بسم الله الرحمن الرحيم

پردیس علوم
دانشکده زیست شناسی

بررسی اثر داروی سدیم سولفاستامید در القای آپاپتوز و توقف چرخه سلولی در رده سلولی T47D

نگارش:سعید نوروزی

استاد راهنما:دکتر شاهرخ صفریان

استاد مشاور:دکتر محمود عرب نجفی

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته علوم سلولی و مولکولی

بهمن ۱۳۸۷

بنام خدا

دانشگاه تهران

پردیس علوم

دانشکده زیست شناسی

گواهی دفاع پایان نامه کارشناسی ارشد

هیـــــات داوران پایان نامه کارشناسی ارشدآقای سعید نوروزی کندلان در رشته زیست شناسی – سلولی و مولکولی با عنوان "بررسی اثر داروی سدیم سولفاستامید در القای Cell Cycle Arrest وApoptosis در رده سلولی T47D "در اتاق ۱۱۲ تاریخ ۸۷/۱۱/۲۹ برگزار شد و

به حروف	به عدد	
نوزده تمام	۱۹/-	با نمره نهایی :

و درجه : عالی ارزیابی نمود.

ردیف	مشخصات هیات داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه دانشگاهی	دانشگاه یا موسسه	امضاء
۱	استاد راهنما استاد راهنمای دوم	دکتر شاهرخ صفریان	استادیار	تهران	
۲	استاد مشاور	دکتر محمود عرب نجفی	استادیار	تهران	
۳	استاد مدعو : (داخلی) (یا استاد مشاور دوم)	دکتر نسرین معتمد	استادیار	تهران	
۴	استاد مدعو : (خارجی)	دکتر جمشید داوودی	استادیار	IBB	
۵	نماینده کمیته تحصیلات تکمیلی دانشکده یا گروه آموزشی :	دکتر شاهرخ صفریان	استادیار	تهران	

تذکر: این برگه پس از تکمیل توسط هیات داوران در نخستین صفحه پایان نامه درج می گردد.

پردیس علوم

آموزش تحصیلات تکمیلی

چکیده:

در سال های اخیر استفاده از داروهای تاثیر گذار بر مسیرهای چرخه ی سلولی و مرگ برنامه ریـزی شده ی سلول به منظور مهار رشد و تاکثیر سـلول هـای سـرطانی بـسیار مـورد توجـه قـرار گرفتـه است.در راستای مطالعات گسترده بر روی خانواده ی دارویی سولفانامیدی اثرات ضد تومـوری بـرای این خانواده دارویی مشاهده شده است که این ویژگی خود به واسـطه ی مکانیـسم هـایی از جملـه مهار انزیم کربونیک انهیدراز،ممانعت از تشکیل ساختار میکروتوبولی ،مهار چرخه سلولی و مهـار رگ زایی اعمال می کنند.در این پروژه تحقیقاتی داروی سولفاستامید بـا ویژگـی مهـار کننـدگی آنـزیم کربونیک انهیدراز انتخاب گردید تا اثر آن بر القای مرگ و چرخه سلولی در رده سلول سرطان سینه T47D بررسی گردد.بدین ترتیب در ابتدای غلظتی از دارو که موجب مرگ ۵۰ درصد از سلول هـا می شود (LD50)پس از گذشت مدت زمان ۴۸ ساعت توسط MTT محاسبه شـد و آزمـون هـای بعدی با استفاده از این غلظت انجام گرفت.

توسط میکروسکوب فلورسنس و با استفاده از رنگ آمیزی هـم زمـان Annexin-PI سـلول هـای آپـاپتوز شـده و نکـروز شـده و بـه منظـور بـه دسـت آوردن درصـد آپـاپتوز القـا شـده از تکنیـک فلسوسیتومتری استفاده شد.در جهت تایید آپاپتوز محاسبه شده توسط دسـتگاه فلوسـیتومتر،آزمون های بررسی نردبانی DNA ،اندازه گیری میزان فعا لیت آنزیم کاسپاز ۳و وسترن بلات برای شـش پروتئین Bcl2,BAX,AIF,Cdc2-p14-p15,P27,CyclinD1 انجام شدند.برای بررسـی اثـر چرخه سلول های T47D از تکنیک فلوسیتومتری و رنگ آمیزی سلول ها با رنگ DAPI استفاده شد.

