بسم الله الرحمن الرحيم

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران

۳۳۶۹۴

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته هماتولوژی

عنوان

بررسی آپوپتوزیس و اثرات سیتوتوکسیتی داروهای شیمی درمانی و ATRA بر روی ردهٔ سلولی HL60 به همراه فاکتور رشد GM-CSF

نگارش

رامین سعادتیان ۱۳۸۱ /۵/ ۳۰

استاد راهنما

دکتر علی اکبر پور فتح اله

استاد مشاور

دکتر فرهاد ذاکر

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
تهیه شده در مرکز

بهار ۱۳۸۱

۷۷۶۹۴

«فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان‌نامه کارشناسی ارشد»

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد **آقای رامین سعادتیان خراجو**

رشته : **هماتولوژی** گرایش:

تقدیم می‌شود. اینجانبان نسخهٔ نهائی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوی بررسی و تأیید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجهٔ کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنیم.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

جناب آقای دکتر علی اکبر پورفتح اله (استاد راهنما)

جناب آقای دکتر فرهاد ذاکر (استاد مشاور)

جناب آقای دکتر احمد زواران حسینی (استاد ناظر و نماینده شورای تحصیلات تکمیلی)

سرکار خانم دکتر فرزانه اوسطی آشتیانی (استاد ناظر)

بسمه‌تعالی

آیین‌نامهٔ چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرّس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرّس، مبیّن بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

مادّهٔ ۱ در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اطلاع دهد.

مادّهٔ ۲ در صفحهٔ سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد/~~رسالهٔ دکتری~~ نگارنده در رشتهٔ حمایتوری است که در سال ۱۳۸۱ در دانشکدهٔ علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرّس به راهنمایی ~~سرکار خانم~~/جناب آقای دکتر علی‌اکبر پورفتح ال، مشاورهٔ ~~سرکار خانم~~/جناب آقای دکتر فرهاد ذاکی و مشاورهٔ ~~سرکار خانم~~/جناب آقای دکتر مسعود سلیمانی از آن دفاع شده است.»

مادّهٔ ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

مادّهٔ ۴ در صورت عدم رعایت مادّهٔ ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ‌شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرّس، تأدیه کند.

مادّهٔ ۵ دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در مادّهٔ ۴ را از محلّ توقیف کتابهای عرضه‌شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

مادّهٔ ۶ اینجانب راسین سعادتیان دانشجوی رشته حمایتوری مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی: راسین سعادتیان

تاریخ و امضا: ۱۳۸۱/۳/۲۶

تقدیم به :

به نگاههای مهربان و همیشـــه مضطـرب , قامتـهای اسـتوار و همیشـه مقـاوم , سنگهای صبوری که غمهایم را به دل کشیدند و مرا پابه پای خویش در کشاکش زندگی حمایت کردند

به پدر و مادر عزیزم

خواهر و برادران مهربانم

که محبتهایشان را هرگز فراموش نخواهم کرد

تقدیر و تشکر

سپاس بیکران خداوند بزرگ را که قطره ای از اقیانوس بی انتهای علم را به من عنایت فرمود تا همواره نیازمند بهره ای دیگر باشم و توفیق تعلم در محضر اساتید گرانقدری که مقام علمی و شخصیت متعالی آنان همواره مشعل هدایت دانشجویان بوده است برایم فراهم شود.

بدینوسیله بر خود لازم می دانم از :

استاد محترم راهنما جناب آقای دکتر علی اکبر پورفتح اله که در همه حال چه در زمان تحصیل وچه در زمان انجام کار پایان نامه بزرگترین حامی و پشتیبان من بودند و همواره با رهنمودهای علمی شان راهنمای من بودند

اساتید محترم مشاور جناب آقای دکتر فرهاد ذاکر وجناب آقای دکتر مسعود سلیمانی که کمک و راهنمایی های فراوانی برای بنده انجام دادند

اساتید محترم گروه جناب آقای دکتر کاویانی، جناب آقای دکتر مرتضوی ، جناب آقای دکتر حاج فتحعلی و خانم دکتر اوسطی آشتیانی

تقدیر وتشکر نمایم و نهایت سپاسگزاری را از این بزرگان داشته باشم

وهمچنین از سرکار خانم اصغری کارشناس گروه هماتولوژی , جناب آقای دکتر فریدون مهبودی رئیس بخش بیوتکنولوژی انستیتو پاستور , آقای احمد عادلی کارشناس بخش بیوتکنولوژی انستیتو پاستور , جناب آقای دکتر امینی , جناب آقای دکتر یادگاری و دوستان گرامیم آقای مجید ترماحی اردستانی , علی اصغر کیانی , حسن تکمه داشی , حمید آزادگان , محمد حسن خسرو خاور , مهدی فرجپور , رضا غلام نیا تقدیر وتشکر می نمایم.

