکار خانم سمیه نوروز زاده و هدیه اسمعیلی از اینکه در این سالها در پیمودن مسیر زندگی در کنار من بودید از شما ممنونم. بی شک بدون حضور شما طی کردن پستی و بلندی‌های این مسیر کسالت بار و خسته کننده بود.

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول: مقدمه

۱-۱ اهمیت موضوع و انگیزه‌ی تحقیق ۳

2-1 اهداف طرح ۳

۱-۲-۱ اهداف کلی ۳

۱-۲-۲ اهداف اختصاصی ۳

۱-۲-۳ اهداف کاربردی ۳

۱-۳ فرضیات ۳

۱-۴ تعریف واژه‌ها ۱۴

فصل دوم: بررسی متون

۲-۱ سرطان ۵

۲-۱-۱ تعریف سرطان ۵

۲-۱-۲ تئوری‌های ایجاد سرطان ۶

۲-۱-۳ دلایل سرطان ۷

۲-۱-۴ مسیرهای پیام رسان سرطان ۸

۲-۱-۴-۱مسیر پیام رسان TGFβ ۸

۲-۱-۴-۲ مسیر پیام رسان Wnt ۹

۲-۱-۴-۳ مسیر پیام رسان Hedgehog ۱۱

۲-۱-۴-۴ مسیر پیام رسان Nf-kb ۱۱

۲-۱-۴-۵ مسیر پیام رسان ROS ۱۳

۲-۲ سلول بنیادی سرطانی ۱۴

۲-۲-۱ نحوه شناسایی سلول بنیادی سرطانی ۱۵

۲-۲-۲ منشا سلول بنیادی سرطانی ۱۶

۲-۲-۳ ویژگی سلول بنیادی سرطانی ۱۷
۲-۳ میتوکندری ۱۸
۲-۳-۱ نقش و ویژگی میتوکندری ۱۸
۲-۳-۲ نقش میتوکندری در سرطان و سلول بنیادی سرطانی ۱۹
۲-۴ رده‌ی سلولی KG1-a و KG1 ، تفاوت بین آن‌ها ۲۲
۲-۵ روش‌های درمانی و داروهای ضد سرطانی ۲۳
۲-۵-۱ روش‌های درمان ۲۳
۲-۵-۱-۱ replicative stress ۲۳
۲-۵-۱-۲ گیرنده‌ی آنتی ژن کایمریک سلول T ۲۴
۲-۵-۱-۳ هدف قرار دادن متابولیسم ۲۴
۲-۵-۱-۴ هدف قرار دادن محیط تومور ۲۶
۲-۵-۱-۵ تمایز درمانی ۲۷
۲-۵-۲ داروهای ضد سرطانی ۲۸
۲-۵-۲-۱ داروهایی بر پایه آنتی بادی ۲۹
۲-۵-۲-۲ داروهایی که متابولیسم را مورد هدف قرار می‌دهد ۲۹
۲-۵-۲-۳ سیتارابین ۳۰
۲-۵-۲-۳-۱ سیتارابین چیست ۳۰
۲-۵-۲-۳-۲ عوامل مقاومت سرطان به سیتارابین ۳۰
۲-۵-۲-۳-۲-۱ کمبود دی اکسی سیتیدین کیناز ۳۰
۲-۵-۲-۳-۲-۲ مهار جزئی سیتارابین در فاز G1/S ۳۱
۲-۵-۲-۳-۲-۳ سلول بنیادی لوسمی ۳۲
۲-۵-۲-۳-۲-۴ فسفریلاسیون اکسیداتیو ۳۲
۲-۵-۲-۳-۲-۵ آنتی اکسیدان ۳۴

