بسم الله الرحمن الرحیم

این پایان نامه با همیاری انیستیتو پاستور ایران

تدوین شده است

مرکز تهران

پایان نامه

برای دریافت مدرک کارشناسی ارشد

رشته بیوشیمی

گروه علمی زیست شناسی

عنوان پایان نامه

اندازه گیری کمی بیان آنزیم COX- 2 (سیکلواکسیژناز–۲) در سلولهای سرطانی دهان قبل و پس از تاثیر نیکوتین و ارزیابی داروی Celecoxib در این روند

معصومه اصفهانی

استاد راهنما : دکتر مونا سلیمی
استاد راهنمای همکار : دکتر اطیابی
استاد مشاور: دکتر لامع راد

بهمن ۱۳۹۰

تقدیم به زلال ترین وجود هستی،مادرم

به خاطر آنچه داد و نگرفت،

بخشید و نخواست ،

و به حرمت چشمانی که صبوری کرد و تاب آورد قصورم را.

و به پدر عزیزم،

که افتخار امروز من حاصل رنج های دیروز اوست

به پاس محبت های پدرانه اش که در تمام زندگی شامل حالم بود.

ای کاش می بودند.....

تشکر و قدردانی :

سپاس یگانه دادار فرمانروارا سزد که معلم ازلی بوده است چرا که او آموخت به مخلوقش آنچه را که نمی دانست.

و با تشکراز:

–استاد ارجمندم سرکار خانم دکتر مونا سلیمی که با راهنمایی های ارزشمند و صبر و حوصله بی پایان خود همواره راهگشای اینجانب در طول مسیر بودند.

–استاد بزرگوار جناب آقای دکتر اطیابی که راهنمای همکار اینجانب در این تحقیق بودند و امکان انجام پروژه را در انستیتو پاستور کرج فراهم نمودند.

–استاد بزرگوار جناب آقای دکتر لامع راد که مشاور اینجانب در این تحقیق بودند.

– استاد بزرگوار جناب آقای دکتر حاجی حسینی که زحمت داوری این پایان نامه را بر عهده گرفتند.

–از استاد بزرگوار جناب آقای دکتر قهرمانی که امکان انجام بخشی از این پایان نامه را در آزمایشگاه سم شناسی دانشکده داروسازی دانشگاه تهران فراهم نمودند.

از همکاران بخش ب ث ژ، تحقیق و توسعه انیستیتو پاستور ایران– مجتمع تولیدی کرج – که در زمینه های مختلف با اینجانب همکاری نمودند.

– از دانشجویان دکتری داروسازی آزمایشگاه سم شناسی دکتر قهرمانی دانشگاه علوم پزشکی تهران که با محبت ها و مساعدت های بی دریغ شان همکاری نمودند.

وتمامی دوستانم: دکتر موثق،دکتر آهنگری،دکتر نوری اینانلو،آقای قوامی ومحب علی ،خانم ها: بهارک عبد امامی،آیدا برازنده،سعیده سپهدار، دکترنارسیس حبیب زاده

وخانواده ام به پاس تمامی همراهیشان در تمامی مراحل تحصیلم.

