

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

دانشگاه گیلان

پردیس بین الملل

سلولی - مولکولی

عنوان:

بررسی غلظت L سلکتین محلول در بیماران مبتلا به سرطان کولون

از:

پرینا آقاچان نشتایی

استاد راهنما:

دکتر فرهاد مشایخی

اساتید مشاور:

دکتر ابراهیم میرزاجانی

دکتر صبا فخریه اصل

شهریور ۱۳۹۱

این پایان نامه را تقدیم می نمایم به:

پدر و مادر عزیزم به خاطر زحمات بی دریغشان و همه تلاش های محبت آمیزی که در دوران مختلف زندگی ام انجام داده اند و با مهربانی، چگونه زیستن را به من آموخته اند

برادر مهربانم که وجودش شادی بخش و صفایش مایه آرامش من است

و

همسر عزیز و فداکارم که سایه مهربانیش سایه ساز زندگی من می باشد، او که اسوه صبر و تحمل بوده و مشکلات مسیر را برایم آسان نمود.

اکنون که به لطف خداوند متعال، مراحل انجام این پژوهش به پایان رسیده است بر خود لازم می دانم از زحمات کلیه عزیزانی که در تکمیل این پایان نامه مرا یاری نموده اند، سپاسگزاری کنم. به ویژه زحمات استاد راهنمای گرانقدرم، جناب آقای دکتر فرهاد مشایخی که در تمام مراحل انجام این پایان نامه مرا یاری نموده و از راهنمای های ایشان برخوردار بوده ام، کمال تشکر و سپاس نموده. از جناب آقای دکتر میرزاجانی و سرکار خانم دکتر فخریه اصل به عنوان اساتید مشاور جای قدردانی فراوان دارد. از سرکار خانم دکتر صالحی و جناب آقای دکتر مهدی پور، اساتید مدعو که قبول زحمت فرموده و پایان نامه اینجانب را به دقت مطالعه و داوری نموده اند کمال تشکر و قدردانی را دارم. همچنین بر خود لازم میدانم از سرکار خانم ها دکتر هورمزد در بیمارستان مهر تهران و دکتر تقوی در بیمارستان امام خمینی ساری و جناب آقای دکتر ساعدی در بیمارستان رازی رشت به خاطر همکاری های ارزنده شان کمال تشکر و قدردانی را دارم. از کارشناس محترم آزمایشگاه دانشکده علوم پایه، سرکار خانم هادوی و جناب آقای زمانی که در طول این پایان نامه همکاری لازم را داشته اند، تشکر و قدر دانی نموده. همچنین جا دارد تشکر صمیمانه خود را از دوستان خوبم در آزمایشگاه تکوین و ژنتیک و به خصوص دوست عزیزم بهار رستمی و تمام کسانی که به نحوی در انجام این تحقیق مرا یاری کرده اند، ابراز نموده و برایشان آرزوی موفقیت دارم.

در پایان باید گفت اگر همکاری و تشویق های خانواده عزیزم به خصوص همسرم نبود مشکلات موجود در انجام این پروژه نمی توانست به سادگی تمام شود و تشکر لازم را از پدر و مادر عزیزم دارم که تمام زندگیم را مدیون شان هستم.

پرینا آقاچان نشتایی

شهریور ۹۱

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
چکیده فارسی	ش
چکیده انگلیسی	ص

فصل اول

۱- مقدمه	۱
۱-۱-۱- دستگاه گوارش	۱
۱-۱-۱- آناتومی و فیزیولوژی	۱
۱-۱-۲- بافت شناسی	۴
۲-۱- سرطان روده بزرگ	۶
۳-۱- اتیولوژی و عوامل خطر ساز	۷
۴-۱- علائم سرطان کولون	۱۰
۵-۱- غربالگری	۱۱
۱-۵-۱- معاینه رکتوم با انگشتان	۱۱
۲-۵-۱- آزمون خون مخفی	۱۱
۱-۲-۵-۱- سیگموئیدوسکوپی	۱۲
۲-۲-۵-۱- کولونوسکوپی	۱۲
۶-۱- تعیین مرحله بیماری	۱۳

