



دانشگاه پیام نور

دانشگاه پیام نور
تحصیلات تکمیلی واحد تهران

پایان نامه کارشناسی ارشد بیوشیمی

شناسایی بیومارکرهای بیماری کارسینومای سلول
های بازال انسانی
(Basal cell carcinoma) به روش پروتئومیکس

استاد راهنما:

جناب آقای دکتر مصطفی رضایی طاویرانی

نگارش:

نسیم خزاعی

سال تحصیلی 1387

فهرست

عنوان

صفحه

فصل	
اول: مقدمه
.....
2.....
-1	-1
1سرطان
.....
2.....
2-1- پوست ، لایه های تشکیل دهنده و وظایف آنها
.....
3.....
1-2-1- لایه چربی زیرجلدی (Hypodermis)
.....
4.....
-1-2-2- درم (Dermis)
.....
.....
4.....
-1-2-3- اپیدرم
.....
.....
5.....
4-1-2-1- بازال
.....
.....
6.....
5-1-2-1- لایه دانه دار (Stratum granulosum)
.....
9.....
6-1-2-1- لایه شفاف (Stratum lucidum)
.....
9.....
7-1-2-1- (Stratum comun)
.....
.....
9.....
3-1- انواع تومور های

.....	پوستی
.....
.....	10.....
.....	1-3-1- تومورهاي بد
.....	خيم
.....
.....	10.....
.....	1-3-2- تومورهاي
.....	خوش خيم
.....
.....	11.....
.....	Basal cell carcinoma-1-4
.....
.....
.....	12.....
.....	1-4-1- ساختار و عملکرد
.....	P53
.....
.....	14.....
.....	1-4-1-1- ژن، پروتئين و تنظيم
.....	p53
.....	14.....
.....	1-4-1-2- پاسخ سلولي به آسیب
.....	DNA
.....	15.....
.....	1-4-1-3- موتاسيون p53
.....	یافته
.....
.....	16.....
.....	1-4-2- ساختار و عملکرد
.....	PATCHED
.....
.....	16.....
.....	1-4-3- ساختار و عملکرد
.....	BCC
.....
.....	21.....
.....	1-4-4- پیشرفت
.....	بیماری
.....
.....	23.....
.....	1-4-5-

.....	سرطان
.....
24.....
.....	-1-4-6
.....	پاتوژنز
.....
26.....
.....	-1-4-7
.....	متاستاز
.....
27.....
.....	-1-4-8
.....	اپیدمی
.....
28.....
.....	-1-4-9 عوامل افزایش دهنده ریسک
.....	ابتلاء
28.....
.....	-1-4-10 سندر مهایی
.....	ژنتیکی
.....
.....	29.....
.....	-1-4-11 نقص
.....	ایمنی
.....
.....	30.....
.....	1-4-12 تظاهرات
.....	کلینیکی
.....
.....	31.....
Nevoid	-1-4-13 سندر م
BCC	Nevus)
(Basal
Cell	31.....
.....	-1-4-14 هیستوپاتولوژی
.....	BCC
.....
.....	32.....
.....	-1-4-15 رشد
.....	تهاجمی
.....
.....	34.....
.....	-1-4-16
.....	هیستولوژی

.....

35.....

1-4-17 - نمونه گیری Microdissection به کمک

..... لیزر.....

37.....

-1-4-18

..... درمان.....

.....

38.....

-1-5

..... پروتئومیک.....

.....

39.....

1-5-1 - اهمیت پروتئومیکس در تحقیقات سرطان چه میزان

..... است؟.....

39.....

-1-5-2 - بیو

..... مارکرها.....

.....

40.....

فصل دوم : مواد و

..... روشها.....

.....

42.....

-2-1

..... مواد.....

.....

43.....

-2-2

..... روشها.....

.....

44.....

-2-2-1 - نمونه

..... گیری.....

.....

44.....

-2-2-2 - روش استخراج

..... پروتئین.....

.....

44.....

-2-2-3 - سنجش

..... پروتئین.....

.....

45

4-2-2-2- الکتروفورز دو

بعدي

.....

46

5-2-2-2- رنگ آمیزی پروتئین ها به روش رنگ آمیزی کوماسی

بلو

48

6-2-2-2- آنالیز تصویر ژل های

دوبعدی

.....

48

1-6-2-2-2- اسکن ژل و استخراج داده

ها

48.....

2-6-2-2-2- پردازش تصویر

دیجیتالی

.....