چکیده

تحقیقات نشان می‌دهند که نیکوتین در غلظت‌هایی معادل غلظت خونی افراد سیگاری(نیکوتین دوز ۵۰μg/mL با توجه به افراد سیگاری که روزانه تعداد کمتر از ۱۵ نخ سیگار مصرف می‌کنند و دوز μg/mL ۲۰۰ با توجه به افراد سیگاری که روزانه تعداد بیشتر از ۳۰ نخ سیگار مصرف می‌کنند) باعث افزایش بیان آنزیم COX-2 و PGE_2 در سرطان کولون می‌شود. در واقع نیکوتین با تحریک تولید عوامل فوق میتواند درایجاد و پیشرفت سرطان موثر باشد. لیکن تاکنون اثرات نیکوتین بر روی رده سلولی سرطانی اپیتلیال دهان بررسی نشده است. سیکلواکسیژناز (COX) یک آنزیم متصل‌شونده به غشا می‌باشد که مسئول تولید پروستاگلاندین ها، پروستاسیکلین و ترومبوکسان می‌باشد. ایزوفرم COX-1 همیشه در سلول بیان می‌شود، در حالیکه COX-2 بوسیلهٔ عوامل مختلف القا می‌گردد و نقش مهمی در بسیاری از بیماری ها از جمله سرطان بازی میکند. داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی (NSAIDS) اثرات درمانی خود را از طریق مهار COX ایجاد می‌کنند.اثرات مفید این ترکیبات مربوط به مهار COX-2 و اثرات ناخواسته مربوط به مهار COX-1 فیزیولوژیک است. هدف از انجام این مطالعه بررسی کمی فاکتورهای COX-2 و PGE_2 حاصل از تحریک رده سلولی سرطانی دهان توسط دو غلظت از نیکوتین و متعاقبا بررسی نقش بازدارنده داروی Celecoxib موجود در بازار دارویی بر روی بیان کمی فاکتورهای مذکور ناشی از تحریک نیکوتین می باشد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که Celecoxib در دوزهای پایین ۱ و۱۰ μg/mL تقریبا اثر سایتوتوکسیتی بر رشد سلولهای سرطانی دهان ندارد، در حالیکه دردوزهای بالاتر(۱۰۰μg/mL) اثر سایتوتوکسیتی از خود نشان می‌دهد. نتایج حاصل از بررسی میزان بیان COX-2 در مجاورت با دوزهای۱ و۱۰ و ۱۰۰ μg/mL توسط روش western blot نشان میدهد که سلکوکسیب در دوز های پایین موجب افزایش بیان پروتئین COX-2 می‌شود در حالیکه در دوز بالا به دلیل مرگ سلولی، بیان COX-2 متوقف می‌گردد. علاوه بر آن نتایج حاصل از اندازه گیری میزان ترشح PGE_2 نشان می دهد که میزان ترشح PGE_2 در دو دوز سلکوکسیب افزایش یافته ولی معنا دار نبوده است. همچنین نتایج حاصل از تاثیر نیکوتین در میزان بیان COX-2 و ترشح PGE_2 نشان می‌دهد که میزان این دو فاکتور در دوز μg/mL ۲۰۰ افزایش یافته که پس از تاثیر داروی سلکوکسیب کاهش چشمگیری در میزان آن ها ایجاد نگردیده است. لذا می‌توان پیشنهاد کرد که تاثیر سلکوکسیب از مسیر غیر وابسته به COX-2 بوده که نتوانسته مانع از تاثیر نیکوتین گردد.

