



دانشکده علوم

بخش زیست شناسی

پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی (علوم سلولی و مولکولی)

اثر سدیم آرسنیت بر بیان ژن های آنتی اکسیدانت و ترمیمی در دودمان

سلولی جورکت

توسط:

مریم صمدایی قادیکلایی

استاد راهنما:

دکتر ایرج سعادت

شهریور ۹۱

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ وَالرَّحِيمِ

به نام خدا

اظہارنامہ

اینجانب مریم صمدایی (۸۹۰۳۵۹) دانشجوی رشته‌ی زیست شناسی گرایش علوم سلولی و مولکولی دانشکده علوم اظہار می‌کنم که این پایان‌نامه حاصل پژوهش خودم بوده و در جاهایی که از منابع دیگران استفاده کرده‌ام، نشانی دقیق و مشخصات کامل آن را نوشته‌ام. همچنین اظہار می‌کنم که تحقیق و موضوع پایان‌نامه ام تکراری نیست و تعهد می‌نمایم که بدون مجوز دانشگاه دستاوردهای آن را منتشرنموده و یا در اختیار غیر قرار ندهم. کلیه حقوق این اثر مطابق با آیین‌نامه مالکیت فکری و معنوی متعلق به دانشگاه شیراز است.

نام و نام خانوادگی: مریم صمدایی فادیکلایی

امضا و تاریخ:



به نام خدا

اثر سدیم آرسنیت بر بیان ژن های آنتی اکسیدانت و ترمیمی در دودمان سلولی جورکت

به کوشش
مریم صمدایی قادیکلایی

پایان نامه

لزایه شده به تحصیلات تکمیلی دانشگاه شیراز به عنوان
بخشی از فعالیت های تحصیلی لازم برای اخذ درجه ی کارشناسی ارشد

در رشته ی:

زیست شناسی سلولی مولکولی

از دانشگاه شیراز

شیراز

جمهوری اسلامی ایران

ارزیابی شده توسط کمیته ی پایان نامه با درجه: عالی

دکتر ابرج سعادت، استادیار بخش زیست شناسی (رئیس کمیته)

دکتر مصطفی سعادت، استاد بخش زیست شناسی

دکتر رضا یوسفی، استادیار بخش زیست شناسی

دکتر حمیدرضا کربلایی حیدری استادیار بخش زیست شناسی

شهریور ۱۳۹۱

تقدیم به

پدر و مادر عزیزم

سپاسگزاری

سپاس خدای را که سخنوران در ستودن او بمانند و شمارندگان، شمردن نعمت های او ندانند و کوشندگان، حق او را گزاردن نتوانند. سلام و درود بر محمد و خاندان پاک او، طاهران معصوم، هم آنان که وجودمان وامدار وجودشان است و نفرین پیوسته بر دشمنان ایشان تا روز رستاخیز... بدون شک جایگاه و منزلت معلم، اجل از آن است که در مقام قدردانی از زحمات بی شائبه ی او، با زبان قاصر و دست ناتوان، چیزی بنگاریم. اما از آنجایی که تجلیل از معلم، سپاس از انسانی است که هدف و غایت آفرینش را تامین می کند و سلامت امانت هایی را که به دستش سپرده اند، تضمین؛ بر حسب وظیفه و از باب " من لم یشکر المنعم من المخلوقین لم یشکر الله عزّ و جلّ " از استاد با کمالات و شایسته؛ جناب آقای دکتر ایرج سعادت که در کمال سعه صدر، با حسن خلق و فروتنی، از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ نمودند و زحمت راهنمایی این رساله را بر عهده گرفتند؛ از اساتید مشاور جناب آقای دکتر مصطفی سعادت، دکتر حمید رضا کربلایی حیدری ، دکتر رضا یوسفی کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از پدر و مادر عزیزم که همواره بر کوتاهی و درستی من، قلم عفو کشیده و کریمانه از کنار غفلت هایم گذشته اند و در تمام عرصه های زندگی یار و یابوری بی چشم داشت برای من بوده اند.

