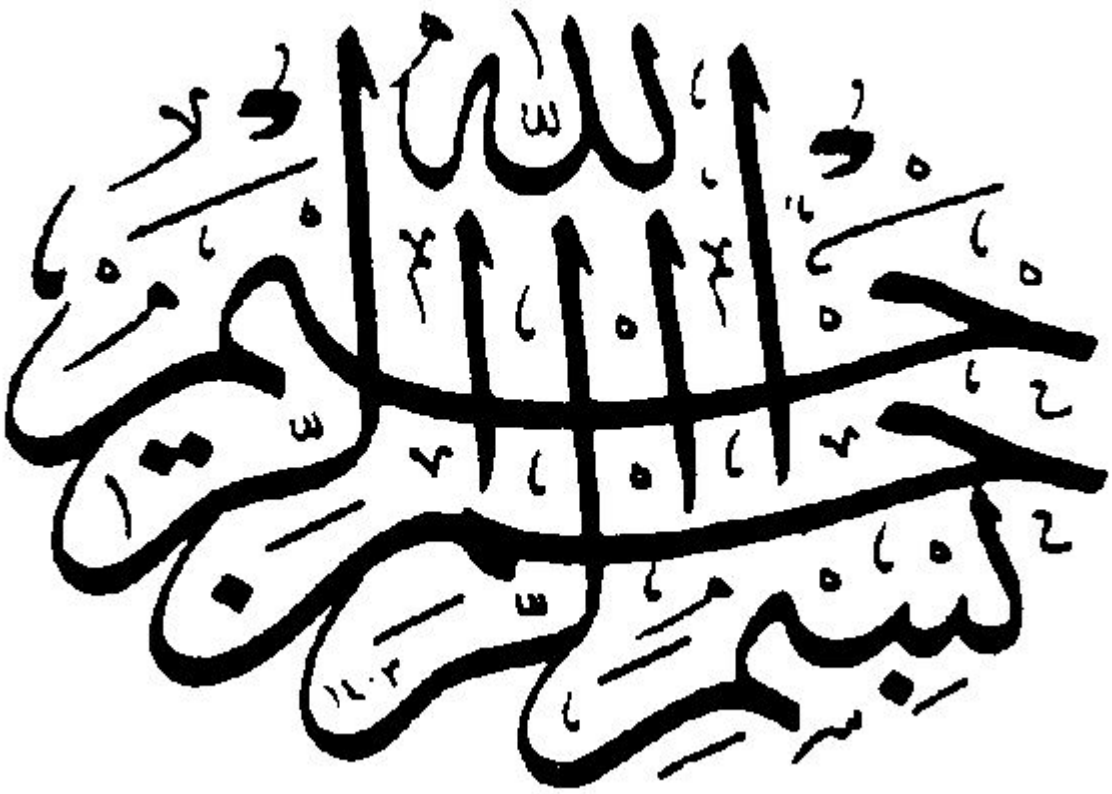
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه پیام نور

دانشکده علوم پایه و کشاورزی

مرکز تهران شرق

پایان نامه برای دریافت مدرک کارشناسی ارشد

رشته علوم جانوری

گروه علمی زیست شناسی

عنوان پایان نامه:

ارزیابی تاثیر عوامل تراتوژن بر بیان ایزوآنزیم P4501A1 در کشت سلولهای جوانه اندام حرکتی

غزاله سادات طیبون

اساتید راهنما:

دکتر امید سبزواری

دکتر سیدناصر استاد

استاد مشاور:

دکتر سیما نصری

آبان ۱۳۹۰

اگراین اثر راقدر ومنزلتی باشد نخست تقدیمش می دارم به حضرت دوست که هرچه دارم از تقدس بارگاه اوست.

تقدیم به پدر و مادر عزیزم

که هر گام به جلو را مدیون اعتماد و فداکاری هایشان هستم و جبران زحمات بی دریغشان غیر ممکن است.