چکیده

شیمی درمانی اساس درمان بسیاری از لوسمی ها می باشد که از آن جمله می توان به لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (APL) اشاره نمود. این لوسمی در اثر توقف تمایز در ردهٔ سلولی پرومیلوسیتی و تکثیر کنترل نشدهٔ این سلولها مشخص می شود. جابجایی کروموزومی t(15;17)(q22;q11) شایعترین اختلال سیتوژنتیک در این بیماری است که به دلیل جابجایی بین ژن RARα و ژن PML صورت می گیرد. برای مدتهای زیادی استفاده از داروهای شیمی درمانی جهت درمان این لوسمی رایج بود ولی اخیرا از روش تمایز درمانی با استفاده از ATRA جهت درمان این گونه از بیماران استفاده می شود. داروهای شیمی درمانی با ایجاد آپوپتوزیس در سلولهای لوسمی باعث نابودی این سلولها می شوند و عمده ترین دلیل سیتوتوکسیک بودن این داروها را به خاطر فعال نمودن روند آپوپتوزیس توسط این داروها می دانند. همچنین بیماران APL که تحت درمان با داروهای شیمی درمانی قرار گرفته اند به خاطر عوارض همین داروهای شیمی درمانی دچار گرانولوسیتوپنی و ترومبوسیتوپنی می شوند که برای جبران این کاهش سلولها از فاکتور رشد GM-CSF استفاده می شود که نشان داده شده که فاکتور رشد GM-CSF باعث کاهش اثر آپوپتوزیس داروهای شیمی درمانی می شود. در این تحقیق سعی شده است که اثرات آپوپتوزیس داروهای سیتارابین ، دانوروبیسین ، داکسوروبیسین و ATRA ارزیابی گردد و همچنین تاثیر استفاده همزمان فاکتور رشد GM-CSF با این داروها بر میزان آپوپتوزیس آنها مورد بررسی قرار گیرد.

ردهٔ سلولی HL60 در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ FCS در دمای 37°c و ۵٪ گاز CO_2 کشت داده شدند. سپس داروهای سیتارابین ، دانوروبیسین ، داکسوروبیسین و ATRA به تنهایی و به همراه فاکتور رشد GM-CSf به مدت ۲٤ ساعت بر روی تعداد مشخصی از سلولهای HL60 اثر داده شدند. آپوپتوزیس ایجاد شده بعد از ۲٤ ساعت توسط روشهای DNA Ladder با استخراج و الکتروفورز DNA سلولهای تیمار شده با داروهای فوق ، رنگ آمیزی فلورسانس با استفاده از رنگهای اتیدیوم بروماید و اکریدین اورنج و شمارش سلولها به وسیلهٔ میکروسکوپ فلورسانس و در نهایت با روش فلوسیتومتری با استفاده از کیت Annexin V و PI مورد بررسی قرار گرفت. همچنین اثرات سیتوتوکسیتی این داروها و اثر GM-CSF بر روی آنها بوسیلهٔ روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج بدست آمده از روش DNA Ladder نشان می دهد که داروهای سیتارابین ، دانوروبیسین ، داکسوروبیسین و ATRA باعث شکسته شدن DNA و در نتیجه ایجاد روند آپوپتوزیس در سلولهای ردهٔ HL60 تیمار شده با این داروها می شود و الگوی نردبانی بدست آمده از الکتروفورز DNA استخراج شده از این سلولها این مطلب را اثبات می کند. همچنین نتایج بدست آمده از رنگ آمیزی

فلورسانس این سلولهای تیمار شده با داروهای فوق و شمارش آنها با میکروسکوپ فلورسانس و روش فلوسیتومتری وقوع آپوپتوزیس در این سلولها را توسط داروهای استفاده شده را تایید می کند. همچنین نتایج نشان می دهند که استفادهٔ همزمان این داروها با فاکتور رشد GM-CSF باعث کاهش میزان آپوپتوزیس این داروها می شود که با روشهای رنگ آمیزی فلورسانس و روش فلوسیتومتری مورد بررسی قرار گرفتند.همچنین آزمایش MTT نشان داد که اثر سیتوتوکسیتی این داروها بسیار کمتر از اثر آپوپتوزیس آنها می باشد و این داروها با مکانیسم فعال سازی روند آپوپتوزیس است که اثرات مرگ سلولی را ایجاد می کنند و استفادهٔ همزمان این داروها با GM-CSf باعث کاهش اثر آپوپتوزی واثر سیتوتوکسیتی این داروها می شوند.