چکیده

اثر سدیم آرسنیت بر بیان ژن های آنتی اکسیدانت و ترمیمی در دودمان سلولی جورکت

به کوشش

مریم صمدایی قادیکلایی

آرسنیک عنصر شبه فلزی است که به طور گسترده در محیط پخش شده است و در صنعت کاربرد بسیاری دارد. آرسنیک معدنی به عنوان کارسینوژن کلاس I انسانی دسته بندی شده و خطر ابتلا به سرطان های مثانه، پوست، شش، کلیه و کبد را افزایش می دهد. مطالعات نشان داده که یکی از مکانیسم های احتمالی سمیت آرسنیک، استرس اکسیداتیو می باشد. آرسنیک می تواند به طور مستقیم با اثر بر مسیر پیام رسانی سلولی و تغییر مسیر سیگنالینگ بر بیان و فعالیت ژن های آنزیم های آنتی اکسیدانت اثر بگذارد و با کاهش عملکرد آنزیم های آنتی اکسیدانت اثرات سمی و سرطان زایی خود را افزایش می دهد. NHEJ یکی از مسیرهای ترمیم شکست دو رشته ای DNA می باشد و صحت مسیر ترمیمی NHEJ در صحت و پایداری کروموزوم ضروری است و نقص در آنزیم های این مسیر، سبب آسیب به DNA و ناهنجاری های کروموزومی و افزایش سرطان زایی می شود. در این مطالعه اثر سدیم آرسنیت بر بیان ژن های آنتی اکسیدانت و ترمیمی در غلظت های ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار بررسی شده است. بیان ژن های آنتی اکسیدانت و ترمیمی در حضور سدیم آرسنیت کاهش یافته است و زمانی که سلول ها همزمان با سدیم آرسنیت و N استیل سیستئین تیمار شده بودند این کاهش بیان تا حدود زیادی بهبود یافته بود.

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
	فصل اول: مقدمه
۱-۱	آرسنیک.....
۲
۱-۱-۱	جذب، متابولیسم و سمیت آرسنیک.....
۴
۱-۱-۱-۱	مکانیسم مولکولی اثرات سرطان زایی آرسنیک.....
۶
۱-۲-۱-۱	تغییر زیستی آرسنیک.....
۶
۱-۲-۱-۱	تولید گونه های فعال اکسیژنی.....
۷
۱-۲-۱-۱	سمیت ژنتیکی ترکیبات آرسنیک.....
۱۰
۱-۲-۱-۱	مسیر سیگنال ترانسداکشن و القای بیان ژن توسط آرسنیک.....
۱۳
۱-۲	پاسخ آنتی اکسیدانت و آرسنیک.....
۱۵
۱-۱	سویراکسید دیسموتاز.....
۱۶
۱-۲-۱	کاتالاز.....
۱۶
۱-۳	مسیر ترمیمی (NHEJ) Non-Homologous End Joining و کمپلکس Ku.....
۱۷

۱۸ XRCC۷ -۱ -۳-۱

۱۸..... XRCC۴ -۲ -۳-۱

۱۹..... DNA ligase ۴ -۳-۳-۱

۱۹..... XRCC۵ ,XRCC۶ -۴-۳-۱

۲۰..... هدف. ۴-۱

فصل دوم: مروری بر مطالعات پیشین

۲۲..... مطالعات پیشین. ۲-۲

۲۲..... ۱-۲ تاثیر سدیم آرسنیت بر بیان ژن ها.

۲۶..... ۲-۲ تاثیر سدیم آرسنیت بر بیان ژنهای آنتی اکسیدانت.

۲۷..... ۳-۲ تاثیر سدیم آرسنیت بر ژن ها و پروتئین های ترمیمی.

۳۰..... ۳- فرضیه.

فصل سوم: مواد و روش ها

۳۱..... ۴- مواد، روشها، ابزار.

۳۱..... ۱-۴ ابزار.

۳۲..... ۲-۴. مواد.

۳۲..... ۲-۴ ۱ مواد و وسایل مورد نیاز جهت کشت سلول و بررسی رشد سلول.