و تقدیم به برادر عزیزم رضا

او که همراه لحظات تلخ و شیرین زندگی ام است و آرزو دارم در پناه خداوند خوشبخت و سعادتمند باشد.

با تشکر از جناب آقای دکتر امید سبزواری و جناب آقای دکتر سیدناصر استاد

که شاگردی در محضر ایشان مایه افتخار من می باشد و بی شک بدون راهنمایی های ارزنده و زحمات، کمک ها و حمایت های بی دریغشان انجام این تحقیق مقدور نبود.

با تشکر و سپاس فراوان از سرکار خانم دکتر سیما نصری

به پاس راهنمایی های ارزنده و کمکهای بی دریغشان و هر آنچه از ایشان آموختم.

با تشکر از آقای اکبری، خانم توجهی، آقای غلامی، آقای طاهری و آقای کاظمی

که در این مدت از هیچ گونه کمک و مساعدتی دریغ ننمودند.

با تشکر و سپاس فراوان از دوستان خوبم

مریم شیر محمدی، سارا قادری فرد، شکوفه حسنی

دکتر ریحانه واضحان، دکتر مریم ترشابی، دکتر فاطمه توکلی و دکتر نرگس فرسنداج

که همواره مدیون کمک ها، محبت ها، همراهی ها و حمایت های بی دریغشان هستم.

چکیده

CYP1A1، یک ایزوآنزیم P450 درگیر در متابولیسم فاز I زینوبیوتیک ها از قبیل داروهای تراتوژن است. این آنزیم علاوه بر کبد در سلول های جوانه اندام حرکتی و مغز میانی بیان می شود. هدف این مطالعه ارزیابی نقش CYP1A1 به عنوان یک مارکر تراتوژنز با استفاده از کشت میکرومس جوانه اندام حرکتی جنین رت است.

رت های ویستار آلبینو (۲۵۰-۳۰۰g) در طول شب جفتگیری کرده و صبح روز بعد وجود واژینال اسمیر به عنوان نشانه بارداری در نظرگرفته می شود. با تزریق درون صفاقی بتا-نفتوفلاون (۳۵mg/kg) در روزهای ۱۲-۱۰ بارداری، CYP1A1 القا می شود. سلولهای جوانه اندام حرکتی از جنین رت سیزده روزه حاصل شده و در انکوباتور CO_2 در دمای ۳۷°C نگهداری می شوند. در روز دوم کشت، سلول ها با غلظت های مختلف اسید رتینوئیک، هیدروکورتیزون، کافئین و کینین به مدت چهار روز مواجه می شوند. در روز هشتم کشت سلولی سمیت سلولی و تمایز سلولی به ترتیب با رنگ آمیزی نوترال رد و آلسیان بلو ارزیابی می شوند. دوزهای رتینوئیک اسید، هیدروکورتیزون، کافئین و کینین برای ارزیابی های بیان پروتئین و فعالیت آنزیمی آنزیم CYP1A1 براساس حیات سلولی بیش از ۹۵٪ انتخاب می شوند. بیان پروتئین و فعالیت آنزیمی آنزیم CYP1A1 به ترتیب با رنگ آمیزی ایمنوفلورسنس و واکنش ۷-اتوکسی رزوروفین-O-داتیلاز (EROD) سنجیده می شود. فعالیت EROD آنزیم CYP1A1 به دنبال مواجه با اسید رتینوئیک بصورت وابسته به دوز و هیدروکورتیزون در بالاترین دوز بطور قابل توجهی افزایش می دهد. اما بیان پروتئین تحت درمان با این دو دارو کاهش داده می شود در حالیکه مواجه با کافئین وکینین، بیان پروتئین و فعالیت EROD

آنزیم CYP1A1 را بطور قابل توجهی کاهش می دهد. نتایج این مطالعه اثرات تراتوژنیک اسید رتینوئیک، هیدروکورتیزون و غیرتراتوژنیک کافئین و کینین را براساس نسبت بقا/تمایز≤۱ تایید کرد. علاوه بر این، یافته ها CYP1A1 را به عنوان یک مارکر احتمالی تراتوژنیسیته معرفی می کند که می تواند برای تشخیص عوامل تراتوژنیک مهم باشد.