49.....

3-6-2-2-2- شناسایی لکه های پروتئینی و کمی

سازی

49.....

4-6-2-2-2- تطابق ژل

ها

.....

51.....

5-6-2-2-2- آنالیز داده

ها

.....

51.....

6-6-2-2-2- تفسیر

داده ها

.....

52.....

7-6-2-2-2- پایگاه های

داده

.....

53.....

7-2-2-2- بیوانفورماتیک در آنالیز ژل های

دوبعدی

.....

53.....

1-7-2-2-2- پایگاه های داده

..... پروتئومیک	54...
.....	
..... 2-2-7-2- ابزارهاي انفورماتيكي مورد استفاده در	58.....
..... پروتئومیک	
..... 2-2-7-3- نرم افزارهاي آناليز تصوير ژل	58.....
..... دوبعدي	
..... 2-2-8- آناليز هاي آماری	118.....
..... (Statistical analysis)	
..... 2-2-9- اسپكترومتری جرمی	118.....
..... (Mass spectrometry)	
.....	
..... فصل سوم	
..... نتایج	
.....	
..... 119.....	
..... فصل چهارم	
..... بحث و نتیجه	
..... گیری	
.....	
..... 132.....	
..... منابع	
.....	
.....	
.....	141

چکیده

مقدمه: کارسینومای سلول های بازال (Basal cell carcinoma) یکی

از شایع ترین نوع سرطان های پوست غیر ملانومایی انسانی محسوب می شود که مانند دیگر سرطان ها کل زندگی شخص مبتلا را تحت تاثیر خود قرار می دهد. با مطالعه فاکتور های پروتئینی آن و شناسایی بیشتر تغییراتی که در روند سرطانی شدن پوست رخ می دهد می توان در روند پیشگیری و درمان، به بیماران کمک موثری نمود.

مواد و روش ها: نمونه های بافت سرطانی و سالم از بیماران مبتلا به سرطان پوست از نوع کارسینوما گرفته شد و با روش های جداسازی استاندارد کل پروتئین های بافت تخلیص و با استفاده از الکتروفورز دو بعدی پروتئین ها جداسازی گردیدند. پروتئوم های بافت سالم و توموری با همدیگر مقایسه و میزان بیان پروتئین های مورد نظر با استفاده از آنالیز های لازم بررسی شد. پروتئین های دارای اختلاف در بیان شناسایی و نقش آنها مورد بحث واقع شده است.

یافته ها: تعداد 87 پروتئین در ژل های حاصل از الکتروفورز دو بعدی تعیین که 76 عدد از آنها دارای تفاوت آشکاری در بیان بودند. تعداد 11 پروتئین از طریق بانک های اطلاعاتی شناسایی شدند. سه پروتئین نیز توسط اسپکترومتری جرمی شناسایی و آنالیز شدند.

بحث و نتیجه گیری: با توجه به یافته های این پژوهش مشاهده می شود که در بیماری مورد مطالعه بیان جمع کثیری از پروتئین های بافتی در بافت سرطانی تغییر یافته و بیشتر آن ها کاهش یافته یا اصلا بیان نشده است. این پروتئین های تغییر بیان یافته می توانند به عنوان بیومارکر در مراحل شناسایی و درمان این بیماری موثر واقع شوند.

واژگان کلیدی: سلولهای کارسینومای بازال، الکتروفورز دو بعدی ، پروتئومیک ، اسپکترومتری جرمی

فصل اول:
مقدمه

مقدمه

1-1- سرطان

هیچ تعریفی از سرطان وجود ندارد که از نظر بیولوژی سلولی راضی کننده باشد، اگرچه در حقیقت سرطان اساساً "یک بیماری سلولی است که در اثر تغییر شکل جمعیت سلولها با رشد سلولی شبکه ای و با رفتاری غیر اجتماعی ایجاد می گردد. پیشرفتهای میکروسکوپی از نمونه بافت می تواند در تشخیص سرطان پوست نقش اساسی داشته باشد. آنالیز DNA ژنومیک، بیان ژنها و پروتئینهای بیان شده نیز می توانند اطلاعات مهمی را در تشخیص سرطان به ما بدهند. در آینده تشخیص و انتخاب درمان بر اساس یافته های مرفولوژیکی همزمان با آنالیز اسیدهای نوکلئیک و پروتئین صورت خواهد گرفت.