۱-۷-مرحله بندی	۱۳
۱-۷-۱-سیستم مرحله بندی داک	۱۴
۲-۷-۱-سیستم مرحله بندی TNM	۱۴
۸-۱-روش های درمانی	۱۷
۱-۸-۱-جراحی	۱۷
۲-۸-۱-شیمی درمانی	۱۸
۳-۸-۱-پرتو درمانی	۱۸
۹-۱-پشگیری از سرطان روده بزرگ	۱۸
۱۰-۱-مکانیسم مولکولی ایجاد سرطان کولون	۱۹
۱-۱۰-۱-مسیر اول	۱۹
۱-۱-۱۰-۱-از بین رفتن ژن سرکوب کننده تومور APC	۱۹
۲-۱-۱۰-۱-حذف LOH 18q	۲۰
۳-۱-۱۰-۱-جهش RAS	۲۰
۴-۱-۱۰-۱-حذف P53	۲۰
۲-۱۰-۱-مسیر دوم	۲۱
۱۱-۱-نقش مولکولهای چسبنده در ایجاد سرطان کولون	۲۲
۱۲-۱-اینترگرین ها	۲۳

۲۳	۱۳-۱- ایمونوگلوبولینها
۲۴	۱۴-۱- کاده‌رین ها
۲۴	۱۵-۱- سلکتین ها
۲۵	۱-۱۵-۱ P سلکتین
۲۵	۲-۱۵-۱ E سلکتین
۲۶	۳-۱۵-۱ L سلکتین
۲۸	۱۶-۱- لیگاندهای L سلکتین
۲۹	۱-۱۶-۱ CD34
۲۹	۲-۱۶-۱ PSGL-1
۳۰	۳-۱۶-۱ GLYCAM
۳۰	۱۷-۱- بیوسنتز
۳۱	۱۸-۱- تولید فرم محلول پروتئین های درون غشایی
۳۳	۱۹-۱- شیداز ها
۳۴	۲۰-۱- هدف

فصل دوم

۳۵	مواد و روش ها
۳۶	۱-۲- دستگاه ها و وسایل مورد نیاز

- ۲-۲- مواد مورد نیاز ۳۷
- ۳-۲- تهیه نمونه ۳۸
- ۱-۳-۲- روش جداسازی ۳۸
- ۴-۲- اندازه گیری غلظت تمام پروتئین به روش بیوره ۳۹
- ۱-۴-۲- مراحل تعیین غلظت پروتئین های سرم ۳۹
- ۵-۲- بررسی الگوی الکتروفورسیک پروتئین های سرم خون بیماران مبتلا به سرطان کولون ۴۰
- ۱-۵-۲- تهیه بافر الکتروود و یا بافر مخزن ۴۰
- ۲-۵-۲- تهیه بافر نمونه ۴۱
- ۳-۵-۲- تهیه بافر ژل بالا ۴۱
- ۴-۵-۲- تهیه بافر ژل پائین ۴۲
- ۵-۵-۲- تهیه آکریل آمید ۳۰ درصد و بیس آکریل آمید ۰/۸ درصد ۴۲
- ۶-۵-۲- تهیه آمونیوم پرسولفات ۴۰ درصد ۴۲
- ۷-۵-۲- تهیه بافر فسفات سالین ۴۳
- ۶-۲- آماده سازی ژل الکتروفورز ۴۳
- ۱-۶-۲- دستور تهیه ژل پائین ۴۳
- ۲-۶-۲- دستور تهیه ژل بالا ۴۴
- ۷-۲- آماده سازی نمونه ها برای انجام الکتروفورز ۴۵
- ۸-۲- نحوه انجام الکتروفورز SDS-PAGE ۴۶

۹-۲- رنگ آمیزی ژل پلی آکریل آمید	۴۸
۱۰-۲- رنگ آمیزی نیترات نقره	۴۹
۱-۱۰-۲- تهیه بافرهای رنگ آمیزی نیترات نقره	۴۹
۲-۱۰-۲- رنگ آمیزی نیترات نقره	۵۰
۱۱-۲- الایزا	۵۲
۱۲-۲- نحوه ی آزمایش	۵۲
۱۳-۲- آماده کردن مواد و محلول ها	۵۴
۱۴-۲- روش آزمایش	۵۴
• نکات تکنیکی	۵۶
۱۵-۲- آنالیز آماری	۵۶