واژه های کلیدی : کشت میکرومس، سیتوکروم P4501A1، اسید رتینوئیک، هیدروکورتیزون، کافئین ، کینین، بتا– نفتوفلاون

فهرست مطالب

مقدمه ۱

فصل اول: مروری بر مطالعات گذشته ۳

۱-۱- تراتولوژی ٤

۱-۱-۱- تاریخچه تراتولوژی ٤

۱-۱-۲- ژنتیک و تفاوتهای داخل گونه ای ٥

۱-۱-۳- مرحله تکاملی حساس ٦

۱-۱-٤- انتقال به جنین از طریق جفت ۷

۱-۲- تست های IN VITRO در سم شناسی تکوینی ۷

۱-۲-۱- کشت کل جنین پستانداران (WEC) ۸

۱-۲-۲- کشت سلول بنیادی جنینی (ESC) ۱۰

۱-۲-۳- کشت سلولی میکرومس (MMC) ۱۲

۱-۲-۳-۱- انتخاب جاندار، جنین و بافت مناسب برای تست میکرومس ۱۲

۱-۳- داروها ۱٤

۱-۳-۱- داروهای تراتوژن ۱٤

۱-۳-۱-۱- اسید رتینوئیک ۱٤

۱-۳-۱-۲- هیدروکورتیزون ۱٦

۱-۳-۲- داروهای غیر تراتوژن ۱۸

۱-۳-۲-۱- کافئین ۱۸
۱-۳-۲-۲- کینین ۱۹
۱-٤- سیتوکروم P450 ..... ۲۰
۱-٤-۱- تاریخچه سیتوکروم P450 ..... ۲۰
۱-٤-۲- طبقه بندی سیتوکروم های P450 ..... ۲۳
۱-٤-۳- متابولیسم ترکیبات زینوبیوتیک توسط سیتوکروم P450 ..... ۲٤
۱-٤-٤- خانواده CYP1 ..... ۲۵
۱-٤-۵- سیتوکروم P450 1A1 (CYP1A1) ۲٦
فصل دوم : مواد و روشها ۲۸
۲-۱- تهیه و نگهداری موش صحرایی باردار سیزده روزه ۲۹
۲-۲- کشت سلولها ۳۰
۲-۲-۱- مواد، وسایل و دستگاهها ۳۰
۲-۲-۲- محلولهای مورد استفاده ۳۲
۲-۲-۲-۱- محیط کشت ۳۲
۲-۲-۲-۲- محلول جداسازی سلولها ۳۳
۲-۲-۲-۳- محلول رنگ Trypan blue ۳۳
۲-۲-۲-٤- بافر فسفات سالین (PBS) ۳٤
۲-۲-۲-۵- بافر سیترات ۳٤

۲-۲-۲-٦- بافر تریس ۳۵
۲-۲-۲-۷- محلول رنگ Neutral red ۳۵
۲-۲-۲-۸- معرف رنگ برادفورد ۳۵
۲-۲-۲-۸-۱- معرف سنجش برادفورد ۳٦
۲-۲-۳- روش کار ۳٦
۲-۲-۳-۱- کشت میکرومس جوانه های اندام حرکتی ۳٦
۲-۲-۳-۱-۱- جداسازی جوانه های اندام حرکتی ۳۷
۲-۲-۳-۱-۲- آماده سازی سلولهای جوانه های اندام حرکتی برای کشت ۳۸
۲-۲-۳-۱-۳- عمل شمارش سلولی ٤۰
۲-۲-۳-۱-٤- کشت سلولهای تهیه شده از جوانه های اندام حرکتی ٤۱
۲-۲-۳-۱-۵- اضافه نمودن محیط کشت ٤۲
۲-۲-۳-۲- تهیه رقت های مختلف داروهای تراتوژن و غیرتراتوژن ٤۲
۲-۲-۳-۲-۱- اسید رتینوئیک ٤۲
۲-۲-۳-۲-۲- هیدروکورتیزون ٤۳
۲-۲-۳-۲-۳- کافئین ٤۳
۲-۲-۳-۲-٤- کینین ٤۳
۲-۲-۳-۳- اضافه نمودن داروها ٤٤
۲-۲-۳-٤- تعویض محیط کشت داروها ٤٤
۲-۲-۳-۵- بررسی ضریب حیاتی سلولهای کشت شده توسط روش Neutral red ٤۵