۳۳	۲-۲-۴ مواد لازم جهت استخراج RNA
۳۳	۳-۲-۴ مواد لازم جهت ساخت cDNA
۳۳	۴-۲-۴ مواد لازم جهت انجام Real-time PCR
۳۶	۳-۴ روش ها
۳۶	۱-۳-۴ کشت سلولهای jurkat
۳۶	۲-۳-۴ تیمار با سدیم آرسنیت و استخراج RNA
۳۷	۳-۳-۴ ساخت cDNA
۳۸	۴-۳-۴ Real time PCR
۳۹	۵-۳-۴ تعیین کارایی و منحنی استاندارد
۴۰	۶-۳-۴ منحنی ذوب
۴۳	۵-۳-۴ تجزیه و تحلیل آماری

فصل چهارم: نتایج

۴۵	۴. نتایج
۴۵	۱-۴ MTT assay
۴۵	۲-۴ سطح mRNA مربوط به ژنهای آنتی اکسیدانت در سلولهای Jurkat تحت تیمار با سدیم آرسنیت
۴۵	۳-۴ سطح mRNA مربوط به ژنهای ترمیمی در سلولهای Jurkat تحت تیمار با سدیم آرسنیت
۴۸	آرسنیت

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

۵۴.....بحث و نتیجه گیری

۵۸.....پیشنهادات

فصل ششم: منابع

۶۱.....۶. منابع و مآخذ

صفحه فهرست جداول

صفحه	عنوان
۳۷.....	جدول (۱-۳) مواد و مقادیر مورد نیاز جهت ساخت cDNA
۴۲.....	جدول (۲-۳) مواد و مقادیر مورد نیاز جهت Real-time PCR
۴۲.....	جدول (۳-۳) برنامه تنظیم دستگاه Real-time
۴۸.....	جدول (۲-۴) درصد کاهش بیان ژن های آنتی اکسیدانت.....
۵۲.....	جدول (۳-۴) درصد کاهش بیان ژنهای ترمیمی.....

فهرست شکل ها

عنوان

صفحه

- شکل ۱-۳ نمودار تکثیری Real-Time PCR ۳۸
- شکل ۲-۳ منحنی استاندارد β -actin ۴۰
- شکل ۳-۳ منحنی استاندارد کاتالاز ۴۰
- شکل ۴-۳ منحنی ذوب XRCC4 ۴۱
- شکل ۲-۴ الف سطح mRNA ژن *SOD-2* در حضور غلظت هایی از سدیم آرسنیت و NAC در سلول های جورکت ۴۶
- شکل ۲-۴ ب سطح mRNA ژن *Catalase* در حضور غلظت هایی از سدیم آرسنیت و NAC در سلول های جورکت ۴۶
- شکل ۳-۴ الف . سطح mRNA ژن ترمیمی *Ligase-4* در حضور غلظت هایی از سدیم آرسنیت و NAC در سلول های جورکت ۴۹