واژگان کلیدی: سرطان،سلکوکسیب،نیکوتین،پروستا گلاندین، سیکلواکسیژناز

فهرست مطالب

فصل اول کلیات تحقیق ۱

۱- ضرورت و اهمیت بیان مسئله ۲

۱-۲-اهداف ۵

فصل دوم مبانی نظری و پیشینه تحقیق ٦

۲-۱- سرطان ۷

۲-۱-۱-سرطان‌دهان ۷

۲-۱-۲-شایع‌ترین محل‌های سرطان‌دهان ۹

۲-۱-۳-شیوع سرطان دهان ۹

۲- ۱-٤-علل زمینه ساز سرطان دهان ۱۱

۲-۱-٤-۱-دخانیات ۱۱

۲-۱-٤-۱-۲-ساختمان شیمیایی نیکوتین ۱۲

۲-۱-٤-۲-الکل ۱۳

۲-۱-٤-۳- نور خورشید ۱٤

۲- ۱-٤-٤- تحریک‌های ناشی از دندان ۱٤

۲- ۱-٥-علائم و نشانه ها ۱٥

۲-۱-٦-تشخیص ۱٦

۲- ۱-۷-درمان ۱۷

۲-۱-۷-۱-داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی ۱۷
۲-۲-آنزیم سیکلو اکسیژناز (COX) ۲۰
۲-۲-۱- مسیر سنتز پروستاگلاندینهاو جایگاه آنزیم COX ۲۰
۲-۲-۲- انواع ایزوفرمهاي COX ۲۳
۲-۲-۳- عملکردهاي فیزیولوژیك و پاتولوژیك ایزوفرمهاي COX ۲۵
۲-۲-٤-مکانیسمهای ایجاد سرطان توسط COX-2 ..... ۲٦
۲-۳- مهارکننده‌های سیکلواکسیژناز ۲۷
۲-۳-۱- مهارکننده‌هاي انتخابيCOX-2 (خانواده‌کوکسیب ها) ۲۸
۲-۳-۱-۱-ساختمان شیمیایی سلکوکسیب ۲۸
۲-۳-۲-نقش مهار کننده های COX-2 در جلوگیری از سرطان ۲۸
فصل سوم روش تحقیق ۳۱
۳-۱-کشت سلولی ۳۲
۳-۱-۱- مواد، وسایل ودستگاهها ۳۲
۳-۱-۲- رده سلولی مورد استفاده ۳۳
۳-۲-محلولهای مورد استفاده ۳٤
۳-۲-۱-محیط کشت: ۳٤
۳-۲-۲-سرم ۳۵
۳-۲-۳-پني سیلین/ استرپتومایسین ۳٦
۳-۲-٤-بافرPBS : ۳۷

۳-۲-۵- تریپسین-EDTA ۳۷
۳-۲-٦-محیط انجماد سلول: ۳۸
۳-۲-۷-محلول تریپان بلو: ۳۸
۳-۲-۸-محلول سلکوکسیب (۱۰۰،۱۰،۱µg/mL) ۳۹
۳-۲-۸-۱-طرز تهیه سلکوکسیب ۱۰۰،۱۰،۱ µg/mL ۳۹
۳-۲-۹-محلول نیکوتین (۲۰۰،۵۰µg/mL) ٤۰
۳-۲-۹-۱-طرز تهیه نیکوتین ۲۰۰ ،۵۰ µg/mL ٤۰
۳-۳- تکنیکهای کشت سلولی ٤۱
۳-۳-۱- ذوب کردن و کشت سلولی ٤۱
۳-۳-۲- کشت مجدد سلولی ٤۳
۳-۳-۳- تعویض محیط کشت ٤۵
۳-۳-٤- منجمد کردن ٤٦
۳-۳-۵- شمارش سلولی مستقیم به روش Trypan blue dye exclusion ٤۸
۳-۳-۵-۱-مواد و وسائل مورد نیاز ٤۸
۳-۳-۵-۲-روش انجام آزمایش ٤۹
۳-٤- آزمایش کمی سنجش متابولیکی تکثیر سلولی و تعیین حیات سلول(MTT ASSAY) ۵۲
۳-٤-۱- مواد، وسایل ودستگاه ها ۵۲
۳-٤-۲-کلیات ۵۳
۳-٤-۳- آماده سازی MTT ۵٦

٣-٤-٤-روش انجام آزمون ٥٦
٣-٥-وسترن بلات ٥٧
٣-٥-١- مواد،وسايل ودستگاهها ٥٧
٣-٥-٢- اندازه گيري ميزان بيان COX-2 ..... ٥٩
٣-٥-٢-١-استخراج پروتئين واندازه گيری مقدار پروتئين تام ٥٩
٣-٥-٢-٢- سنجش پروتئين تام به روشBradford ٦٠
٣-٥-٢-٣-الكتروفورز پروتئين ها: ٦٢
٣-٥-٢-٤- مرحله SDS-PAGE ٦٤
٣-٥-٢-٤-١-آماده سازي ژل: ٦٤
٣-٥-٢-٥- ترانسفر يا انتقال به غشاء ٦٦
٣-٥-٢-٦- مراحل مجاورت با محلول بلاک کننده ٦٨
٣-٥-٢-٧- رنگ آميزي ژل: ٦٩
٣-٥-٢-٨-مرحله مجاورت با آنتي بادي اوليه ٧٠
٣-٥-٢-٩- مراحل مجاورت با آنتي بادي ثانويه ٧٠
٣-٥-٢-١١-اندازه گيری كمي باندها: ٧٢
٣-٥-٢-١٢- مرحله Strip reprobe: ٧٢
٣-٦- اندازه گيری كمی پروستاگلاندين E2 ..... ٧٢
٣-٦-١-كليات آزمون ٧٣
٣-٦-٢-مواد و وسايل مورد نياز ٧٣