۲-۲-۳-۵-۱- کلیات ٤٥
۲-۲-۳-۵-۲- روش کار ٤٦
۲-۲-۳-٦- رنگ آمیزی Alcian blue جهت بررسی درصد سلولهای تمایز یافته ٤٧
۲-۲-۳-٦-۱- کلیات ٤٧
۲-۲-۳-٦-۲- روش کار ٤٨
۲-۲-۳-۷- بررسی بیان پروتئین سیتوکروم P4501A1 (CYP1A1) با روش Immunofluorescence staining ٥٠
۲-۲-۳-۷-۱- کلیات ٥٠
۲-۲-۳-۷-۲- روش کار ٥١
۲-۲-۳-۸- اندازه گیری فعالیت آنزیمی سیتوکروم P450 1A1 ..... ٥٤
۲-۲-۳-۸-۱- کلیات ٥٤
۲-۲-۳-۸-۲- روش کار ٥٥
۲-۲-۳-۹- اندازه گیری غلظت پروتئین کل به روش برادفورد ٥٨
۲-۲-۳-۹-۱- کلیات ٥٨
۲-۲-۳-۹-۲- روش کار ٥٩
۲-۲-۳-۱۰- روش های آماری مورد استفاده ٦٠
فصل سوم : نتایج ٦١
۳-۱- تاثیر اسید رتینوئیک ٦٢

۳-۱-۱- اثر اسید رتینوئیک بر سلولهای جوانه های اندام حرکتی جنین ۱۳ روزه موش صحرایی با استفاده از سنجش Neutral red ٦٢

۳-۱-۲- اثر اسید رتینوئیک بر تمایز سلوهای جوانه های اندام حرکتی در جنین سیزده روزه موش صحرایی با استفاده از سنجش Alcian blue ٦٣

۳-۱-۳- Dose Ratio differentiation/viability ٦٤

۳-۱-٤- اثر اسید رتینوئیک بر بیان پروتئین سیتوکروم P4501A1 (CYP1A1) در سلولهای جوانه های اندام حرکتی ٦٥

۳-۱-٥- اثر اسید رتینوئیک بر فعالیت EROD در سلولهای جوانه های اندام حرکتی..... ٦٦

۳-۱-٦- Dose Ratio EROD/ICC ٦٧

۳-۲- تاثیرهیدروکورتیزون..... ٦٨

۳-۲-۱- اثر هیدروکورتیزون بر سلولهای جوانه های اندام حرکتی جنین ۱۳ روزه موش صحرایی با استفاده از سنجش Neutral red..... ٦٨

۳-۲-۲- اثر هیدروکورتیزون بر تمایز سلوهای جوانه های اندام حرکتی در جنین سیزده روزه موش صحرایی با استفاده از سنجش Alcian blue..... ٦٩

۳-۲-۳- Dose Ratio differentiation/viability..... ۷۰

۳-۲-٤- اثر هیدروکورتیزون بر بیان پروتئین سیتوکروم P4501A1 (CYP1A1) در سلولهای جوانه های اندام حرکتی ۷۱