فصل اول :مقدمه

۱-۱.سرطان..... ۱

۱-۱-۲.سرطان پستان..... ۲

۱-۱-۲. درمان سرطان پستان..... ۳

۱-۲.سولفانامیدها..... ۵

۱-۲-۱ . سولفاستامید سدیم..... ۶

۱-۳. داروی Doxorubicin..... ۷

۱-۴. آپاپتوز..... ۸

۱-۴-۱. تغییرات مور فولوژیکی سلولهای آپاپتوتیک..... ۸

۱-۴-۲ .کاسپازها..... ۱۰

۱-۴-۳. آپاپتوز از طریق مسیر خارجی و به واسطهٔ رسپتورهای مرگ(DR..... ۱۱

۱-۴- ۴. آپایتوز از طریق مسیر داخلی..... ۱۳

۱-۴-۵. تنظیم کننده‌های آپاپتوز..... ۱۵

۱-۴-۵-۲. پروتئین‌های خانوادهٔ BCL_2..... ۱۶

۱-۴-۶. پروتئین‌های زندگی بخش مشابه Bcl_2..... ۱۸

۱-۴-۷. پروتئین‌های مرگ مشابه Bax..... ۱۹

۱-۴-۸. برخی از پروتئین‌های دخیل در آپاپتوز..... ۲۱

۱-۴-۹.سیتوکروم C..... ۲۲

۱-۴-۱۰.Apaf-1..... ۲۳

۱-۴-۱۱.پروتئین p53..... ۲۳

۱-۵. چرخه سلولی و سرطان..... ۲۴

۱-۵-۱. چرخه سلولی..... ۲۵

۱-۵-۲. کنترل چرخه سلولی.....۲۶

۱-۵-۳. مهار کننده‌های چرخه سلولی.....۲۸

۱-۵-۴. پروتئین P^{53} و P^{21}.....۲۸

۱-۵-۵. پروتئین رتینوبلاستوما(Rb).....۲۹

۱-۶. نشانگرهای نشرزای مورد استفاده در بررسی آپاپتوز، چرخه سلولی..... .....۲۹

۱-۶-۲. رنگ Propidium Iodide (PI).....۳۰

۱-۶-۳.Annexin V.....۳۱

فصل دوم: مواد و روش ها

۲-۱ مواد وروش های متداول در کشت سلول..... ۳۲

۲-۱.رده سلولی T_{47D}.....۳۲

۲-۲.محیط کشت.....۳۳

۲-۳.سرم جنین گاوی.....۳۳

۲-۴.محلول پنی سیلین- استرپتومایسین.....۳۴

۲-۵.محلول Trypsin- EDTA.....۳۴

۲-۶.بافر نمکی PBS...۳۴

۲-۷.رنگ تریپان بلو ۳۵

۲-۸. DMSO.....۳۵

۲-۹.وسایل به کاررفته در کشت سلول.....۳۵

۲-۱۰روشهای به کار رفته.....۳۶

۲-۱۰-۲.پاساژ دادن سلول های چسبنده.....۳۶

۲-۱۰-۳. شمارش سلول ها توسط لام هموستیومتر.....۳۷

۲-۱۰-۴.انجماد سلولهای رده T47D ۳۸

۲-۱۰-۵.خارج کردن سلولها از انجماد ۳۹
۲-۱۰-۶.آزمون MTT..... ۳۹
۲-۱۰-۶-۱.مواد و وسایل به کار رفته در آزمون MTT..... ۴۰
۲-۱۰-۶-۲.مراحل انجام ازمون MTT..... ۴۰
۲-۱۱.روشهای تشخیص آپاپتوزیز..... ۴۱
۲-۱۱-۱. تست DNA laddering..... ۴۱
۲-۱۱-۲. تشخیص آپاپتوز از طریق اتصالAnnexin-V..... ۴۴
۲-۱۱-۲. تعیین درصد سلول های آپاپتوز شده به کمک دستگاه فلوسیتومتر..... ۴۵
۲-۱۱-۴.آزمون سنجش میزان فعّالیّت کاسپاز ۳..... ۴۶
۲-۱۲ . بررسی چرخه سلولی..... ۴۸
۲-۱۲-۱ .اساس روش..... ۴۸
۲-۱۲-۲. مواد و تجهیزات مورد نیاز..... ۴۹
۲-۱۲-۳. روش کار..... ۴۹
۲-۱۴.آزمون وسترن بلات western blot ۴۹
۲-۱۴-۱.مواد و وسایل لازم ۵۰