فصل سوم

نتایج	۵۷
۱-۳- نمونه گیری	۵۸
۲-۳- بررسی محتوای غلظت تمام پروتئین موجود در سرم	۵۹
۳-۳- نتایج حاصل از SDS-PAGE	۶۰
۴-۳- بررسی میزان بیان L سلکتین محلول در سرم	۶۱

فصل چهارم

۶۳ بحث و نتیجه گیری

۶۴ ۴-۱- بحث

۶۹ ۴-۲- پیشنهادات

فصل پنجم

۷۰ منابع

فهرست شکل ها

عنوان	صفحه
شکل ۱-۱- آناتومی بخش های مختلف کولون	۲
شکل ۲-۱- لایه های اصلی و سازمان دستگاه گوارش	۶
شکل ۳-۱- مراحل مختلف سرطان کولون	۱۶
شکل ۴-۱- ژن ها و فاکتورهای رشدی که منجر به سرطان کولون می شوند	۲۱
شکل ۵-۱- الگوی ژنتیکی برای نحوه ی پیدایش سرطان کولون	۲۲
شکل ۶-۱- ساختار سلکتین	۲۵
شکل ۷-۱- ساختار انواع سلکتین	۲۶
شکل ۸-۱- ساختار L سلکتین انسان	۲۸
شکل ۹-۱- انواع لیگاند های L سلکتین	۳۰
شکل ۱۰-۱- فرم متصل به غشا و فرم محلول	۳۲
شکل ۱-۳- نتایج بررسی غلظت تمام پروتئین	۵۹
شکل ۲-۳- الگوی الکتروفورتیک بیماران	۶۱
شکل ۳-۳- میزان بیان L سلکتین محلول	۶۲

فهرست جدول ها

صفحه	عنوان
۸	جدول ۱-۱- سندروم های ارثی دستگاه گوارش
۱۴	جدول ۲-۱- سیستم مرحله بندی داک در سرطان کولون
۴۴	جدول ۱-۲- محلول های ژل پائین
۴۵	جدول ۲-۲- محلول های ژل بالا
۵۳	جدول ۳-۲- مواد موجود در کیت الایزا L سلکتین محلول
۵۸	جدول ۱-۳- مشخصات نمونه