۳-۲-٥- اثر هیدروکورتیزون بر فعالیت EROD در سلولهای جوانه های اندام حرکتی..... ۷۲

۳-۲-٦- Dose Ratio EROD/ICC ۷۳

۳-۳- تاثیرکافئین ۷٤
۳-۳-۱- اثر کافئین بر سلولهای جوانه های اندام حرکتی جنین ۱۳ روزه موش صحرایی با استفاده از سنجش Neutral red ۷٤
۳-۳-۲- اثر کافئین بر تمایز سلوهای جوانه های اندام حرکتی در جنین سیزده روزه موش صحرایی با استفاده از سنجش Alcian blue ۷۵
۳-۳-۳- Dose Ratio differentiation/viability ۷٦
۳-۳-٤- اثر کافئین بر بیان پروتئین سیتوکروم P4501A1 (CYP1A1) در سلولهای جوانه های اندام حرکتی ۷۷
۳-۳-۵- اثر کافئین بر فعالیت EROD در سلولهای جوانه های اندام حرکتی ۷۸
۳-۳-٦- Dose Ratio EROD/ICC ۷۹
۳-٤- تاثیرکینین ۸۰
۳-٤-۱- اثر کینین بر سلولهای جوانه های اندام حرکتی جنین ۱۳ روزه موش صحرایی با استفاده از سنجش Neutral red ۸۰
۳-٤-۲- اثر کینین بر تمایز سلوهای جوانه های اندام حرکتی در جنین سیزده روزه موش صحرایی با استفاده از سنجش Alcian blue ۸۱
۳-٤-۳- Dose Ratio differentiation/viability ۸۲
۳-٤-٤- اثر کینین بر بیان پروتئین سیتوکروم P4501A1 (CYP1A1) در سلولهای جوانه های اندام حرکتی ۸۳
۳-٤-۵- اثر کینین بر فعالیت EROD در سلولهای جوانه های اندام حرکتی ۸٤

٣-٤-٦- Dose Ratio EROD/ICC ٨٥

فصل چهارم : بحث و پیشنهادات ٨٦

٤-١- بحث ٨٧

٤-٢- نتیجه گیری ٩٦

٤-٣- پیشنهادات ٩٧

فهرست منابع ٩٨

فهرست جداول، اشکال و نمودارها

جدول۲-۱- مواد، وسایل و دستگاههای مورد استفاده ۳۰

شکل۲-۱- تست واژینال اسمیر ۲۹

شکل۲-۲- تشریح موش صحرایی ماده سیزده روزه ۳۸

شکل ۲-۳- نمایش شماتیک آماده سازی سلول های جوانه اندام حرکتی ٤٠

شکل ۲-٤- روز ۸ کشت سلول های جوانه های اندام حرکتی ٤٥

شکل ۲-٥- توده های تمایز یافته غضروف ساز (Foci) سلول های جوانه اندام حرکتی در روز ۸
کشت سلولی رنگ آمیزی شده با Alcian blue ٤٩

شکل ۲-٦- رنگ آمیزی ایمنوفلورسنت CYP1A1 در سلو لهای جوانه اندام حرکتی القا شده با βNF

نمودار۲-۱- منحنی استاندارد رزوروفین ٥٧

نمودار۲-۲- منحنی استاندارد BSA ٦٠

نمودار ۳-۱- بررسی سیتوتوکسیسته اسید رتینوئیک در سلول های جوانه اندام حرکتی با رنگ آمیزی
Neutral red ٦٣

نمودار ۳-۲- بررسی اثر اسید رتینوئیک بر تمایز سلول های جوانه اندام حرکتی با رنگ آمیزی
Alcian blue ٦٤

نمودار ۳-۳- مقایسه نسبت تمایز سلول های جوانه اندام حرکتی به بقا سلولی به دنبال مواجه با اسید
رتینوئیک ٦٥

نمودار ۳-٤- تاثیر غلظت های مختلف اسید رتینوئیک بر بیان پروتئین در سلول های جوانه اندام حرکتی مربوط به CYP1A1 ..... ٦٦