کلمات کلیدی : لوسمی پرومیلوسیتیک حاد – HL60 – آپوپتوزیس – سیتارابین – دانوروبیسین – داکسوروبیسین – ATRA

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اوّل : مقدمه ۱

فصل دوّم: کلیات ٤

۲-۱ لوسمی ٥

۲-۱-۱ اتیولوژی سرطان و لوسمی ٦

۲-۱-۲ طبقه بندی لوسمی‌ها ۹

۲-۲ AML-M_3 ..... ۱۲

۲-۲-۱ اتیولوژی AML-M_3 ..... ۱۳

۲-۲-۲ اپیدمیولوژی M_3 ..... ۱٤

۲-۲-۳ پاتوفیزیولوژی و تظاهرات بالینی M_3 ..... ۱٤

۲-۲-٤ یافته‌های آزمایشگاهی ۱٦

۲-۲-٥ M_3m (میکروگرانولار) یا M_3V (متغیر) ۱۷

۲-۲-٦ نقص کروموزوی در AML-M_3 ..... ۱۷

۲-۲-۷ نقص مولکولی در AML-M_3 ..... ۱۹

۲-۲-۸ ژن $RAR\alpha$ طبیعی ۲۱

۲-۲-۹ ژن PML طبیعی ۲۲

۲-۲-۱۰ ترکیب ژنی ۲٤

۲-۲-۱۱ پروتئین ترکیبی ۲٥

۲-۳ روشهای تشخیص مولکولی ۲۷

عنوان	صفحه

۲-٤ درمان ۳۳
۲-٤-۱ شیمی درمانی ۳۳
۲-٤-۱-۱ تقسیم بندی داروهای ضد سرطان ۳٤
۲-٤-۱-۲ مکانیسم عمل داروهای ضد سرطان ۳۸
۲-٤-۲ پیوند مغز استخوان ۳۹
۲-٤-۳ تمایز درمانی ۳۹
۲-٤-۳-۱ تمایز درمانی با ATRA ٤۰
۲-٥ داروهای مورد استفاده در این تحقیق ٤۰
۲-٥-۱ رتینوئیدها ٤۰
۲-٥-۱-۱ مکانیسم عمل ٤۰
۲-٥-۱-۲ رتینوئیدها و خونسازی ٤۲
۲-٥-۱-۳ جنبه‌های ساختمانی فعالیت رتینوئیدها ٤۲
۲-٥-۱-٤ مکانیسم فعالیت RA ٤۳
۲-٥-۲ سیتارابین ٤٤
۲-٥-۲-۱ کاربردهای بالینی سیتارابین ٤٦
۲-٥-۳ آنتراسیکلینها ٤٦
۲-٥-۳-۱ دانوروبیسین ٤٦
۲-٥-۳-۱-۱ ساختمان دانوروبیسین ٤٦
۲-٥-۳-۱-۲ مکانیسم عمل دانوروبیسین ٤۷
۲-٥-۳-۲ داگسوروبیسین ٤۸
۲-٥-۳-۲-۱ ساختمان داگسوروبیسین ٤۹
۲-٥-۳-۲-۲ موارد استفاده بالینی ٤۹
۲-٥-٤ فاکتور تحریک کنندهٔ رشد گرانولوسیت، مونوسیت (GM-CSF) ٤۹
۲-٥-٤-۱ خصوصیات پروتئین GM-CSF ٥۰