AD: Atopic dermatitis

ADAM17: A disintegrin and metalloproteinase

APC: Adenomatous polyposis coli

APS: Amonium per sulphate

CSF: Cerebrospinal fluid

DCC: Deleted in colorectal cancer

EDTA: Ethylene Diamine Tetra Acetate

EGF: Epidermal growth factor

ELISA: Enzyme linked immunsorbant assay

EPCAM: Epithelial cell adhesion molecules

FAP: Familial adenomatous polyposis

GCA: Giant cell arteritis

GLYCAM: Glycosylation dependent cell adhesion molecules

HNPCC: Hereditary non polyposis colorectal cancer

IGF-1: Insulin-like growth factor-1

Ig: Immunoglobulin

KD: Kawasaki disease

MADCAM-1: Mucosal addressin cell adhesion molecules-1

PBS: Phosphate buffered saline

PLN: Peripheral lymph nodes

PSGL-1: P-Selectin glycoprotein ligand-1

RA: Rheumatoid arthritis

SCR: Short consensus repeats

SLE: Systemic lupus erythematosus

SL-Selectin: Soluble L-selectin

SSC: Systemic sclerosis

TACE: Tumour necrosis factor- α converting enzyme

TNM: Tumour. Nodes. Metastasis

TPC: Total protein concentration

VC: Virtual colonoscopy

VEGF: Vascular endothelial growth factor

18qLOH: Loss of the long arm of chromosome 18

بررسی غلظت L سلکتین محلول در سرم بیماران مبتلا به سرطان کولون

پرینا آقاچان نشتایی

سرطان روده بزرگ دومین علت مرگ و میر بعد از سرطان ریه است. این سومین سرطان شایع در مردان و دومین سرطان شایع در زنان است. بیشتر سرطان روده بزرگ با توجه به سبک زندگی و افزایش سن و فقط با یکی از عوامل مرتبط در زمینه های اختلالات ژنتیکی همراه است. منشأ آن از سلول های اپی تلیالی دیواره روده بزرگ است و اغلب نتیجه جهش در مسیر سیگنالدهی wnt است. ثابت شده است که مولکول های چسباننده سلول از جمله سلکتین ها نقش مهمی در گسترش سرطان روده بزرگ دارند. سلکتین ها گلیکوپروتئین های تک زنجیره ایی بین غشایی وابسته به اتصال به کلسیم هستند. L سلکتین کوچکترین سلکتین است و نقش مهمی در چسبندگی سلول ایفا می کند. بسیاری از پروتئین ها از سطح سلول توسط ریزش اکتودمین آزاد می شوند. در میان بسیاری از گیرنده های غشا گذر، L سلکتین برای ریزش اکتودمین ها نشان داده شده است. L سلکتین محلول می تواند در سرم و دیگر مایعات بیولوژیک بدن مشاهده شود. هدف از این پژوهش این است که آیا سطح سرمی L سلکتین محلول و بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ ارتباط دارند. نمونه های مورد استفاده در این بررسی شامل نمونه های سرمی ۳۰ بیمار (۱۷ مرد و ۱۲ زن)، ۲۵ نمونه کنترل (۱۵ مرد و ۱۰ زن) و ۱۵ نمونه تحت درمان (۱۰ مرد و ۵ زن) با سرطان کولون می باشد. غلظت تمام پروتئین از نمونه سرم بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ و کنترل $1/12 \pm 5/91$ و $0/55 \pm 7/67$ بوده و اختلاف قابل توجهی بین گروه مورد نظر در غلظت تمام پروتئین دیده می شود ($P < 0.001$). با استفاده از آزمون ELISA، نشان داده است که غلظت L سلکتین محلول در نمونه های سرم بیمار نسبت به کنترل کاهش یافته است. میانگین غلظت L-Selectin محلول در سرم بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ به 302 ± 936 ng/ml بود که بالاتر از عادی با 378 ± 1554 ng/ml شد ($P < 0.00001$). بطور کلی نتیجه گیری می شود که L-Selectin محلول یک ترکیب ثابت در سرم انسان است. علاوه بر این، می تواند در پاتوفیزیولوژی سرطان کولون هم دخیل باشد.

کلمات کلیدی: سرطان روده بزرگ، ریزش اکتودمین، L-Selectin، سرم، غلظت

Abstract

Analysis of soluble L-selectin concentration in the serum of patients with colon cancer

Parina Aghajan nashtae

Colon cancer is the second leading causes of death after lung cancer. It is the third most common cancer in men and the second most common cancer in women. Most colorectal cancer occurs due to lifestyle and increasing age with only a minority of causes associated with underlying genetic disorders. It is originated from epithelial cells lining the colon, most frequently as a result of mutations in the Wnt signaling pathway. It has been demonstrated that cell adhesion molecules including Selectins plays important role in the development of colon cancer. Selectin share single-chain transmembrane glycoproteins and calcium-dependent binding. L-selectin is the smallest selectin; and plays an important role in the initiation of cell attachment. Many proteins are released from the cell surface by ectodomain shedding. Among the many integral membrane receptors for which ectodomain shedding has been shown is L-selectin. Soluble L-selectin (SL-Selectin) can be detected in the serum and other biological fluids. The aim of the present study was to find whether serum levels of SL-selectin correlated with colon cancer. 30 patients with colon cancer (17 male, 12 female), 25 control (15male, 10female) and 15 chemotherapy (10 male, 5 female) were included in study. The Total protein concentration (TPC) of serum sample from patients with colon cancer and control subjects were 5.91 ± 1.12 and 7.67 ± 0.55 mg/ml respectively. Significant difference has been seen in TPC between the two groups ($P < 0.001$). Using ELISA, It was found that the concentration of SL-Selectin in the serum samples of patients with colon cancer was decrease than in normal controls. The mean SL-Selectin concentration in serum of colon cancer patients was amounted to 936 ± 302 ng/ml, which was significantly higher than that of normal, i.e. 1554 ± 378 ng/ml ($p < 0.00001$). It is conclude be that SL-Selectin is a constant component to human serum. Moreover, it could be implicated in the pathophysiology at colon cancer.