نمودار ۳-٥- اثر غلظت های مختلف اسید رتینوئیک بر میزان فعالیت ۷-اتوکسی رزوروفین-O-داتیلاز آنزیم سیتوکروم P4501A1 در سلول های جوانه اندام حرکتی ٦٧

نمودار ۳-٦- مقایسه نسبت فعالیت آنزیمی سیتوکروم P4501A1 سلول های جوانه اندام حرکتی به بیان پروتئین سلولی سیتوکروم P4501A1 به دنبال مواجه با اسید رتینوئیک..... ٦٨

نمودار ۳-۷- بررسی سیتوتوکسیسته هیدروکورتیزون در سلول های جوانه اندام حرکتی با رنگ آمیزی Neutral red..... ٦٩

نمودار ۳-۸- بررسی اثر هیدروکورتیزون بر تمایز سلول های جوانه اندام حرکتی با رنگ آمیزی Alcian blue..... ۷۰

نمودار ۳-۹- مقایسه نسبت تمایز سلول های جوانه اندام حرکتی به بقا سلولی به دنبال مواجه با هیدروکورتیزون..... ۷۱

نمودار ۳-۱۰- تاثیر غلظت های مختلف هیدروکورتیزون بر بیان پروتئین مربوط به سیتوکروم P4501A1..... ۷۲

نمودار ۳-۱۱- اثر غلظت های مختلف هیدروکورتیزون بر میزان فعالیت ۷-اتوکسی رزوروفین-O-داتیلازآنزیم CYP1A1 در سلول های جوانه اندام حرکتی..... ۷۳

نمودار ۳-۱۲- مقایسه نسبت فعالیت آنزیمی سیتوکروم P4501A1 سلول های جوانه اندام حرکتی به بیان پروتئین سلولی سیتوکروم P4501A1 به دنبال مواجه با هیدروکورتیزون..... ۷٤

نمودار ۳-۱۳- بررسی سیتوتوکسیسته کافئین در سلول های جوانه اندام حرکتی با رنگ آمیزی Neutral red ۷۵
نمودار ۳-۱٤- بررسی اثر کافئین بر تمایز سلول های جوانه اندام حرکتی با رنگ امیزی Alcian blue ۷٦
نمودار ۳-۱۵- مقایسه نسبت تمایز سلول های جوانه اندام حرکتی به بقا سلولی به دنبال مواجه با کافئین ۷۷
نمودار ۳-۱٦- تاثیر غلظت های مختلف کافئین بر بیان پروتئین مربوط به سیتوکروم P4501A1 ..... ۷۸
نمودار ۳-۱۷- اثر غلظت های مختلف کافئین بر میزان فعالیت ۷-اتوکسی رزوروفین-O-داتیلاز آنزیم سیتوکروم P4501A1 در سلول های جوانه اندام حرکتی ۷۹
نمودار ۳-۱۸- مقایسه نسبت فعالیت آنزیمی سیتوکروم P4501A1 سلول های جوانه اندام حرکتی به بیان پروتئین سلولی سیتوکروم P4501A1 به دنبال مواجه با کافئین ۸۰
نمودار ۳-۱۹- بررسی سیتوتوکسیسته کینین در سلول های جوانه اندام حرکتی با رنگ آمیزی Neutral red ۸۱
نمودار ۳-۲۰- بررسی اثر کینین بر تمایز سلول های جوانه اندام حرکتی با رنگ امیزی Alcian blue. ۸۲
نمودار ۳-۲۱- مقایسه نسبت تمایز سلول های جوانه اندام حرکتی به بقا سلولی به دنبال مواجه با کینین ۸۳
نمودار ۳-۲۲- اثر غلظت های مختلف کینین بر میزان فعالیت EROD آنزیم سیتوکروم P4501A1 در سلول های جوانه اندام حرکتی ۸٤
نمودار ۳-۲۳- اثر غلظت های مختلف کینین بر میزان فعالیت ۷-اتوکسی رزوروفین-O-داتیلاز آنزیم سیتوکروم P4501A1 در سلول های جوانه اندام حرکتی ۸۵

