

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



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:

## **تأثیر اسید رتینوئیک تمام ترانس و DAPT (مهارکننده گاما سکر تاز) 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 پناهِش به شجاعت می گراید.

## تقدیم به مادر عزیزتر از جان و مهربانم

او که شانه هایش تکیه گاه امن بودم  
آغوشش اعتبار سبز ماندنم می باشد  
او که خستگی با وجودش بیگانه است  
ومن هر زمان که از دلنگی 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 و سپاس پروردگار عالم را که به یمن عنایت خویش و لطف عزیزان توفیق یافتیم 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 و سپاسگزاری را داشته باشم.

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

از تمامی دوستان عزیزم در کمیته تحقیقات دانشجویی، 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 شیرین ترین لحظات زندگی من شدند، سرکار خانم دکترها زهرا نورانی، بهاره جوانی، فرزانه جعفر زاده، الهام قلی زاده و ویدا نورانی بسیار متشکرم.

## فصل اول: مقدمه و بیان مساله

۲	۱.۱ سرطان
۵	۱.۱.۱ سرطان دستگاه گوارش
۶	۱.۱.۱.۱ سرطان معده
۹	۲.۱ مسیر پیام رسان Notch
۱۰	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
۱۳	۴.۲.۱ فعال سازی مسیر Notch
۱۴	۱.۴.۲.۱ شکافت S1 با واسطه آنزیم فورین
۱۵	۲.۴.۲.۱ شکافت S2 با واسطه متالوپروتئاز
۱۶	۳.۴.۲.۱ شکافت S3 با واسطه $\gamma$ -سکرتاز
۱۷	۵.۲.۱ وقایع هسته ای مسیر پیام رسان Notch
۱۸	۶.۲.۱ Notch و سرطان
۲۱	۱.۶.۲.۱ Notch و سرطان معده

۲۲	۷.۲.۱ مورد هدف قرار دادن Notch به عنوان یک روش درمانی
۲۲	۱.۷.۲.۱ مهارکننده های ۷-سکرتاز
۲۵	۳.۱ مسیر پیام رسان رتینوئیک اسید
۲۵	۱.۳.۱ پیام رسانی رتینوئیک اسید به صورت فیزیولوژیکی
۲۶	۲.۳.۱ رتینوئیدها و متابولیسم آنها
۳۰	۳.۳.۱ رسپتورهای مسیر سیگنالینگ اسید رتینوئیک
۳۲	۴.۳.۱ رتینوئیک اسید و سرطان
۳۳	۵.۳.۱ اسید رتینوئیک تمام ترانس (ATRA)(Tretinoin)
۳۵	۴.۱ انواع مرگ سلولی و تعاریف آن
۳۵	۱.۴.۱ نکروز (Necrosis)
۳۵	۲.۴.۱ آپوپتوز (Apoptosis)
۳۶	۳.۴.۱ فعالیتهای اساسی آپوپتوز
۳۶	۴.۴.۱ اجزاء آپوپتوز در سلولهای پستانداران
۳۷	۱.۴.۴.۱ کاسپازها
۳۷	۲.۴.۴.۱ خانواده پروتئینهای Bcl-2
۳۸	۳.۴.۴.۱ کوفاکتورهای فعال کننده کاسپازها
۳۸	۵.۴.۱ مسیرهای درگیر در آپوپتوز

۳۹..... ۵.۱ اهداف و فرضیات

۳۹..... ۱.۵.۱ اهداف و فرضیات

۳۹..... ۲.۵.۱ اهداف اختصاصی

۴۱..... ۳.۵.۱ فرضیات

## فصل دوم: بررسی متون

۴۴..... ۱.۲ بررسی متون علمی

## فصل سوم: مواد و روش ها

۵۰..... ۱.۳ مواد و تجهیزات مورد استفاده

۵۰..... ۱.۱.۳ مواد مورد استفاده

۵۱..... ۲.۱.۳ ظروف و مواد مصرفی

۵۲..... ۳.۱.۳ تجهیزات مورد استفاده

۵۵..... ۲.۳ اطلاعات مربوط به متدولوژی پایان نامه:

۵۵..... ۱.۲.۳ جدول متغیرها

۵۵..... ۲.۲.۳ نوع مطالعه

۵۵..... ۳.۲.۳ جامعه آماری و روش حجم نمونه

۵۵..... ۴.۲.۳ زمان و مکان مطالعه

۵۶..... ۵.۲.۳ ملاحظات اخلاقی

- ۳.۳ روش انجام کار ..... ۵۶
- ۱.۳.۳ تهیه رده سلولی ..... ۵۶
- ۱.۳.۳ ذوب کردن ویال حاوی سلول ..... ۵۷
- ۲.۳.۳ تعویض محیط کشت ..... ۵۸
- ۳.۳.۳ پاساژ سلولی ..... ۵۸
- ۴.۳.۳ منجمد کردن سلول ها ..... ۵۹
- ۵.۳.۳ شمارش سلولی به روش Trypan blue dye exclusion ..... ۶۰
- ۶.۳.۳ روش سنجش میزان حیات سلولی MTT ..... ۶۲
- ۱.۶.۳.۳ تعیین غلظت موثر رتینوئیک اسید بر روی رده سلولی AGS ..... ۶۳
- ۲.۶.۳.۳ تعیین غلظت موثر DAPT بر روی رده سلولی AGS ..... ۶۴
- ۳.۶.۳.۳ بررسی اثر همزمان RA و DAPT بر روی رده سلولی AGS ..... ۶۵
- ۸.۳.۳ بررسی فعالیت کاسپاز ۷ و ۳ در روند آپوپتوز ..... ۶۷
- ۹.۳.۳ بررسی آپوپتوز با استفاده از تکنیک RT-PCR ..... ۷۱
- ۱.۹.۳.۳ استخراج RNA ..... ۷۱
- ۲.۹.۳.۳ تعیین غلظت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری نانودراپ ..... ۷۲
- ۳.۹.۳.۳ سنتز cDNA از RNA استخراج شده ..... ۷۳
- ۴.۹.۳.۳ RT-PCR ..... ۷۵



۱۰.۳.۳ تجزیه و تحلیل داده ها ..... ۷۸

## فصل چهارم: نتایج

۱.۴ تاثیر غلظت های متفاوت اسید رتینوئیک تمام ترانس (ATRA) بر میزان حیات سلول های

سرطانی معده از رده AGS ..... ۸۰

۲.۴ تاثیر غلظت های متفاوت مهارکننده گاما سکر تاژ (DAPT) بر میزان حیات سلول های سرطانی

معده از رده AGS ..... ۸۲

۳.۴ بررسی اثر توام RA و DAPT بر میزان حیات سلول های سرطانی معده از رده AGS ..... ۸۴

۴.۴ بررسی آپوپتوز با استفاده از رنگ آمیزی AO/EB ..... ۸۶

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

۶.۴ بررسی آپوپتوز با استفاده از تکنیک RT-PCR ..... ۹۲

## فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

۱.۵ نتیجه گیری ..... ۹۹

۲.۵ محدودیت ها ..... ۱۰۰

۳.۵ پیشنهادات ..... ۱۰۰

۴.۵ منابع ..... ۱۰۲

## فهرست جداول و نمودارها

صفحه	عنوان
۵۶.....	جدول ۳-۱ خصوصیات رده سلولی AGS.....
۶۵.....	جدول ۳-۲ گروه بندی انجام شده برای بررسی اثر همزمان RA و DAPT.....
۷۵.....	جدول ۳-۳ نام و مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در واکنش های RT-PCR.....
۷۶.....	جدول ۴-۳ برنامه دمایی و زمانی مراحل واکنش RT-PC.....
۸۶.....	جدول ۱-۴ القاء آپوپتوز در سلول های سرطانی رده AGS.....
۸۱.....	نمودار ۱-۴ میزان حیات سلول های AGS در غلظت های مختلف RA با روش MTT.....
۸۳.....	نمودار ۲-۴ میزان حیات سلول های AGS در غلظت های مختلف DAPT با روش MTT.....
۸۵.....	نمودار ۳-۴ میزان حیات سلول های AGS در غلظت ثابت $10 \mu\text{M}$ از DAPT و غلظت های متفاوت رتینوئیک اسید با روش MTT.....
۹۱.....	نمودار ۴-۴ فعالیت کاسپاز های ۳ و ۷ به دنبال تیمار سلول های رده AGS.....

## فهرست اشکال

عنوان	صفحه
شکل ۱-۱. شش علامت کلیدی سرطان.....	۵
شکل ۲-۱. دستگاه گوارش.....	۶
شکل ۳-۱. نمونه ای از آدنوکارسینومای معده به همراه تصویر اندوسکوپی.....	۸
شکل ۴-۱. رسپتورهای Notch انسانی.....	۱۲
شکل ۵-۱. لیگاند Notch.....	۱۳
شکل ۶-۱. هسته مرکزی مسیر پیام رسان Notch.....	۱۷
شکل ۷-۱. دوگانگی عملکرد Notch در سرطان.....	۲۱
شکل ۸-۱. فرمول باز مولکولی مهارکننده $\gamma$ سکر تاز (DAPT).....	۲۴
شکل ۹-۱. فعالیت کمپلکس $\gamma$ -سکر تاز بلوکه شده توسط DAPT.....	۲۵
شکل ۱۰-۱. متابولیسیم مسیر رتینوئیک اسید و عملکرد عوامل موثر بر آن.....	۲۸
شکل ۱۱-۱. ساختار شیمیایی برخی از رتینوئیدهای سنتزی و فیزیولوژیکی.....	۲۹
شکل ۱۲-۱. نحوه فعال سازی و عملکرد هتروداایمرهای RAR/RXR.....	۳۱
شکل ۱۳-۱. ساختار مولکولی رسپتورهای هسته ای و مکانیسم اتصال به DNA.....	۳۲
شکل ۱۴-۱. ساختار مولکولی اسید رتینوئیک تمام ترانس (ATRA).....	۳۴
شکل ۱۵-۱. (a) تصویر SEM یک سلول آپوپتوتیک. (b) تصویر SEM یک سلول نکروتیک.....	۳۵
شکل ۱۶-۱. شکل شماتیک نشان دهنده تفاوت‌های سلولی میان فرایندهای آپپتوز و نکروز.....	۳۶
شکل ۱۷-۱. شکل شماتیک نشان دهنده مسیر داخلی و خارجی آپپتوز.....	۳۹
شکل ۱-۳. برخی از تجهیزات مورد استفاده.....	۵۴