سرطان بر اساس تغییرات ژنتیکی غیر قابل برگشت رخ می دهد. اگرچه هنوز ثابت نشده ولی تراریختی¹ در یک سلول اتفاق می افتد که بعدها به عنوان نقطه شروع تومور است.² کارسینوژنز مراحل بوجود آمدن سرطان است و در چندین مرحله رخ می دهد. این پروسه چند مرحله ای شامل مراحل محدود کننده سرعت³ نیز می باشد.

شایعترین فرمهای سرطان در سلولهای سوماتیک رخ می دهد و بر اساس فراوانی از نظر منشاء به ترتیب زیر هستند:

1- منشاء اپیتلیال مانند (پوست، پروستات، پستان، کلون و ریه)

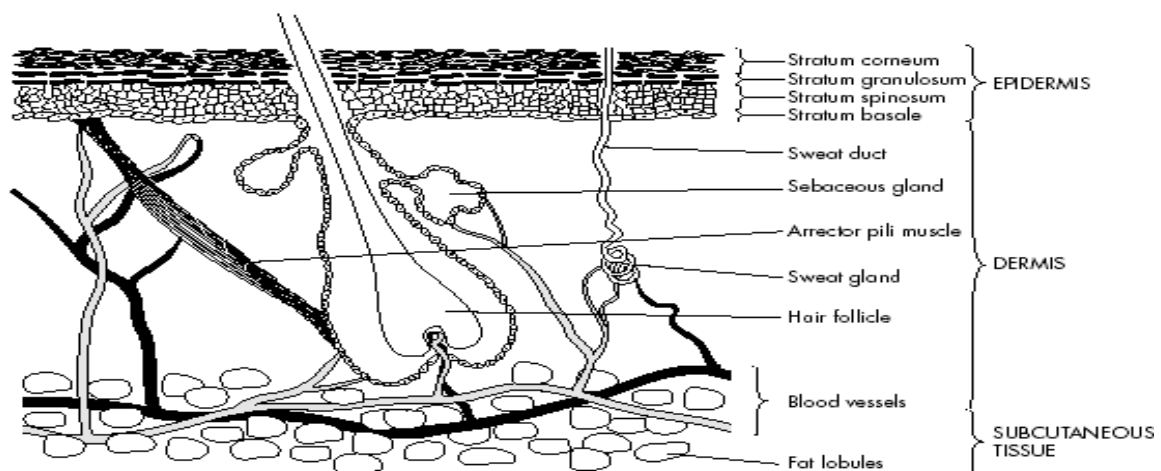
2- سرطانهایی با منشاء (hematopoietic lineage) مانند (لوکمی و لیمفوما)

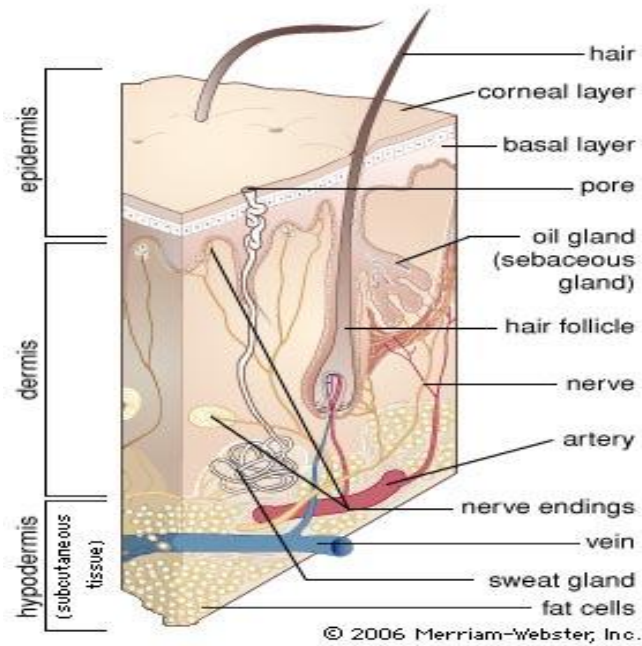
3- سلولهای مزانشیم مانند سارکوما (1,2).