فصل سوم: مواد و روش انجام کار

۳-۱ مواد و تجهیزات مورد استفاده ۳۶
۳-۱-۱ مواد مورد استفاده ۳۶

۳-۱-۲ ظروف و مواد مصرفی ۳۶
۳-۱-۳ تجهیزات مورد استفاده ۳۷
۳-۲ روش انجام کار ۳۸
۳-۲-۱ تهیه رده‌ی سلولی ۳۸
۳-۲-۲ دفریز کردن ویال حاوی سلول ۳۸
۳-۲-۳ پاساژ سلولی ۳۹
۳-۲-۴ منجمد کردن سلول ۴۰
۳-۲-۵ روش سنجش میزان حیات سلول از طریق MTT ۴۱
۳-۲-۶ تعیین غلظت موثر سیتارابین بر روی رده‌ی سلولی KG1-a ۴۲
۳-۲-۷ جداسازی سلول‌های $CD34^+$ از KG1-a توسط MACS ۴۲
۳-۲-۸ رنگ آمیزی آکریدین اورنج / اتیدیوم برماید ۴۴
۳-۲-۹ بررسی پتانسیل غشا میتوکندری با استفاده از رنگ آمیزی با رنگ رودامین ۱۲۳ و فلوسایتومتری ۴۵
۳-۲-۱۰ بررسی ROS با استفاده از رنگ آمیزی با Dcfh-da و فلوسایتومتری ۴۶
۳-۳ محاسبات آماری ۴۷

فصل چهارم: نتایج

۴-۱ تاثیر غلظت‌های متفاوت سیتارابین بر میزان حیات سلول‌های سرطانی رده‌ی سلولی KG1-a ۴۹
۴-۲ بررسی آپاپتوز با استفاده از رنگ آمیزی AO/EB بر روی سلول‌های $CD34^+$، $CD34^-$ و KG1-a ۵۰
۴-۳ بررسی اثر سیتارابین بر پتانسیل غشا میتوکندری در سلول‌های $CD34^+$، $CD34^-$ و KG1-a ۵۶
۴-۴ بررسی اثر سیتارابین بر گونه‌های فعال اکسیژن در سلول‌های $CD34^+$، $CD34^-$ و KG1-a ۵۸

فصل پنجم : بحث و نتیجه گیری

۵-۱ بحث ۶۱
۵-۲ نتیجه گیری ۶۷
۵-۳ محدودیت‌ها ۶۸
۵-۴ پیشنهادات ۶۹
منابع ۷۰

فهرست اشکال، جداول و نمودارها

شکل ۴-۱: ایجاد آپاپتوز در سلول‌های KG1-A در غلظت‌های مختلف سیتارابین ۵۰

شکل ۴-۲: آپاپتوز سلول‌های $CD34^-$ رده‌ی سلولی KG1-A ۵۳

شکل 4-3: آپاپتوز سلول‌های $CD34^+$ رده‌ی سلولی KG1-a ۵۴

نمودار ۴-۱: تاثیر غلظت‌های مختلف سیتارابین بر میزان حیات سلول KG1-a توسط MTT ۵۰

نمودار ۴-۲: بررسی آپاپتوز سلول‌ها KG1-a، $CD34^-$، $CD34^+$ پس از تیمار با غلظت‌های مختلف IC_{50} سیتارابین از طریق رنگ آمیزی آکریدین اورنج/ اتیدیوم برماید ۵۵

نمودار ۴-۳: مقایسه آپاپتوز نسبت به گروه KG1-a در غلظت IC_{50} سیتارابین توسط رنگ آمیزی آکریدین اورنج/ اتیدیوم برماید ۵۶

نمودار۴-۴: اثر سیتارابین بر پتانسیل غشا میتوکندری سلول‌های KG1-a، $CD34^-$، $CD34^+$ در فلوسایتومتری ۵۸

نمودار ۴-۵: اثر سیتارابین بر پتانسیل غشا میتوکندری سلول‌های KG1-a، $CD34^-$، $CD34^+$ ۵۸

نمودار ۶-۴: اثر سیتارابین بر ROS سلول‌های KG1-a، $CD34^-$، $CD34^+$ در فلوسایتومتری ۶۰

نمودار ۷-۴: اثر سیتارابین بر ROS سلول‌های KG1-a ، $CD34^-$، $CD34^+$ ۶۰

اختصارات:

CSC	Cancer Stem Cell
AML	Acute Myeloid Leukemia
ROS	Reactive Oxygen Species
HSC	Hematopoietic Stem Cell
LSC	Leukemia Stem Cell
CML	Chronic Myeloid Leukemia
OMM	Outer Mitochondrial Membrane
IMS	Inter Membrane Space
IMM	Inter Mitochondrial Membrane
RC	Respiratory chain
TCA	Tricarboxylic acid
OXOHOS	Oxidative phosphorylation
Cytarabine	Ara-c