عنوان	صفحه

۲-۵-٤-۲ ساختمان ژن GM-CSF ۵۰

۲-۵-٤-۳ گیرنده‌های GM-CSF ۵۱

۲-۵-٤-٤ زیر واحدهای گیرنده GM-CSF ۵۱

۲-۵-٤-۵ فعالیتهای بیولوژیک GM-CSF ۵۲

۲-٦ آپوپتوزیس ۵۳

۲-٦-۱ تاریخچه و تعریف ۵۳

۲-٦-۲ مرگ برنامه ریزی شده سلول ۵٤

۲-٦-۳ تقسیم بندی انواع مرگ سلولی ۵۵

۲-٦-۳-۱ مرگ سلولی نوع اوّل ۵۵

۲-٦-۳-۲ مرگ سلولی نوع دوّم ۵٦

۲-٦-۳-۳ مرگ سلولی نوع سوم ۵٦

۲-٦-۳-٤ مرگ سلولی تدریجی ۵۸

۲-٦-٤ ویژگیهای آپوپتوزیس ۵۸

۲-٦-٤-۱ آپوپتوز ۵۸

۲-٦-٤-۲ وقایع هسته‌ای آپوپتوزیس ۵۹

۲-٦-٤-۳ وقایع سیتوپلاسمی ٦۰

۲-٦-٤-٤ وقایع غشای پلاسمایی ٦۱

۲-٦-٤-۵ تشکیل اجسام آپوپتوتیک ٦۲

۲-٦-۵ بیولوژی مولکولی و بیوشیمی آپوپتوزیس ٦۳

۲-٦-۵-۱ ژنهای مرگ ٦۳

۲-٦-۵-۲ محرکهای مسیر مرگ سلول ٦٤

۲-٦-۵-۲-۱ پروتئین‌های همولوگ Ced-3 ..... ٦٤

۲-٦-۵-۲-۲ پروتئین‌های همولوگ Ced-9 در پستانداران ٦٤

عنوان		صفحه

۲-٦-٦ مسیرهای پیام دهندهٔ آپوپتوزیس ٦٥

۲-٦-۷ چگونگی فعال شدن آپوپتوزیس ۷۱

۲-٦-۸ داروهای شیمی درمان و آپوپتوزیس ۷۲

۲-۷ نکروزیس ۷۳

۲-۷-۱ تفاوت نکروز با آپوپتوز ۷٤

۲-۸ ردهٔ سلول HL_6O ۷٤

فصل سوّم: مواد و روشها ۷٥

۳-۱ مواد و روشها ۷٦

۳-۱-۱ ابزار مورد نیاز ۷٦

۳-۱-۲ مواد مورد نیاز ۷۷

۳-۲ آماده کردن محلولها و بافرها ۷۹

۳-۲-۱ طرز تهیه بافر نمکی PBS ۰/۱٥ از مولار PH=7.2 ..... ۷۹

۳-۲-۲ تهیه اسید سولفوکرومیک ۷۹

۳-۲-۳ تهیه محلول کشت سلول RPMI-1640 ..... ۷۹

۳-۲-٤ تهیه بافر لیز کننده ۸۰

۳-۲-٥ تهیه بافر Tris Hcl یک مولار ۸۱

۳-۲-٦ تهیه بافر EDTA نیم مولار ۸۱

۳-۲-۷ تهیه محلول ذخیره SDS ده درصد ۸۱

۳-۲-۸ طرز تهیه محلول پروتئیناز k (۱۰mg/ml) ۸۱

۳-۲-۹ طرز تهیه فنل متعادل شده با بافر Tris Hcl ۸۱

۳-۲-۱۰ تهیه بافر TE ۸۲

۳-۲-۱۱ تهیه کلروفرم ایزوآمیل الکل ۸۲

۳-۲-۱۲ تهیه بافر TBE ۱۰ × ۸۳

عنوان	صفحه

۳-۲-۱۳ تهیه بافر نمونه گذاری ۱۰ × ۸۳
۳-۲-۱٤ تهیه محلول ذخیرهٔ اتیدیوم بروماید ۸۳
۳-۲-۱۵ تهیه محلول ذخیرهٔ اکریدین اورنج ۸٤
۳-۲-۱٦ تهیه غلظتهای مختلف داروی سیتارابین ۸٤
۳-۲-۱۷ تهیه غلظتهای مختلف داروی دانوروبیسین ۸۵
۳-۲-۱۸ تهیه غلظتهای مختلف داروی داگسوروبیسین ۸٦
۳-۲-۱۹ تهیه غلظتهای مختلف داروی ATRA ۸٦
۳-۲-۲۰ تهیه محلول GM-CSF ۸۷
۳-۳ شستشو و استریل کردن وسایل ۸۸
۳-٤ کشت سلول ۸۸
۳-۵ ذخیره سلول ۸۸
۳-٦ خارج کردن سلولهای فریز شده ۸۹
۳-۷ استخراج و تخلیص DNA ۸۹
۳-۷-۱ روش کار ۸۹
۳-۷-۲ بررسی خلوص DNA استخراج شده ۹۰
۳-۸ الکتروفورز DNA استخراج شده ۹۱
۳-۸-۱ مواد وسایل مورد نیاز ۹۱
۳-۸-۲ تهیه آگارز ۱/۵ درصد ۹۱
۳-۸-۳ روش کار الکتروفورز DNA ۹۲
۳-۹ بررسی فلورسانس آپوپتوزیس ۹۲
۳-۹-۱ مواد و وسایل مورد نیاز ۹۲
۳-۹-۲ روش کار ۹۲
۳-۱۰ بررسی فلوسیتومتری آپوپتوزیس ۹۳
۳-۱۰-۱ مواد و وسایل مورد نیاز ۹۳