شکل ۳-۴-ب سطح mRNA ژن ترمیمی ۴-*XRCC* در حضور غلظت هایی از سدیم آرسنیت و

NAC در سلول های جورکت ۴۹

شکل ۳-۴-ج سطح mRNA ژن ترمیمی ۵-*XRCC* در حضور غلظت هایی از سدیم آرسنیت

و NAC در سلول های جورکت ۵۰

شکل ۳-۴-د سطح mRNA ژن ترمیمی ۶-*XRCC* در حضور غلظت هایی از سدیم آرسنیت و

NAC در سلول های جورکت ۵۰

شکل ۳-۴-ذ سطح mRNA ژن ترمیمی ۷-*XRCC* در حضور غلظت هایی از سدیم آرسنیت

و NAC در سلول های جورکت ۵۱

فصل اول

۱- مقدمه

۱-۱ آرسنیک

آرسنیک^۱، عنصر شیمیایی است که در جدول تناوبی با علامت As مشخص شده است و دارای عدد اتمی ۳۳ می‌باشد (۱). آرسنیک، شبه فلز سمی معروفی است که به سه شکل زرد، سیاه و خاکستری یافت می‌شود. این عنصر دارای چهار ظرفیت و در آب، خاک، هوا و غذا وجود دارد (۲). از نظر فراونی در پوسته زمین در رده بیستم، در آب دریا در رده چهاردهم و در بدن انسان در رده دوازدهم قرار دارد (۳). منابع آرسنیک در محیط شامل منابع طبیعی و انسانی است. منابع طبیعی آن شامل آتشفشان‌ها، آب‌های زیرزمینی، خاک، رسوبات، هوا و موجودات زنده است. منابع انسانی آرسنیک شامل سوزاندن کربن، آفت‌کش‌ها، سوزاندن چوب و آزاد شدن مواد ننگه دارنده آن می‌باشد (۴). زمانی که آرسنیک با سولفور، کلرین و اکسیژن ترکیب می‌شود آرسنیک معدنی^۲ خوانده می‌شود که دو شکل رایج آن در محیط آرسنیت^۳ و آرسنات^۴ است (۵).

^۱ Arsenic

^۲ Inorganic arsenic

مونومتیل آرسنیک اسید^۵، دی متیل آرسنیک اسید^۶، تری متیل آرسین اکساید^۷ و تری متیل آرسین^۸ اشکال آرسنیک آلی^۹ هستند که اغلب حاصل سوخت و ساز آرسنیک معدنی در بدن موجودات زنده از جمله انسان هستند (۶). از جمله کاربردهای آرسنیک استفاده از آن برای ایجاد سختی در آلیاژ مس و سرب است. همچنین از این عنصر در صنایع شیشه‌سازی بعنوان رنگ‌بر و عامل تخلیص استفاده می‌شود و نیز در نیمه‌هادی‌ها، در ابزار آلات برقی مورد استفاده قرار می‌گیرد و نیز کاتالیستی برای تولید اتیلن اکساید است. ترکیبات آرسنیک در کارخانجات پارچه‌بافی بعنوان تثبیت‌کننده و در صنایع چرم‌سازی بعنوان نگه‌دارنده و نیز در داروها، حشره‌کش‌ها، رنگدانه‌ها و نگهدارنده چوب در فضای آزاد به کار برده می‌شود (۷). سولفید آهن آرسنیک^{۱۰} یکی از فراوان‌ترین مشتقات آرسنیک است که به صورت نامحلول در تخته‌سنگ‌های زیرین خاک وجود دارد، به مرور تحت عوامل طبیعی همچون فرسایش خاک به مقدار کم و یا به مقدار بیشتر تحت عوامل مصنوعی مانند فعالیت‌های انسانی جهت استخراج معادن، سوزاندن ذغال سنگ و فرایند گداختن، سولفید آهن آرسنیک در معرض هوا قرار گرفته و طی اکسیداسیون به مشتقات محلول آرسنیک تبدیل می‌شود که بخشی از آن توسط آب‌های سطحی شسته شده و وارد آب‌های زیرزمینی می‌شود و یا بصورت ذرات معلق در هوا پخش شده که به صورت محلول در آب آشامیدنی، تماس پوستی و یا با استنشاق، موجودات زنده موجود در اکوسیستم

^۳ Arsenite

^۴ Arsenate

^۵ Monomethylarsonic acid

^۶ Dimethylarsinic acid

^۷ Trimethyl arsine oxide

^۸ Trimethyl arsine

^۹ Organic arsenic

^{۱۰} Arsenic pyrite

منطقه را تحت تاثیر قرار می‌دهد. بدین ترتیب امکان تماس جمعیت‌های فراوانی انسانی با آرسنیک وجود دارد (۹).^{۱۱}