فصل سوم:نتایج

۳-۱.نتلیج آزمون MTT ۶۳
۳-۲.نتایج آزمون فلوسایتومتری..... ۶۵
۳-۲-۱.بررسی پدیده آپاپتوز توسط تکنیک فلوسایتومتری..... ۶۵
۳-۲-۲. بررسی چرخه سلولی توسط تکنیک فلوسایتومتری..... ۷۰
۳-۳. بررسی ریخت شناسی سلولها توسط میکروسکوپ فلورسنت..... ۷۴
۳-۴. نتایج آزمون DNA Laddering..... ۷۷
۳-۵. نتایج آزمون سنجش فعالیت آنزیم کاسپاز ۳..... ۷۸
۳-۶.نتایج آزمون وسترن بلات..... ۸۰

فصل چهارم:بحث و نتیجه گیری

فصل پنجم:منابع

University of Tehran

College of Science

School of biology

Study of sulfacetemid effect on programmed cell death and cell cycle arrest induction in T47D cell line

By:Saeed Noroozi

Under supervision of :

Dr.Shahrokh Safarian

A thesis submitted to the graduate studies office in practical fulfillment of the requirements for the degree of master

In

cellular and molecular Biology

February 2009

Abstract

The novel anti cancer drugs which target cell cycle and programmed cell death pathways by interfering with specific molecules involved in carcinogenesis,are attractive for treatment of cancer.

The sulfonamide family often exhibit diverse biological functions and is well known for a variety of pharmacological effect such as antibiotic,anti carbonic anhydrase,anti thyroid and anti tumor activity.

There are several mechanisms for ther anti tumor activites,including disruption of microtubules assembly,cell cycle arrest and angiogenesis inhibition,which are exerted due to their aromatic/heterocyclic motif.These serendipitous findings have stimulated research efforts aiming at the discovery of a novel class of anti tumor sulfonamides.

In this report we have selected sulfacetamid with known carbonic anhydrase inhibitory effect in cell free condition to understandthe pharmacological potential of this drug in apoptosis induction and disturbance of the cell cycle of a human breast cancer cell line(T47D).Exponentially growing T47D cell wear treat with sulfacetamid and its LC50,41mM,was estimated after 48^{th} by MTT assay.

Morphological changes were analyzed by double staining with Annexin-PI and examined under fluorescence microscope.Flow cytometric analysis showed 8.75% apaptosis,using Annexin-V flous kit.The accumulation of the cells in S phase of cell cycle ,19.95% ,was determined by DAPI staining and flow cytometric analysis.in order to verifty induction of apoptosis,DNA laddering test,caspase activity assey for caspase 3 and western blotting for 6 major protein involved in apoptosis phatway,Bcl2,BAX,AIF,Cyclin1,P27 and Cdc-P14-P15,were done and no DNA ladder pattern,an increase in caspase 3 activity for about 3.5464 ,and no visible protein band for BAX,Bcl2,AIF,P27 and Cdc-p14-p15 proteins were treated cells with sulfacetamid for each test respectively but we observe protein band for cyclin D1 in treat cells with sulfacetamid.

۱-۱- سرطان:

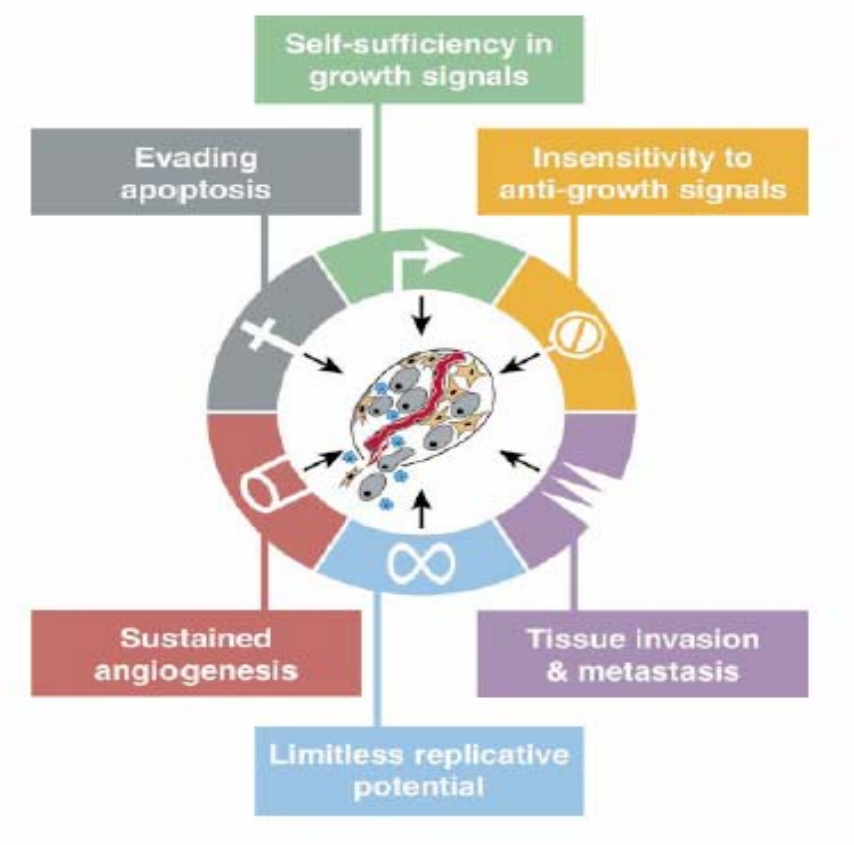
سرطان[۱] یک اختلال سلولی است که رخ دادن آن مستلزم تغییر مکانیسم‌های کنترل کننده رشد و تمایز سلولها می‌باشد. چنین سلول هایی بیش از حد تکثیرمی شوند و تومورهای موضعی ایجاد می‌کنند که از این طریق می‌توانند بافتهای مجاور را مورد تهاجم قرار دهند. سلول های توموری قابلیت تکرار چرخه تقسیم سلولی و مهاجرت به نواحی دیگر بدن و درگیر نمودن اعضای گوناگون را در فرآیندی موسوم به متاستاز[۲] دارند. این سلولها غالباً دارای اختلالات ژنتیکی هستند که نشا نگر ناپایداری ژنتیکی آنها می‌باشد. عوامل متعددی نظیر سن، نژاد، زمینه ارثی، عوامل محیطی و رژیم غذایی در وقوع این بیماری تأثیر گذارند(۱،۲).

در سالهای اخیر بیشترین میزان مرگ و میر ناشی از سرطان به ترتیب مربوط به سرطان ریه، پستان، پروستات و رودۀ بزرگ می‌باشد. از جمله سرطان های وابسته به جنس می‌توان به سرطان پستان در زنان و سرطان پروستات در مردان اشاره نمود(۳). دربیماری سرطان سلول ها به طور مداوم دچار تغیرات مختلفی می‌شوند که در نتیجه آنها یک سلول می‌تواند در برابر محدودیت‌های اعمال شده در رشد و تکثیر خود مقاومت نماید . از جمله این تغییرات می‌توان به توان رگزایی[۳]، توان تهاجم به بافتهای مجاور، غیر فعال شدن آپاپتوز سلولی و توانایی تکثیر نا محدود اشاره نمود(شکل ۱-۱).

۱-cancer

۲-metestasis

۳- Angiogenesis



شکل۱-۱. قابلیّت های کسب شده توسط سلول های سرطانی در روند تکامل(۲)

۱-۱-۱- سرطان سینه[۱]:

سرطان سینه یکی از شایع‌ترین بدخیمی ها در سراسر دنیا محسوب می‌شود. میزان شیوع این بدخیمی در کشورهای شرقی و در حال توسعه، در مقایسه با کشورهای غربی کمتر است. گر چه این نوع سرطان وابسته جنس می باشد و بیشتر در زنان دیده می‌شود ولی در ۱ درصد موارد در مردان نیز گزارش شده است که این امر بیانگر تأثیر هورمونهای جنسی،رژیم غذایی و عوامل محیطی بر روی این بیماری می‌باشد. این بدخیمی به صورت موضعی دربافت های پستانی آغاز و در بسیاری از موارد به یک بیماری سیستماتیک تبدیل می‌گردد(۴ ،۲).