عنوان	صفحه

۳-۱۰-۲ روش کار ۹۳
۳-۱۱ سنجش MTT ۹۳
۳-۱۱-۱ مواد و وسایل مورد نیاز ۹۳
۳-۱۱-۲ روش تهیه محلول MTT ۹۳
۳-۱۱-۳ روش سنجش MTT ۹٤
۳-۱۲ تهیه سلولهای تیموس رت ۹٤
۳-۱۲-۱ خارج کردن تیموس از بدن رت ۹٤
۳-۱۲-۲ خارج کردن تیموسیتها از تیموس ۹۵

فصل چهارم: نتایج ۹٦

٤-۱ بررسی آپوپتوزیس بوسیله الکتروفوز DNA ۹۷
٤-۱-۱ نتایج حاصل از اثر داروی Ara-c بر سلول HL 60 بوسیله روش الکتروفورز DNA ۹۸
٤-۱-۲ نتایج حاصل از اثر داروی Daunorubicin بر سلول HL 60 بوسیله روش الکتروفورز DNA ۹۸
٤-۱-۳ نتایج حاصل از اثر داروی Doxorubicin بر سلول HL 60 بوسیله روش الکتروفورز DNA ۹۸
٤-۱-٤ نتایج حاصل از اثر داروی ATRA بر سلول HL 60 بوسیله روش الکتروفورز DNA ۹۸
٤-۲ بررسی آپوپتوزیس بوسیله میکروسکوپ فلورسانس ۹۹
٤-۲-۱ نتایج حاصل از اثر آپوپتوزیس داروی Ara-C بر روی سلول HL 60 و اثر GM-CSF بر آن به روش میکروسکوپ فلورسانس. ۱۰۰

عنوان	صفحه

٤-٢-٢ نتایج حاصل از اثر آپوپتوزیس داروی Daunorubicin بر روی سلول HL 60 و اثر GM-CSF بر آن به روش میکروسکوپ فلورسانس ١٠٠

٤-٢-٣ نتایج حاصل از اثر آپوپتوزیس داروی Doxorubicin بر روی سلول HL 60 و اثر GM-CSF بر آن به روش میکروسکوپ فلورسانس..... ١٠١

٤-٢-٤ نتایج حاصل از اثر آپوپتوزیس داروی ATRA بر روی سلول HL 60 و اثر GM-CSF بر آن به روش میکروسکوپ فلورسانس ١٠١

٤-٣ ارزیابی آپوپتوزیس بوسیله فلوسیتومتری با استفاده از Annexin v و PI ١٠٢

٤-٣-١ نتایج حاصل از اثر آپوپتوزیس Ara-c بر روی سلول HL 60 و اثر GM-CSF بر آن به روش فلوسیتومتری ١٠٢

٤-٣-٢ نتایج حاصل از اثر آپوپتوزیس Dauorubicin بر روی سلول HL 60 و اثر GM-CSF بر آن به روش فلوسیتومتری ١٠٣

٤-٣-٣ نتایج حاصل از اثر آپوپتوزیس Doxorubicin بر روی سلول HL 60 و اثر GM-CSF بر آن به روش فلوسیتومتری ١٠٤

٤-٣-٤ نتایج حاصل از اثر آپوپتوزیس ATRA بر روی سلول HL 60 و اثر GM-CSF بر آن به روش فلوسیتومتری ١٠٥

٤-٤ بررسی اثر سیتوتوکسیک داروها بوسیله MTT ١٠٦

٤-٤-١ بررسی اثر سیتوتوکسیتی Ara-c بر سلول HL60 بوسیله MTT ١٠٧

٤-٤-٢ بررسی اثر ستوتوکیستی Dauorubicin بر سلول HL 60 بوسیله MTT ١٠٧

٤-٤-٣ بررسی اثر ستوتوکیستی Doxorubicin بر سلول HL 60 بوسیله MTT ١٠٧

٤-٤-٤ بررسی اثر سیتوتوکسیتی ATRA بر سلول HL 60 بوسیله MTT ١٠٨