دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوشیمی بالینی

عنوان:

اثر همزمان رتینوئیک اسید تمام ترانس، ۵-فلورواوراسیل و سیس پلاتین بر روی رده‌های سلولی AGS و KYSE-30

اساتید راهنما:

دکتر مجتبی امانی- دکتر نوروز نجف زاده

استاد مشاور:

دکتر محمد ماذنی

نگارش:

اسدالله عباسی

زمستان ۱۳۹۲

شماره پایانامه : ۰۵

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایانامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی

عنوان:

اثر همزمان رتینوئیک اسید تمام ترانس، ۵-فلورواوراسیل و سیس پلاتین بر روی رده‌های سلولیAGS و KYSE-30

اساتید راهنما:

دکتر مجتبی امانی-دکتر نوروز نجف زاده

استاد مشاور:

دکتر محمد ماذنی

نگارش:

اسدالله عباسی

زمستان ۱۳۹۲

شماره پایانامه : ۰۵

بسم الله الرحمن الرحيم

تقدیم به پدر و مادرم؛

که از نگاهشان صلابت

از رفتارشان محبت

و از صبرشان ایستادگی را آموختم...

تقدیر و تشکر

از اساتید بزرگوارم **دکتر مجتبی امانی** و **دکتر نوروز نجف زاده** که با راهنمایی های دلسوزانه، مرا در نگارش این پایانامه یاری کردند.

اثر همزمان رتینوئیک اسید تمام ترانس، ۵-فلورواوراسیل و سیس پلاتین بر روی رده‌های سلولی AGS و 30-KYSE

چکیده

مقدمه: اخیرا جمعیت سلول‌های فرعی (SP) در تومورهای معده‌ای-روده‌ای شناسایی شده است. مخصوصا سلول‌های CD_{44} مثبت که از تومورهای مری و معده جداسازی شده است که ممکن است در شروع سرطان نقش داشته باشند. لذا ریشه کن کردن سلول‌های CD_{44} مثبت در مهار تکثیر جمعیت سلول‌های سرطانی موثر می‌باشد مقاومت به داروها مرتبط با سلول‌های CD_{44} مثبت بوده که چندان شناخته شده نیست. به طور کلی مطالعات نشان دهنده افزایش مقاومت تومورها به داروهای سیس پلاتین و ۵-فلورواوراسیل می‌باشد رتینوئیک اسید تمام ترانس می‌تواند باعث تمایز و سرکوب بیان شناساگر CD_{44} شود. لذا در این مطالعه اثرات افزایشی رتینوئیک اسید در تیمار ترکیبی با سیس پلاتین و ۵-فلورواوراسیل بر روی رده های سلولی AGS و KYSE-30 بررسی شد. همچنین توزیع درصدی جمعیت‌های سلولی CD_{44} مثبت و منفی بعد از تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید با سیس پلاتین و ۵-فلورواوراسیل مطالعه گردید.

مواد و روش‌ها:. رده‌های سلولی با غلظت‌های مختلف رتینوئیک اسید، سیس پلاتین و ۵-فلورواوراسیل تیمار گردید. سلول‌های CD_{44} مثبت با روش MACS جدا شد. اثرات سمی با روش‌های فعالیت متابولیکی(MTT)، رنگ آمیزی آکریدین اورنج/اتیدیوم بروماید بررسی شد . IC_{50} تیمار ترکیبی با مقادیر بدست آمده از تیمار تنها با سیس پلاتین و ۵-فلورواوراسیل مقایسه شد اثرات رتینوئیک اسید بر روی توزیع چرخه سلولی در تیمار ترکیبی با سیس پلاتین و ۵-فلورواوراسیل با رنگ آمیزی ۲-٤-دی آمینو-۲-فنیل ایندول دی هیدروکلراید (DAPI) به روش فلوسایتومتری بررسی شد

نتایج: شناساگر CD_{44} مثبت **در** ۵ تا ٦ درصد از جمعیت رده‌های سلولیAGS و KYSE-30 بیان شده بود. تیمار اولیه با رتینوئک اسید باعث افزایش حساسیت نسبت به داروهای سیس پلاتین و ۵-فلورواوراسیل شد. رنگ آمیزی آکریدین اورنج / اتیدیوم بروماید نشان دهنده افزایش درصد سلول‌های آپوپتوز بود. رتینوئیک اسید باعث مهار چرخه سلولی در مرحله‌ی G_0/G_1 شد. تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید با ۵-فلورواوراسیل باعث افزایش توقف سلول‌های CD_{44} مثبت رده KYSE-30 در مرحله‌ی G_1/S شد ولی بر روی سلول‌های CD_{44} منفی اثر قابل ملاحظه‌ای نداشت. علاوه بر این تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید با سیس پلاتین باعث افزایش توقف چرخه سلولی در مرحله G_2/M در سلول‌های CD_{44} مثبت جدا شده از رده‌های سلولیAGS و KYSE-30 گردید.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که رتینوئیک اسید می تواند باعث افزایش اثرات سمی سیس پلاتین و ۵-فلورواوراسیل بر روی سلول‌های CD_{44} مثبت جدا شده از رده‌های سلولی سرطان مری و معده گردد. لذا یافته‌های ما دلایل منطقی را برای استفاده تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید با سیس پلاتین و ۵-فلورواوراسیل در درمان سرطان های معده ای-روده ای نشان داد.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی سرطان، رتینوئیک اسید تمام ترانس، سیس پلاتین، ۵-فلورواوراسیل، شناساگر CD_{44}، رده‌های سلولی AGS و KYSE-30