Key word:SL-Selectin, Colon cancer, ectodomain Shedding, Serum, Concentration

فصل اول: مقدمه

۱- مقدمه :

سرطان^۱ در نتیجه تکثیر بی رویه سلول ها انجام می شود (Pauli et al., 1990). سرطان روده بزرگ بعد از سرطان ریه دومین علت مرگ ناشی از سرطان در ایالات متحده می باشد (Navaratnam et al., 1999). سرطان روده بزرگ تا حد زیادی مربوط به شیوه زندگی نامناسب و الگوهای رفتاری است (Huxley et al., 2009). این سرطان در مردان سومین سرطان شایع (بعد از سرطان ریه و پروستات) و در زنان دومین سرطان شایع (بعد از سرطان پستان است) (Jemal et al., 2009). میزان شیوع سرطان کولون در مردان و زنان تقریباً (در مردان اندکی بیشتر) یکسان است، در حالی که سرطان رکتوم در مردان شایع تر است (Campbell et al., 2010). شیوع بیماری با افزایش سن بیشتر شده و اغلب مبتلایان بیش از ۵۰ سال سن دارند و کمتر از ۲۰ درصد موارد در سنین زیر ۴۰ سالگی رخ می دهد. در طی سی سال اخیر، میزان بروز نسبتاً ثابت باقی مانده است، ولی میزان مرگ و میر (به ویژه در زنان) کاهش یافته است. تشخیص زودرس (در مراحل اولیه) و انجام به هنگام عمل جراحی سبب بهبودی قطعی این نوع سرطان می شود. تخمین زده می شود که در آمریکا هر سال ۱۶۰۰۰۰ بیمار جدید و ۵۷۰۰۰ مورد مرگ و میر به واسطه این سرطان روی می دهد، لذا این بیماری عامل تقریباً ۱۵ درصد از مرگهای ناشی از سرطان در ایالات متحده محسوب می شود (Markowitz and Bertagnolli, 2009). سرطان می تواند در همه بافت ها ایجاد شود.

۱-۱- دستگاه گوارش

۱-۱-۱- آناتومی و فیزیولوژی

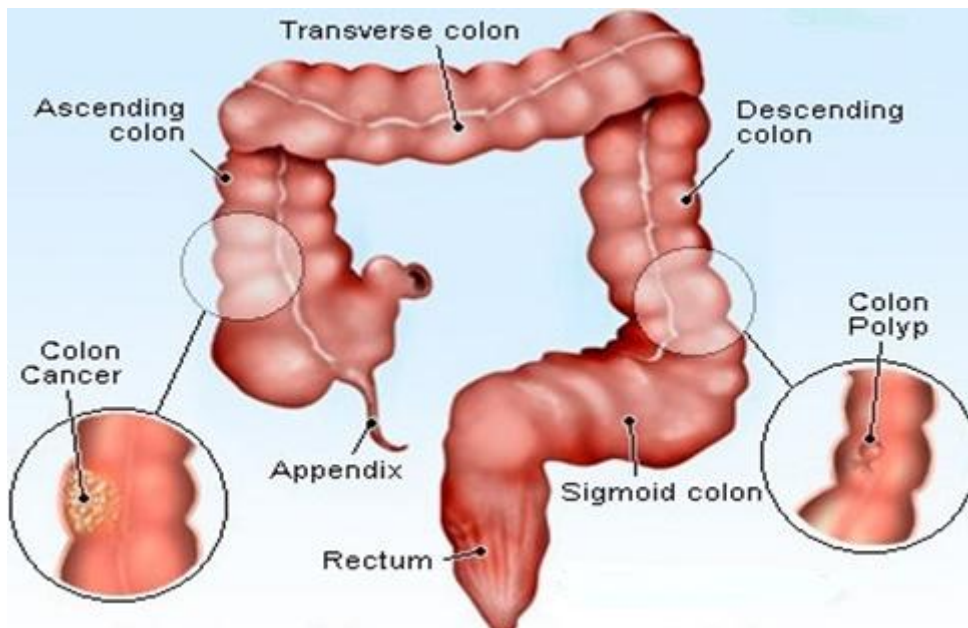
دستگاه گوارش^۲ یک سیستم عضلانی است که توسط پرده مخاطی^۳ پوشیده شده است و از دهان تا مقعد ادامه دارد. روده بزرگ بخشی از دستگاه گوارش بدن بوده که متصل به دیواره شکم است و روده باریک در وسط آن قرار دارد و بخش زیرین آن