امروزه با توجه به پیشرفت‌های درمانی به دست آمده ، مرگ و میر ناشی از این بیماری در حدود ۲۰۰۰۰ مورد از هر ۱۰۰/۰۰۰ نفر است. با وجود افزایش شیوع سرطان سینه این نسبت همچنان ثابت مانده است که احتمالاً علت آن وجود عوامل پیشگیری کننده و تشخیص سریع این بیماری به وسیلهٔ ماموگرافی و درمانهای کمکی سیستمیک می باشد (۲،۵).

۱-۱-۲- درمان سرطان سینه:

درمان سرطان سینه با اهداف زیر دنبال می‌شود:

۱- پیشگیری در افراد با ریسک بالا

۲- درمان موضعی قطعی

۳- کاهش علائم سیستمیک بیماری

۱- Breast cancer

۴- جلوگیری از بازگشت بیماری

روشهای درمانی به عوامل مانند سن بیمار، شدت بیماری، نوع گیرنده ی درگیر وغیره بستگی دارد که از جمله می‌توان به موارد زیر اشاره نمود:

۱- جراحی: جراحی به عنوان مهمترین روش درمان سرطان سینه قدمت دیرینه دارد، البته در صورت بروز متاستاز این روش به تنهایی کارایی ندارد(۲،۳).

۲- پرتو درمانی: پیش از جراحی به منظور کوچک نمودن سایز تومور و یا پس از آن به منظور جلوگیری از بازگشت بیماری به کار می‌رود(۴ ،۳ ،۲).

۳- ژن درمانی: از آنجائیکه ناهنجاری‌های کرموزومی و اختلالات ژنتیکی از علل بروز سرطان‌ها می‌باشند لذا ژن درمانی از طریق جایگزین کردن ژن معیوب وانتقال ژن سالم به منظور برقراری فعالیت طبیعی در سلول، از روشهای جدید درمانی محسوب می‌شود(۳).

۴- بهبود دهنده‌های پاسخ ایمنی: در این روش سعی می‌شود که پاسخ ایمنی بدن در برابر رشد تومور افزایش یابد.

۵- شیمی درمانی:هدف از شیمی درمانی جلوگیری از پیشرفت بیماری و متاستاز ودر نهایت ایجاد بهبودی در بیماران بدخیم می باشد (۶،۴،۳).

۱-۲. سولفانامیدها[۱]:

سولفانامیدها دسته ای از داروهای ضد باکتریایی صناعی با ساختار شیمیایی ویژه و فرمول شیمیایی ریاRSO_2NH_2 می‌باشد که اتم نیتروژن و گوگرد در ساختار گروه عاملی این خانواده ی دارویی به شکل $-S(=O)_2-NH_2$ به کار رفته‌اند.

عملکرد مؤثر این ترکیبات بر روی باکتری‌ها اولین بار در سال ۱۹۳۲ توسط Gerhard Domagk کشف شد و به عنوان اولین گروه از آنتی بیوتیک‌های صناعی برای درمان عفونت‌های باکتریایی در انسان مورداستفاده قرار گرفت. سولفانامیدها از طریق دخالت در ساخت اسید فولیک[۲] ، موجب مهاررشد و تکثیر باکتری‌ها می‌شوند.

این خانواده از داروها به دلیل قیمت کم، هنوز هم در نقاط مختلف دنیا استفاده می‌شوند. هر چند مقاومت رو به افزایش نسبت به سولفانامیدها در برخی میکروارگانیسم‌ها مثل استوپتوکوک وشیگلا، میزان اثر بخشی این داروها را به عنوان آنتی بیوتیک کاهش داده است، اما سایرعملکردهای این خانواده دارویی به عنوان آزاد کنندۀ انسولین ،کاهش دهندۀ قند خون، کاهش دهندۀ فشار خون، ادار آوری، اثرات ضد تشنجی و نیز کاهش ترشحات چشمی در بیماری گلوکوم[۳]، سبب افزایش کاربرد آنها گشته است. علاوه بر این در سالهای اخیر توجه ویژه‌ای به خواص ضد توموری این خانواده دارویی شده است که از آن جمله می‌توان به