اختصارات:

APC: Adenomatous Polyosis Coli

AT: Auto Transplant

ATRA: All-trans Retinoic Acid

CDDP: cis-Diammineplatinum (ÌÌ)

CDK: Cyclin Dependent Kinase

CSCs: Cancer Stem Cells

DMSO: Dimetyl Sulphoxide

M: Mitosis

MACS: Magnetic Activate Cell Sorting

MMP: Metalloproteinase

mRNA:messenger Ribonucleic Acid

MTT: 3-[4, 5 Dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide

NSCs: Normal Stem Cells

PBS: Phosphat Buffer Saline

$RAR_{ß}$: Retinoic Acid Receptor ß

RAR_{α}: Retinoic Acid Receptor α

SCC: Squamous Cell Carcinoma

SP: Side population

TUNEL: Terminal dexynucleptidyl transferase dUTP nick end labeling

µg: microgram

µM: micro Molar

5-FU: 5-Fluorouracil

فهرست نمودار

عنوان **صفحه**

نمودار۱-۴- توزیع جمعیتی رده سلولی KYSE-30 با شناساگر CD_{44} مثبت در مراحل مختلف چرخه سلولی با استفاده از فلوسایتومتری سلول‌های رنگ آمیزی شده با رنگ DAPI ۵۹

فهرست جدول ها

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۴- مقادیر IC_{50} رتینوئیک اسید، سیس پلاتین و ۵-فلورواوراسیل و ترکیب آنها بر روی سلول‌های CD_{44} مثبت و منفی جدا شده از رده‌های سلولی AGS و KYSE-30 .....۵۳

جدول ۲-۴- درصد سلول های آپوپتوز اولیه و آپوپتوز ثانویه در گروه‌های مختلف تیمار شده با رتینوئیک اسید، سیس پلاتین، ۵-فلورواوراسیل و تیمار ترکیبی آنها براساس رنگ آمیزی آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید بر روی رده سلولی AGS.....۵۴

جدول ۳-۴- تاثیر تیمار رتینوئیک اسید، سیس پلاتین، ۵-فلورواوراسیل و ترکیب آنها بر روی توزیع درصدی چرخه سلولی، در سلول‌های CD_{44} مثبت و CD_{44} منفی جدا شده از رده سلولی AGS..۵۷

جدول ۴- ۴- تاثیر تیمار رتینوئیک اسید، سیس پلاتین، ۵-فلورواوراسیل و ترکیب آنها بر روی توزیع درصدی چرخه سلولی، در سلول‌های CD_{44} مثبت و CD_{44} منفی جدا شده از رده سلولی KYSE-30 .....۵۸

فهرست تصاویر

عنوان **صفحه**

شکل۱-۲- ساختار رتینوئیک اسید تمام ترانس ۲۷

شکل۳-۲- ساختار ۵-فلورواوراسیل ۲۹

شکل۲-۲- ساختار سیس پلاتین ۳۰

شکل۱-۴- تصویر سلول های جداسازی شده با MACS ۵۲

شکل۲-۴- رنگ آمیزی آکریدین اورنج/اتیدیوم بروماید سلول‌های CD_{44} مثبت و CD_{44} منفی تیمار شده با رتینوئیک اسید، سیس پلاتین و ۵-فلورواوراسیل ۵۵