¹Cancer

²Digestive System

³Mucous Membrane

به سمت لگن باز می شود. وظیفه ی این بخش از سیستم گوارشی جذب آب از محتویاتی است که از روده کوچک وارد آن می شود. اگرچه روده کوچک هم مقداری آب جذب می کند، اما این عمل در روده بزرگ تشدید می شود و هم چنین در حذف و پردازش مواد غذایی (نظیر ویتامین، کربوهیدرات) و عبور مواد دفعی به خارج بدن کمک می کنند (Kelloff *et al.*, 2004). روده بزرگ دارای باکتری های زیادی است که به خوبی در روده زندگی می کنند و نقش مهمی در هضم غذا دارند. این باکتری ها در خارج از روده باعث بیماری و مرگ می شوند. ولی در روده کربوهیدرات را تخمیر و هیدروژن، دی اکسیدکربن و گاز متان آزاد می کنند. این باکتری ها مسئول تجزیه بیلی روبین و ایجاد رنگ قهوه ای مدفوع نیز می باشند (Ellis, 2004). طول آن حدود ۱ متر و ۳۰ سانتی متر میباشد و از انتهای ایلئوم تا مخرج ادامه دارد. روده بزرگ دارای ۴ بخش شامل روده کور^۱، کولون، رکتوم و مقعد^۲ می باشد. کولون خود به ۴ بخش، کولون بالارو^۳، افقی^۴، پایین رو^۵ و سیگموئید^۶ تقسیم میشود (Keshav, 2003) (شکل ۱-۱).



شکل ۱-۱) آناتومی بخشهای مختلف کولون. در شکل فوق پولیپ و سرطان کولون نشان داده شده است (www.Iranvij.ir).

¹Caecum

²Anal

³Ascending Colon

⁴Transverse colon

⁵Descending colon

⁶Sigmoid colon

۱- کولون بالارو

طول کولون بالارو حدود ۱۵ سانتی متر است و به روده کور متصل است. این بخش در سمت راست حفره ی شکمی تا سطح کبد بالا رفته و در این ناحیه به سمت چپ خمیده می شود. در این نقطه قلنج راست^۱ و یا انحنای کبدی^۲ را ایجاد کرده و به شکل کولون عرضی امتداد می یابد. کولون بالارو در قسمت جلویی در هر دو سمت توسط پرده پری تونئوم^۳ پوشانده شده است در حالیکه سطح پشتی آن دارای این پرده نیست (Thibodeau and patton, 2002).

۲- کولون افقی

کولون افقی یک خمیدگی در کولون با ۴۵ سانتی متر طول می باشد که از انحنای کبدی چپ به سمت چپ حفره ی شکمی و قلنج چپ امتداد می یابد، و در پایین ترین بخش طحال خمیده می شود (Watson and Jackson, 2000).

۳- کولون پایین رو

در سمت چپ حفره ی شکمی به سمت پایین عبور کرده و تا ستیغ خاصره^۴ (لگن خاصره) ادامه دارد و حدود ۲۵ سانتی متر می باشد. این قسمت به نسبت کولون بالارو باریک تر بوده و در موقعیت خلفی تر قرار دارد (Thibodeau and Patton, 2002).

۴- کولون خمیده

این بخش از نزدیکی ستیغ خاصره آغاز شده و حدود ۳۶ سانتی متر می باشد. کولون خمیده بخش متحرک بوده و به طور کامل توسط پرده ی پری تونئوم پوشانده شده است و به دیواره لگنی به مانند یک V معکوس متصل است.

¹Right colic

²Hepalic flexure

³Peritoneum

⁴Iliac crest