۱- Sulfonamides

۲- Fulic acid

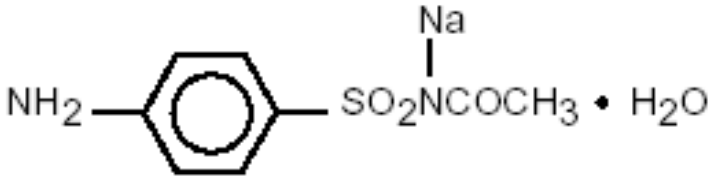
۳- Glucom

مواردی چون مهار کربونیک انیدراز، جلوگیری از گردهمایی میکروتوبول‌هاو مهار رگزایی در تومورها اشاره نمود (۷، ۸، ۹، ۱۰).

۱-۲-۱- سدیم سولفاستامید:[۱]

نام علمی سدیم سولفاستامید

N-Sulfanilylacetamide monosodium salt monohydrate بوده و فرمول مولکولی آن $C_8H_9NaO_3S.H_2O$ با وزن مولکولی ۲۵۴/۲۴ گرم بر مول می‌باشد. میزان حلالیت آن ۱ گرم در ۲/۵ ml آب می‌باشد و قابلیت حل در اتانول به همراه تولید گاز جوشان را دارد.این ماده، غیر قابل حل در بنزن، کلروفروم و اتر می‌باشد. نقطهٔ ذوب این دارو بین ۱۸۱-۱۸۴ درجه سانتی گراد است. کاربرد بالینی متداول این دارو در ترکیب با ۲ داروی سولفانامیدی دیگر به نام سولفاتیازول و سولفابنزامید در ساختار پماد موضعی برای درمان عفونت‌های خاص واژینال می باشد(۱۱).



شکل ۱-۲-۱. ساختار مولکولی سولفاستامید سدیم(۱۲)

۱- Sulfacetamid sodium

۱-۳- داروی Doxorubicin:

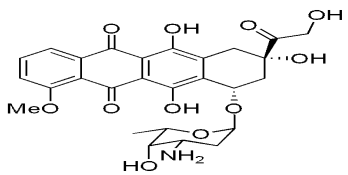
دوکسوروبیسین یک آنتی بیوتیک آنتراسیکلیک است و در ساختار خود دارای هسته naphathaceneqinone می‌باشد که با یک پیوند گلیکوزیدی به قند آمین دار اتصال می‌یابد. فرمول مولکولی این دارو $C_{27}H_{29}NO_{11}.HCL$ با وزن مولکولی ۹۹ .۹۵۷ گرم بر مول می‌باشد. این دارو سمی وکشنده سلولی است که از محیط کشت باکتری Streptomyces peucetius vercaecius استخراج می‌شود و به شکل دوکسوروبیسین هیدروکلراید کاربرد کلینیکی دارد.

دوکسوروبیسین اثرات کشنده ی سلولی خود را به ۳ طریق اعمال می‌کند:

الف) با اتصال به اسیدهای نوکلئیک در دو رشتهDNA موجب مهار DNAپلیمرازها و RNAپلیمرازها می‌شود.

ب) با اتصال به توپوایزومراز II کمپلکس برش دهنده DNA را تشکیل می دهد.

ج) با اتصال به لیپدهای غشاء پلاسمایی بسیاری از عملکردهای سلول را تحت تأثیر قرار می‌دهد، از جمله موجب تشکیل رادیکال‌های آزاد مانند OH^- می‌شود. سلول‌های تیمار شده با دوکسوروبیسین ویژگی‌های فعال شدن مسیر آپاپتوز را از خود نشان می‌دهند که به همین علت به عنوان یک داروی مؤثر در شیمی درمانی سرطان کاربرد دارد(۱۳، ۱۴).