۳-٦-۳-مرحله آماده سازی نمونه ها ۷۵
۳-٦-۳-۱-رقیق سازی نمونه‌ها ۷۵
۳-٦-٤-مراحل آماده سازی محلولها ۷۵
۳-٦-٤-۱- رقیق سازی بافر شستشو ۷۵
۳-٦-٤-۲-محلول سوبسترا ۷٦
۳-٦-٤-۳-رقت سازیPGE2 استاندارد ۷٦
۳-٦-٥-روش انجام آزمایش ۷۷
۳-۷-آزمون آماری ۷۹
۳-۷-۱-نتایج آزمون سمیت سلولی ۸۰
فصل چهارم یافته های تحقیق ۸۱
٤-۱- بررسی میزان زنده ماندن سلولهای BHY ۸۲
٤-۱-۱-اثر سلکوکسیب و نیکوتین بر میزان زنده ماندن سلولهای BHY ۸۲
٤-۲-مطالعه‌اثرسلکوکسیب و نیکوتین بر بیان COX-2 ..... ۸۳
٤-۳- مطالعه اثر سلکوکسیب و نیکوتین بر میزان PGE2 ترشحی سلولهای BHY ۸٦
فصل پنجم جمع بندی و نتیجه گیری ۸۹
بحث ۹۰
پیشنهادات ۹۵
جدول اختصارات ۹٦

پیوست ۱ ..... ۹۷
منابع ۹۸
Abstract ۱۱۰

فهرست اشکال

شکل۲-۱ -مسیرسنتز پروستاگلاندین و ترومبوکسان.....۲۲

شکل۳-۱- سطح مدرج لام نئوبار (Improved) مورد استفاده جهت شمارش سلولی.....۵۱

شکل ۳-۲- متابولیسم MTT به نمک فورمازان بوسیله سلول های زنده ۵٤

شکل ۳-۳-مقایسه جذب UVمحلول MTT Labeling (خط نقطه چین) و نمک فورمازان (خط پیوسته) پس از حل شدن.....۵۵

شکل ۳-٤-شکل ۳-۳-مقایسه جذب UVمحلول MTT Labeling (خط نقطه چین) و نمک فورمازان (خط پیوسته) پس از حل شدن.....۵۵

شکل ۳-۵-مراحل تهیه ژل الکتروفورز قبل ازترانسفرپروتئین.....٦۵

شکل ۳-۶-مرحلهتهیهساندویچ(ترانسفر).....۶۷

شکل۳-۷-مراحل مجاورت غشا با محلول بلاک کننده، آنتی بادی اولیه، ششستشو، آنتی بادی ثانویه.....۷۱

شکل۳-۸مرحلهظهوربانددراتاقتاریک.....۷۱

شکل٤-۱-بررسی بیان COX-2 در سلولهاي BHY مجاور شده با غلظت های مختلف سلکوکسیب در حضور و عدمحضورنیکوتین.....۸٤و۸۵

شکل ٤-۲-بررسی میزان ترشح PGE2 در سلولهای BHYمجاور شده با غلظت های مختلف سلکوکسیب در حضوروعدمحضورنیکوتین.....۸۸

فهرست جداول

جدول ۳-۱- تیمار سلول‌های BHY جهت روش MTT..... ۵۷

جدول۳-۲.تیمار سلولهای BHY جهت استخراج پروتئین برای وسترن بلات..... ۶۳

جدول۳-۳-ترکیب تشکیل دهنده ژل جداکننده%۱۰و ژل متراکم کننده %۵..... ۶۴

جدول٤-۱- درصد زنده ماندن سلولهاي سرطان دهانBHY حاصل از مجاورت با سلکوکسیب در حضوروعدمحضورنیکوتین..... ۸۳