1. transformation
2. Cancer Dogma
3. Rate limiting step

2-1- پوست، لایه‌های تشکیل دهنده و وظایف آنها

پوست انسان در طول حیات بعنوان اولین سد دفاعی بدن شناخته شده و در برابر عوامل خارجی همچون ترکیبات شیمیایی و میکروارگانیسم از مهمترین اعضای سیستم دفاعی بدن تلقی می‌گردد. همچنین با توجه به اینکه حدود 10% از خون بدن را به خود اختصاص می‌دهد؛ نقش مهمی در کنترل حرارت بدن، تبخیر سطحی و دفع مواد زائد بعهده دارد. پوست از نظر متابولیسی فعال بوده و نمونه آن نقشی است که در مسیر ساختن ویتامین D دارد. پوست انسان به 4 لایه اصلی تقسیم می‌شود. (شکل 1)





شکل 1- لایه های تشکیل دهنده پوست

1-2-1- لایه چربی زیرجلدی (Hypodermis)

پل بین لایه های بالایی و اجزاء زیرین بدن است. پایینترین لایه پوست بوده و به حداکثر مناطق بدن ضخیم و بطور نسبی چند میلی متر می باشد بقیه در بعضی از نقاط بدن مانند پلکها وجود ندارد. این لایه عمدتاً بعنوان سد حفاظت مکانیکی لایه های زیرین بدن در برابر شوکهای فیزیکی عمل می کند. این لایه همچون حامل رگهای خونی و اعصاب بوده و جهت تأمین مولکولهای پرانرژی لایه های بالاتر کارآمد است.

1-2-2- درم (Dermis)

عمدتاً 3-5 میلی متر ضخامت دارد ساختار آن شبکه ای از بافت همبند ترکیب یافته از فیبریل های کلاژن و بافت الاستیک انعطاف پذیری که در یک ژل موکوپولی ساکارید قرار می گیرد، می باشد (WILKES 1973) درم جایگاه بافت های جدگانه ای همچون رگهای خونی و لنفی، پایانه های عصبی، فولیکولهای مو و غدد سبابه (Pilosebaceus) و غدد عرق (sweat

ghad) می‌باشد.

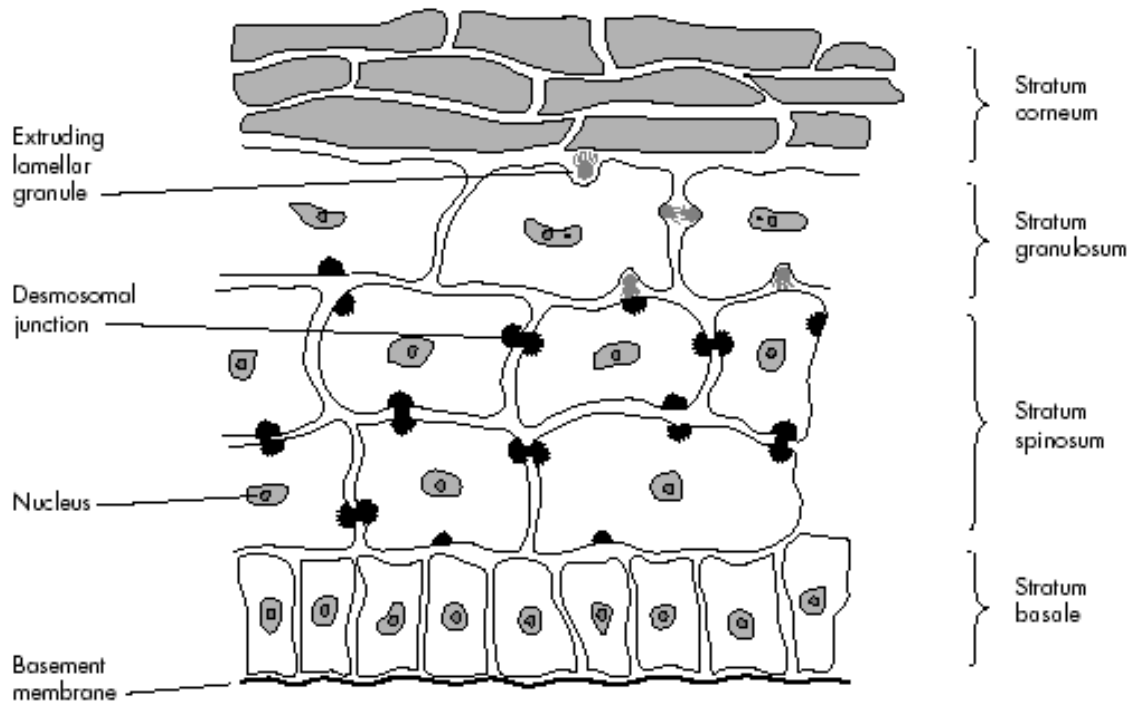
سیستم رگی گسترده پوست جهت تنظیم حرارت ضروریست و انتقال اکسیژن و مواد غذایی و برداشت سموم و بعضی محصولات پوست در این حیطة صورت می‌گیرد. جریان غنی خون که حدود $0/05 \text{ ml/min}$ در هر میلی گرم پوست می‌باشد برای برداشت مولکولهایی که از لایه های خارجی پوست عبور کرده اند کارآمد است.