شکل ۱-۳. ساختار مولکولی دوکسوروبیسین(۱۴)

۱-۴. آپاپتوز:

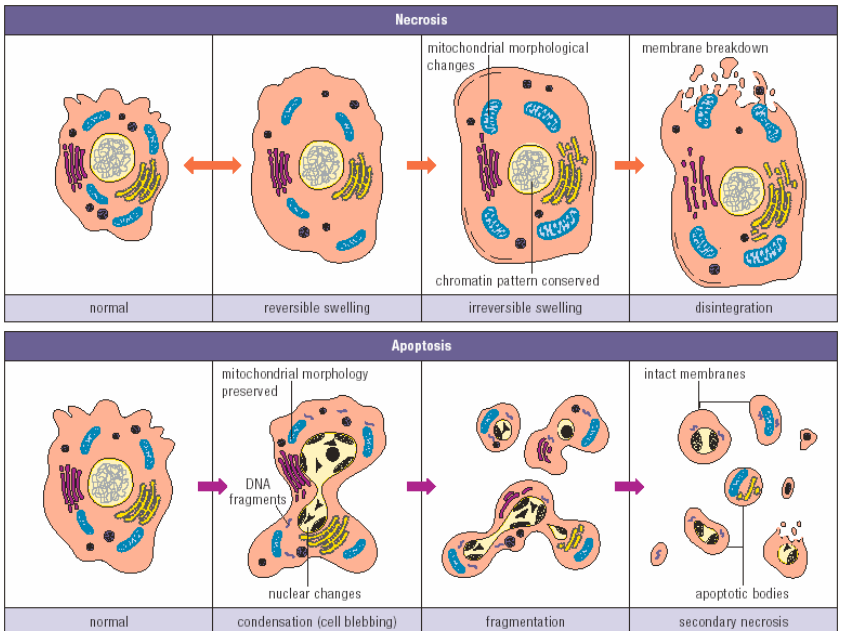
آپاپتوز یک نوع مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول است که از مشاهده و آغاز مطالعه ی آن ، حدود یک قرن می‌گذرد. فرایندآپاپتوز در سال ۱۹۷۲ با الهام از واژه ای لاتینی به معنی افتادن برگ درخت در پاییز نام گذاری شده است. در طی سی سال اخیر مکانیسم آپاپتوز بسیار مورد توجه ومطالعه قرار گرفته است. آپاپتوز یک پدیدهٔ فیزیولوژیکی است که برای بافت‌زایی و اندام‌زایی و هموستاز بافتها ضروری است. به طور متوسط در یک انسان بالغ پنجاه تا هفتاد میلیون سلول در روز دچار آپاپتوز می‌شود. نقص در پدیدهٔ آپاپتوز موجب بیماری‌های مهلکی از جمله سرطان می‌شود. مطالعه و بررسی مکانیسم آپاپتوز در کشف تنظیم کننده‌های جدید و داروهای القاء کننده مرگ سلولی به منظور جلوگیری از بروز سرطان بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

۱-۴-۱. تغییرات مور فولوژیکی سلولهای آپاپتوتیک:

سلولهای آپاپتوتیکی تغییرات مورفولوژیکی ویژه‌ای را متحمل می‌شوند که از آن جمله چروکیدگی سلول، جوانه زدن غشای پلاسمایی، شکست DNA سلول وتبدیل آن به قطعاتی با ضریب ۱۸۰ جفت باز می باشد که در نهایت با تبدیل سلول آپوپتوزی به حبابچه هایی به نام اجسام آپاپتوزی می‌باشد. اجسام آپاپتوزی از طریق فاگوسیتوز، توسط سایر سلولها از محیط حذف می‌شوند.

تظاهرات برخی از تغییرات ایجاد شده در سلول آپاپتوزی مانند قطعه قطعه شدن DNA بسته به نوع سلول متفاوت می‌باشد. علاوه بر پدیدهٔ آپاپتوز پدیده‌ی دیگری در سلول ها امکان وقوع دارد که با عث مرگ سلولی می‌شود که به آن نکروز گفته می شود.

نکروز: مرگ سلول به وسیلهٔ عوامل آسیب رسانی مانند صدمات مکانیکی و یا مواد شیمیایی سمی می باشد. در این نوع مرگ، سلول ها به علت از دست رفتن توانایی غشاء در تبادل آب و یون ها و نشت محتوای درون سلولی متورم می شوند.نشت مواد درون سیتوپلاسمی به بیرون باعث بروز واکنشهای التهابی در بافتهای اطراف می شود(۱۵).



شکل۱-۴-۱. نمایی شماتیک از نکروز و آپاپتوز (۱۵)