- شکل ۳-۲. سلول های کشت شده لاین سلولی..... ۵۶
- شکل ۳-۳. نمایی از هموسایتومتر و نحوه شمارش سلول ها در این سیستم..... ۶۱
- شکل ۳-۴. نمونه ای از پلیت MTT شده..... ۶۳
- شکل ۳-۵. چهارچوب آزمایش انجام شده در جهت تعیین غلظت موثر رتینوئیک اسید..... ۶۴
- شکل ۳-۶. چهارچوب آزمایش انجام شده در جهت تعیین غلظت موثره DAPT..... ۶۵
- شکل ۳-۷. چهارچوب آزمایش انجام شده در جهت بررسی اثر همزمان RA و DAPT..... ۶۶
- شکل ۳-۸. نحوه برهم کنش سوبسترا در کیت..... ۶۸
- شکل ۳-۹. شکل شماتیک نشان دهنده روش کار کیت ..... ۷۰
- شکل ۴-۱. القاء آپوپتوز در سلول های سرطانی AGS در غلظت ۲۵ میکرومولار از رتینوئیک..... ۸۷
- شکل ۴-۲. القاء آپوپتوز در سلول های سرطانی AGS در غلظت ۱۰ میکرومولار از DAPT..... ۸۸
- شکل ۴-۳. القاء آپوپتوز در سلول های سرطانی AGS در غلظت ۱۰ میکرومولار DAPT و ۲۵ میکرومولار RA به طور هم زمان ..... ۸۹
- شکل ۴.۴. 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-J $\kappa$ associated molecules
RAR	Retinoic acid Receptor
RBP4	Retinol-binding protein 4
STRA 6	Stimulated by retinoic acid gene 6
TAD	Transcriptional Activation Domain

## تأثیر اسید رتینوئیک تمام ترانس و DAPT (مهارکننده گاما سکر تاز) بر روی سلول های سرطانی معده

### چکیده

**مقدمه:** سرطان معده شایع ترین سرطان جهان و دارای بالاترین میزان مرگ و میرهای 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 بدخیمی ها از جمله سرطان معده نقش دارد. در تحقیقات اخیر مسیر سیگنالینگ 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 سکر تاز می باشد. DAPT، یا دی پپتید L-[N-(3, 5-difluorophenacetyl) - S-phenyl glycine-t-butyl ester در واقع یک ترکیب شیمیایی است که با مهار عملکرد آنزیم  $\gamma$ -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. اخیراً رتینوئیک اسید تمام ترانس (ATRA) به عنوان یک داروی تایید شده برای درمان بیماران مبتلا به لوسمی پرومیلوتیک 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، (۴، 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 ۱۰ میکرومولار DAPT و ۲۵ میکرومولار ATRA بود. به همین دلیل ادامه آزمایش با این دو غلظت و ترکیب آنها انجام گرفت که نتایج حاصل از رنگ آمیزی اکریدین 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 احتمالاً از طریق افزایش فعالیت کاسپاز ۳ و ۷ می تواند باعث القاء آپپتوز 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 احتمالاً از طریق القاء آپپتوز 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، آپپتوز



## فصل اول

# مقدمه و بیان مسأله

## 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 را به 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 از ۳ گروه عمده زیر قرار می گیرند.

۱. کارسینوما<sup>۱</sup> که شامل تقریباً ۹۰ درصد سرطان های انسانی و در حقیقت بدخیمی سلول های اپیتلیال هستند.

۲. سارکوما<sup>۲</sup> که به ندرت در انسان مشاهده می شوند و شامل تومورهای جامد از بافتهای پیوندی نظیر عضله، استخوان، غضروف و بافت فیروزی هستند.

۳. لوسمی<sup>۳</sup> و لنفوما<sup>۴</sup> که تقریباً ۷ 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 کارسینوما ریه و سینه) و نوع سلول های درگیر شده،

تقسیم بندی گسترده تری نیز می نمایند. برای مثال فیروکارسینوما<sup>۵</sup> از فیرو بلاست و اریترئید لوسمی، از

1 Carcinomas

2 Sarcoma

3 Leukemia

4 Lymphomas

5 Fibrocarcinoma