. جدول ٤—۲-بررسی میزان ترشح PGE2 در سلولهای BHY تیمار شده با غلظت های مختلف سلکوکسیب در حضور و عدم حضور نیکوتین..... ۸۶

فصل اول

کلیات تحقیق

۱- ضرورت و اهمیت بیان مسئله

دود سیگار یک معضل بزرگ سلامت محسوب میشود و ارتباط تنگا تنگ با سرطان دارد. مدارک دال بر این است که افراد سیگاری در معرض درصد بالاتری از انواع سرطانها نسبت به افراد غیرسیگاری هستند (اسلتری[۱]-۲۰۰۳، ژانگ[۲]-۲۰۰۳،الریچ[۳]-۲۰۰۱). بیشتر از ٤٥۰۰ نوع ترکیب در دود سیگار موجود است که عوارض مخربی را در سیستم بیولوژیک ایجاد میکند. یکی از این ترکیبات نیکوتین است که در مطالعات اخیر مکانیسم نیکوتین در سرطان دستگاه گوارش مورد بررسی قرار گرفته است(وونگ[٤]-۱۹۸٦،ویویان[٥]-۲۰۰٤). دود سیگار یک فاکتور خطرزا در بروز و یا پیشرفت بیماریهای دهانی نیز محسوب میشود.از آنجا که بیش از ۹۰٪ بدخیمی های دهان از نوع سرطان سلول سنگفرشی دهان (OSCC)[٦]میباشد. این بدخیمی در مردان و زنان به ترتیب ششمین و دوازدهمین سرطان شایع محسوب میشود. در بین بیماران مبتلا به سرطان دهان در صد افراد سیگاری، دو تا سه برابر جمعیت عمومی میباشد. مطالعات بسیاری مبنی بر آزمایش اثرات مواد موجود در سیگار و یا هر کدام از مواد به تنهایی بر روی بافت های دهانی همانند اپیتلیوم و بافت همبند وجود دارد. این

---

[1] -Slattery

[2] -Zhang

[3] -Ulrich

[4] -wong

[5] -Vivian

[6] -Oral Squamous Cell Carcinoma

مطالعات به منظور بررسی تغییرات التهابی و یا پاسخ میزبان به نیکوتین به عنوان ترکیب عمده سیگار انجام شده است. بررسی های انجام گرفته نشان می‌دهد که نیکوتین برای بافت فیبروبلاست سمی بوده واثرات مهارکنندگی در زنده ماندن سلول‌ها، اتصال و تکثیر سلول ها و سنتز پروتئین ماتریکس را دارد (هو[1]-۲۰۰۶،هابر[2] -۱۹۹۳،برگستروم[3]-۲۰۰۰،چانگ[4] -۲۰۰۱،چانگ-۲۰۰۳) در مطالعات صورت گرفته نشان داده شده که نیکوتین می‌تواند بیان آنزیم COX-2 و Hemeoxygenase-1 را در سلولهای فیبروبلاست افزایش دهد (چانگ-۲۰۰۳،چانگ-۲۰۰۵) آنزیم سیکلواکسیژناز (COX) یک آنزیم rate-limiting است که تبدیل آراشیدونیک اسید به پروستاگلاندین اندوپراکسیداز را تسهیل می‌کند که ماده اخیر در اثر تبدیل آنزیمی به پروستاگلاندین (PG) و ترومبوکسان A_2 تبدیل می‌شود. دو ایزوفرم از COX مشخص گردیده است. COX-1 که به صورت ذاتی در مقادیر اندک در اکثر بافت ها بیان می‌گردد و COX-2 به صورت القایی در پاسخ به عوامل تکثیری و التهابی در تعدادی از بافتها بیان میشود. در مطالعات اخیر نشان داده شده است که نیکوتین باعث القائ بیان پروتئین و mRNA پروتئین COX-2 در سلولهای فیبروبلاست لثه در انسان می‌شود. بنابراین یکی از مکانیسم های بیماریزا در التهاب مزمن افزایش بیان پروتئین COX-2 در افراد سیگاری می‌باشد