تاثیر داروی سیتارابین بر فعالیت میتوکندری سلول‌های KG1-a، $CD34^-$ و $CD34^+$

چکیده:

زمینه: سرطان یک بیماری بدخیم است که یکی از دلایل آن تجمع سلول‌های بنیادی سرطانی (CSCs) است. اگرچه پس از شیمی درمانی بهبودی برای افراد مبتلا به سرطان قابل دستیابی است، اما پس از مدتی به دلیل وجود سلول‌های بنیادی سرطانی این بیماری بر می‌گردد. از طرف دیگر میتوکندری نقش مهمی در تکوین سلول‌های بنیادی سرطانی دارد. همچنین بسیاری از پارامترهای حیاتی سلول مانند تولید انرژی، وضعیت اکسیداسیون و احیا، تولید ROS، کنترل سطوح کلسیم سیتوزولی و شروع آپاپتوز توسط میتوکندری صورت می‌گیرد. انعطاف پذیری متابولیکی و وابستگی به میتوکندری دو نیاز اساسی مقاومت CSCs به شیمی درمانی است. در نتیجه می توانیم با توجه به ویژگی های منحصر به فرد میتوکندری در سلول‌های بنیادی سرطانی آن‌ها را مورد هدف قرار دهیم.

هدف: تعیین تاثیر داروی سیتارابین بر فعالیت میتوکندری‌های سلول‌های $CD34^+$ و$CD34^-$ در رده سلولی KG1-a.

مواد و روش ها: در این مطالعه سلول‌های سرطانی لوسمی میلوئیدی حاد رده KG1-a با غلظت‌های مختلف (۰ تا ۱۰۰۰ میکرومولار) از سیتارابین به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. میزان زنده مانی سلول با روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. سیستم MACS برای جداسازی سلول‌های $CD34^+$ و $CD34^-$ مورد استفاده قرار گرفت. از رنگ آمیزی اکریدین اورنج/اتیدیوم برماید برای بررسی آپاپتوز سلول‌ها پس از تیمار با سیتارابین استفاده شد. همچنین به منظور ارزیابی گونه‌ی فعال اکسیژن و پتانسیل غشا میتوکندری (MMP) در سلول‌ها از رنگ‌های فلوسایتومتری Dcfh-da و رودامین ۱۲۳ به ترتیب استفاده شد.

نتایج: با استفاده از MTT میزان IC۵۰ را برای داروی سیتارابین در سلول‌های KG1-a ۴۵.۸۳ میکرومولار به دست آوردیم. به همین دلیل ادامه آزمایشات را با غلظت‌های مختلف IC۵۰ ادامه دادیم. نتایج حاصل از رنگ آمیزی آکریدین اورنج اتیدیوم برماید نشان دهنده‌ی این بود که با افزایش غلظت سیتارابین سلول‌های $CD34^+$ نسبت به سلول‌های $CD34^-$ و KG1-a کمتر دچار آپاپتوز شده بودند. در ارزیابی پتانسیل غشا میتوکندری از

طریق رنگ آمیزی با رنگ فلوسایتومتری رودامین ۱۲۳ مشاهده شد که گروه $CD34^+$ پس از تیمار با Ara-c کمتر دچار تغییر نسبت به سایر گروه‌ها شده است. در آزمایشات صورت گرفته در رابطه با ROS که از طریق رنگ آمیزی با Dcfh-da صورت گرفت، به این نتیجه رسیدیم که ROS سلول‌های $CD34^+$ پس از تیمار کمتر افزایش یافته است.

نتیجه گیری: سیتارابین باعث افزایش بیشتر آپاپتوز در سلول‌های $CD34^-$ به نسبت سلول‌های $CD34^+$ شده است. همچنین بررسی‌های نشان داد که Ara-c منجر به کاهش پتانسیل غشا میتوکندری در سلول‌های $CD34^+$ نشده است. به نظر می‌رسد میتوکندری یک نقش کلیدی در متابولیسم سلول‌های سرطانی از جمله سلول‌های بنیادی سرطانی دارد، می‌توانیم با هدف قرار دادن این اندامک از عود مجدد و انعطاف پذیری سرطان جلوگیری کنیم.

کلمات کلیدی: میتوکندری، سیتارابین، سلول‌های $CD34^+$ و گونه‌های فعال اکسیژن