نمودار ۳-۲٤- مقایسه نسبت فعالیت آنزیمی سیتوکروم P4501A1 سلول های جوانه اندام حرکتی به بیان پروتئین سلولی سیتوکروم P4501A1 به دنبال مواجه با کینین ۸٦

مقدمه

عمده آنزیم های کاتالیز کننده میتوانند با انجام انواع واکنش های شیمیایی بر ترکیبات مختلف سبب فعال سازی آنها گردند که این فعال سازی در مواقعی به اثرات دارویی موثر و در شرایطی بسته به نوع ترکیب و ساختار متابولیسمی به اثرات مخربی نظیر تراتوژنیسیته و کارسینوژنیسیته منجر می شوند. بنظر میرسد مهمترین این آنزیم ها،منواکسیژناژهای میکروزومی به ویژه هموپروتئین های سیتوکروم P450[1] باشند. این دسته آنزیم ها قادرند با اتصال به انواع سموم و داروها طی انجام واکنش هایی نظیر هیدروکسیلاسیون و .... آنها را متابولیزه و اثرات فارماکولوژیک لازم را ایفا نمایند. از این رو به نظر میرسد این گروه آنزیم ها نقش کلیدی در بروز فرایند های بیولوژیک داشته باشند (Schenkman, 1982; Schenkman, 1981).

در مطالعه ای در سال ۱۹۸٦ به منظور بررسی سهم متابولیسم سلولی در تراتوژنیسیته DPH[2] ،از کشت سلولهای جوانه های اندام حرکتی و مغز میانی جنین رت سیزده روزه استفاده کردند. با استفاده از مهارکننده های سیتوکروم P450 و رنگ آمیزی ایمنوسیتوشیمی نشان دادند که سلول ها خودشان توانایی متابولیزه کردن DPH را دارند وهمچنین سلو ل های جنینی جوانه اندام حرکتی و مغز میانی ایزوآنزیم های سیتوکروم P450 را دارا هستند (Brown, 1986).

تحقیق دیگری در سال ۱۹۸۹ نشان داد که در سلولهای حاصل از جوانه های اندام حرکتی و مغز میانی جنین رت سیزده روزه دو گروه اصلی ایزوآنزیم های سیتوکروم P4502B1[3] و P4502B2[4] القا

---

[1] CYP
[2] Diphenylhydantion
[3] CYP2B1
[4] CYP2B2

شده با Phenobarbiton و سیتوکروم P4501A1[1] القا شده با بتا-نفتوفلاون (βNF[2]) تکوین یافتند. رنگ آمیزی ایمنوسیتوشیمی سلولهای جنینی وجود ایزوآنزیمهای سیتوکروم P4502B1 و P4502B2 از روز یکم کشت و ایزوآنزیم سیتوکروم P4501A1 از روزسوم کشت را آشکار کرد. مشاهده سیتوکروم P450 در توده کندروسیت های تمایز یافته[3] در روز ۱۸ کشت سلولی نشان می دهد که ایزوآنزیم های سیتوکروم P450 نقش مهمی در متابولیسم سوبستراهای آندوژن، فرایند تمایز و فعالسازی/غیرفعالسازی تراتوژن ها ایفا می کنند (Brown, 1989). در این تحقیق برای اولین بار به بررسی آنزیم CYP1A1 به عنوان مارکری در شناسایی مواد تراتوژن و غیر تراتوژن می پردازیم.

[1] CYP1A1
[2] β-Naphtoflavone
[3] Foci

فصل اول

مروری بر تحقیقات گذشته

بخش اول: تراتولوژی

بخش دوم: تست های in vitro درسم شناسی

بخش سوم: داروها

بخش چهارم: سیتوکروم P450