[1] -Ho

[2]-Haber

[3] -Bergstrom

[4] -chang

(مایر[1] -۱۹۹۰،چانگ۲۰۰۳). COX-2 نه تنها یک مارکر التهابی می‌باشد بلکه ارتباط تنگاتنگی با سرطان هم دارد. بیان پروتئین COX-2 در بسیاری از بافت های بدخیم افزایش می‌یابد در حالیکه بیان این پروتئین در بافت های نرمال بسیار اندک می‌باشد (کاواب[2] -۲۰۰۲،سارکس[3] -۲۰۰۲). در این راستا ارتباط بین نیکوتین و بیان پروتئین COX-2در سرطان معده و روده نیز بررسی شده است. (ویویان-۲۰۰٤). با در نظر گرفتن مطالب فوق، به منظور یافتن تاثیر نیکوتین برروی این نوع سرطان بررسی فاکتور COX-2 ضروری به نظر می‌رسد. علاوه بر اینکه با توجه به اثرات گزارش شده از مهار کننده اختصاصی پروتئین COX-2 همانند NS-398 در جلوگیری از ایجاد بد خیمی، ومصرف روزانه celecoxib بعنوان داروی رایج ضد التهاب می‌توان مکانیسم احتمالی داروی فوق را در جلوگیری از پیشرفت سرطان دهان نیز تعیین نمود (جیانوپوالو[4] -۱۹۹۹،لی[5] -۲۰۰۵). در بین داروهای مهارکننده اختصاصی COX-2 مشاهده گردیده است که celecoxib به صورت خوراکی ویا موضعی بر روی هامستر می‌تواند از سرطان دهان قبل از بدخیم شدن آن جلوگیری نماید (چانگ-۲۰۰۱). اما هیچگونه شواهدی مبنی بر تاثیر Celecoxib بر روی روند پیشرفت سرطان دهان در افراد سیگاری موجود نمی باشد. لذا یافتن تاثیر دو غلظت از نیکوتین (نشانگر میزان احتمالی نیکوتین در خون افراد سیگاری شدید و خفیف) بر روی رده سلولی سرطان دهان (BHY) از طریق اندازه گیری

---

[1] -Maier

[2] -Kawabe

[3] -Saareks

[4] -Giannopoalou

[5] -Li

کمی فاکتور COX-2 می‌تواند ما را در شناخت بیشتر مولکولی تاثیر نیکوتین در سرطان دهان کمک نماید که به تبع آن افق روشنی را در درک بهتر تاثیر سیگار بر روی پیشرفت این بدخیمی و در نتیجه یافتن راه های درمان آن کمک نماید.قابل توجه می‌باشد که پروستاگلاندینE_2 (PGE_2) . نیز به عنوان متابولیت آنزیم COX-2 می‌تواند در پیشرفت بدخیمی موثر باشد.لذا اندازه گیری این فاکتور نیز مد نظر قرار گرفت. در عین حال با بررسی تفاوت های احتمالی پس از تاثیر داروی celecoxib با سه غلظت ۱ و۱۰و۱۰۰ µg/mL می‌توان مکانیسمی مناسب جهت اثرات فارماکولوژیک این دارو در سرطان دهان ترسیم نمود. در عین حال تاکنون celecoxib به عنوان مهار کننده اختصاصی COX-2 به عنوان داروی موثر در التهاب توجه قرار گرفته است. اما تاکنون هیچگونه کار تحقیقاتی در زمینه تاثیر این دارو بر روی رده سلولی سرطان دهان پس از تیمار با نیکوتین انجام نپذیرفته است.

۱-۲-اهداف

هدف از این تحقیق بررسی اثرات نیکوتین و تغییرات احتمالی ناشی از آن در میزان فاکتور COX-2 و PGE_2 بر رده سلولی سرطان مخاط دهان واثرات celecoxib به عنوان داروی مهار کننده اختصاصی COX-2 بر تحریک نیکوتینی رده سلولی سرطان اپیتلیال دهان به منظور یافتن یکی از مکانیسم های احتمالی این دارو در جلوگیری از این نوع سرطان می‌باشد.

فصل دوم

مبانی نظری و پیشینه تحقیق