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول: طرح تحقیق

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۲-بیان مساله ۳

۱-۳-تعریف واژه‌های کلیدی ۶

۱-۴-اهداف ۸

۱-۵- فرضیات ۹

فصل دوم:کلیات و مروری بر منابع

۲-۱- بیولوژی سرطان ۱۱

۲-۲-پروتوانکوژن ۱۳

۲-۳- چرخه سلولی ۱۳

۲-۴- مرگ برنامه ریزی شده سلول ۱۴

۲-۵- سلول‌های بنیادی سرطان ۱۵

۲-۶- تاریخچه سلول‌های بنیادی سرطان ۱۵

۲-۷- منشاء سلول‌های بنیادی سرطان ۱۶

۲-۸- اهمیت سلول‌های بنیادی سرطان ۱۸

۲-۹- شناسایی سلول‌های بنیادی سرطان ۱۸

۱۰-۲- ویژگی‌های سلول‌های بنیادی سرطان ۲۱

۱۱-۲- مکانیسم‌های ملکولی خود تجدید شوندگی..... ۲۲

۱۲-۲- رتینوئیک اسید..... ۲۶

۱۳-۲- داروهای شیمی درمانی..... ۲۷

۱۴-۲- فلورواوراسیل..... ۲۸

۱۵-۲- سیس پلاتین..... ۲۹

۱۶-۲- مطالعات قبلی ۳۰

فصل سوم:روش اجرایی تحقیق

۱-۳- نوع پژوهش..... ۳۵

۲-۳- جمعیت مورد مطالعه..... ۳۵

۳-۳ - روش گردآوری اطلاعات..... ۳۵

۱-۳-۳- داروها..... ۳۶

۲-۳-۳- مواد مصرفی ۳۶

۳-۳-۳- وسایل مورد استفاده..... ۳۸

۴-۳-۳- دستگاه‌های لازم..... ۳۹

۵-۳-۳- روش ۴۰

۱-۵-۳-۳- کشت سلولی..... ۴۰

۲-۵-۳-۳- بازیافت فریز و کشت آن ۴۱

۳-۵-۳-۳- فریز کردن..... ۴۱

۴-۵-۳-۳- تحت کشت..... ۴۲

۵-۵-۳-۳- تکنیک MACS..... ۴۲

۶-۵-۳-۳-تهیه آنتی بادی‌ها..... ۴۳

۷-۵-۳-۳- روش تهیه بافر جدا کننده مورد استفاده در MACS ۴۳
۸-۵-۳-۳- روش کار تکنیک MACS ۴۴
۹-۵-۳-۳- اندازه گیری بقاء سلولی(Viability) ۴۵
۱۰-۵-۳-۳- اندازه گیری فعالیت متابولیکی ۴۶
۱۱-۵-۳-۳- روش شمارش سلولی با هماسیتومتر ۴۶
۱۲-۵-۳-۳- روش تیمار ترکیبی ۴۷
۱۳-۵-۳-۳- برسی مورفولوژی سلولی با رنگ آمیزی آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید ۴۷
۱۴-۵-۳-۳- روش انجام رنگ آمیزی آکریدین اورنج/اتیدیوم بروماید ۴۸
۱۵-۵-۳-۳-بررسی فلوسایتومتری ۴۸
۱۶-۵-۳-۳- روش کار فلوسایتومتری ۴۸
۱۷-۵-۳-۳- محاسبه IC_{50} ۴۹
۱۸-۵-۳-۳- روش تجزیه و تحلیل دادها ۵۰

فصل چهارم:نتایج

۱-۴- جداسازی سلول با MACS ۵۲
۲-۴- تعیین فعالیت متابولیکی ۵۲
۳-۴- مکانیسم مرگ سلولی ۵۳
۴-۴- بررسی چرخه سلولی به وسیله فلوسایتومتری ۵۶

فصل پنجم:بحث و نتیجه گیری

۱-۵- بحث ۶۱
۲-۵- نتیجه گیری ۶۶
۳-۵-پیشنهادات ۶۷
۴-۵-محدودیتها ۶۸
منابع ۶۹
چکیده انگلیسی .....

فصل اول:

طرح تحقیق

۱-۱- مقدمه

سرطان یکی از علل شایع مرگ و میر در جهان است که در حال حاضر مهمترین روش‌های درمان آن شیمی درمانی[1] و جراحی می باشد. درمان سرطان به دلیل محدویت‌هایی در انجام آن بسیار مشکل تر از درمان دیگر بیماری‌ها است. مهمترین محدودیت عدم بهبود کامل پس از درمان می باشد که اغلب با عود و رشد دوباره تومور همراه می‌باشد. اخیرا علت عود را وجود سلول‌های بنیادی سرطان[2] در داخل تومورها مطرح کرده‌اند که نسبت به عوامل شیمی درمانی مقاومت قابل ملاحظه‌ای نشان می‌دهند. سلول‌های بنیادی سرطانی به وسیله بیان شناساگرهای[3] اختصاصی بر روی سطح سلولی شناسایی می شوند. محدودیت دیگر شامل عوارض داروهای شیمی درمانی بر روی سلول‌های طبیعی می باشد (۱, ۲). رتینوئیک اسید تمام ترانس[4] یکی از عوامل القاء کننده تمایز[5] سلولی می باشد که در درمان سرطان پرومیلوسیت[6] برای القاء بلوغ سلولی استفاده می شود (۳). اخیرا اثرات ضد تکثیری رتینوئیک اسید بر روی برخی از سلول‌های بنیادی سرطانی نشان داده شده است که همراه با کاهش بیان شناساگرهای سطح سلولی، سلول‌های بنیادی سرطان و در نتیجه کاهش قدرت تهاجم آنها بوده است (٤, ٥). با توجه به اثرات گفته شده در مورد رتینوئیک اسید تمام ترانس، تصمیم به بررسی اثرات استفاده همزمان رتینوئیک اسید با داروهای شیمی

1-Chemotherapy
2 -Cancer Stem Cell
3 -Marker
4-All-trans Retinoic Acid
5 -Differentiation
6 -Promyelocytic leukemia