۱-۱-۱ جذب، متابولیسم و سمیت آرسنیک

انسان از طریق دهان^{۱۲}، استنشاق^{۱۳} و پوستی^{۱۴} در معرض آرسنیک قرار می‌گیرد (۶). جذب آرسنیک از طریق آب، غذا، داروها و محصولات تنباکو خطر ابتلا به سرطان‌های کبد، کلیه، مثانه و پوست را افزایش می‌دهد و جذب آرسنیک از طریق استنشاق خطر ابتلا به سرطان شش را افزایش می‌دهد (۱۰). سدیم آرسنیت^{۱۵} و سدیم آرسنات^{۱۶} از جمله نخستین مشتقات آرسنیک هستند که در آب آشامیدنی یافت می‌شوند. آرسنیک معدنی نسبت به نوع آلی سریعتر جذب و وارد جریان خون می‌شود. اگر شکل ورودی آرسنیک به صورت آرسنات باشد در داخل خون از طریق واکنش با گلوکاتایون احیا، به عنوان دهنده الکترون، به شکل آرسنیت کاهش^{۱۷} می‌یابد. آرسنیت وارد سیتوزول سلول‌های کبدی می‌شود و در آنجا تحت آنزیم‌های متیل ترانسفراز و S-آدنوزیل متیونین^{۱۸}، به عنوان دهنده گروه متیل، متیله و به اشکال مونومتیل آرسونیک اسید^{۱۹} و دایمتیل آرسنیک اسید^{۲۰} تبدیل می‌شود (۱۱). سمیت آرسنیک بستگی به اشکال شیمیایی، حالت‌های اکسایش یافته آرسنیک،

^{۱۲} Oral

^{۱۳} Inhalation

^{۱۴} Dermal

^{۱۵} Sodium arsenite

^{۱۶} Sodium arsenate

^{۱۷} Reduced

^{۱۸} S-adenosylmethionine

^{۱۹} Monomethylarsonic acid

^{۲۰} Dimethylarsinic acid

وضعیت فیزیکی (گاز، محلول)، میزان جذب توسط سلول‌ها، میزان دفع، ماهیت شیمیایی اجزا در ترکیب سمی، مقدار مصرف آرسنیک، مدت زمان قرارگیری در معرض آن، بستگی دارد (۱۲). آرسنیک معدنی نسبت به نوع آلی و آرسنیت نسبت به آرسنات سمی‌تر است یکی از دلایل اختلاف سمیت اشکال مختلف این عنصر نسبت متفاوت جذب آن‌ها می‌باشد. در غلظت‌های برابر تجمع آرسنیت در سلول نسبت به آرسنات سریع‌تر است. آرسنیت در pH فیزیولوژیک بدون بار است بنابراین نسبت به آرسنات که دارای بار منفی است سریع‌تر جذب و می‌تواند از غشای سلولی عبور کند در حالی که آرسنات از طریق انتقال دهنده فسفات و برای ورود به سلول با فسفات رقابت می‌کند (۱۳). یکی دیگر از سازوکارهای سمیت اشکال مختلف آرسنیک تمایل بالای آن‌ها به گروه تیول است با اتصال به زیرواحدهای سیستئین، که در جایگاه فعال آنزیم‌ها قرار دارند، باعث تغییر فعالیت آنزیم‌هایی همچون پیرووات دهیدروژناز، تیروزین فسفاتاز و آنزیم‌هایی که در یوبی کوئیتینه شدن^{۲۱} پروتئین‌ها درگیرند، می‌شود (۱۴، ۱۵). به ترتیب تمایل آرسنیت به آرسنات و آرسنیک معدنی به آرسنیک آلی به گروه تیول بیشتر است. متیلاسیون یک فرآیند کاهش مسمومیت در موجودات زنده است، ترکیبات متیله آرسنیک در مقایسه با انواع معدنی آرسنیک مسمومیت حاد کمتری ایجاد می‌کنند زیرا تمایلشان به گروه تیول کمتر است (۱۶). در انسان ترکیبات آرسنیک در کبد متابولیزه و از طریق ادرار خارج می‌شود. آرسنیک متیله شده خیلی سریع‌تر از انواع آن از بدن معدنی خارج می‌شود. (۴۰-۲۰٪ به صورت آرسنیک معدنی و ۶۰-۸۰٪ به صورت اشکال سه و پنج ظرفیتی دایمتیل آرسنیک از بدن خارج می‌شود). (۱۷).

^{۲۱} Ubiquitination