همچنین سیستم لنفاوی به لایه درمی - اپیدرمی می‌رسد و در تنظیم فشار، تحصیل پاسخ ها ایمنولوژیکی و برداشت مواد دفعی دخالت دارند. سه ضمیمه اصلی در این ناحیه وجود دارد. فولیکولهایی که در سطح بدن بجز نواحی تحت فشار (کف دست، پا و لبها) یافت می‌شوند، غدد سبابه که وابسته به فولیکولهای مو هستند و سموم ترشح می‌کنند و متشکل از اسیدهای چرب آزاده موم و تری گلیسیریدها بوده که پوست را نرم می‌کنند و PH سطحی بدن درصد 5 نگهدارند، غدد عرق که در بیشتر سطح بدن یافت می‌شوند و محلول نمکی با PH حدود 5 را در پاسخ به گرما و استرس ترشح می‌کنند و غدد آپوکرین که نزدیک لایه درمی - اپیدرمی قرار گرفته و محدود به نواحی خاصی نظیر زیربغل، سینه ها و مناطق تناسلی است. ترشحات لیپوتیدال و پروتئین شیر دلایل اصلی بوی عرق می‌باشند.

3-2-1- اپیدرم

اپیدرم با غشاء لایه لایه پیچیده اش ضخامت‌های گوناگونی از $0/06 \text{ mm}$ در پلک‌ها تا $0/8 \text{ mm}$ در کف دست و پا دارد هیچ رگ خونی در آن موجود نیست و یا تغذیه نمی‌شود. دفع مواد از طریق انتشار لایه درم به اپیدرم صورت می‌گیرد. اپیدرم از 4 لایه متمایز تشکیل شده است که از داخل به خارج عبارتند از:

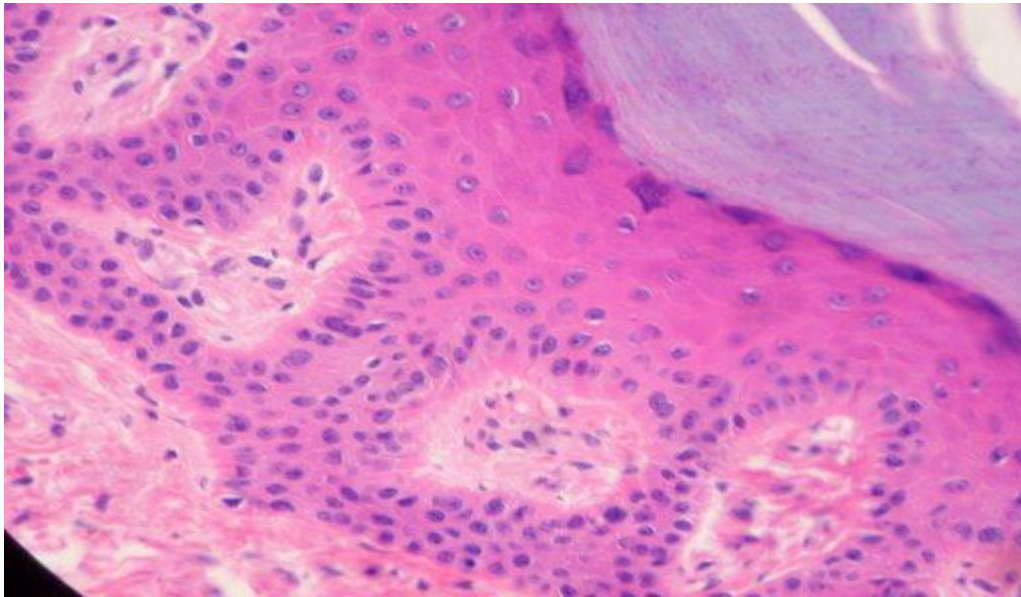
لایه زاینده (germinativum)، لایه شاخی (spinosum)، لایه لانه دار (granulosum) و لایه (corneum). لایه corneum دربردارنده سلولهای مرده است (شکل 2).



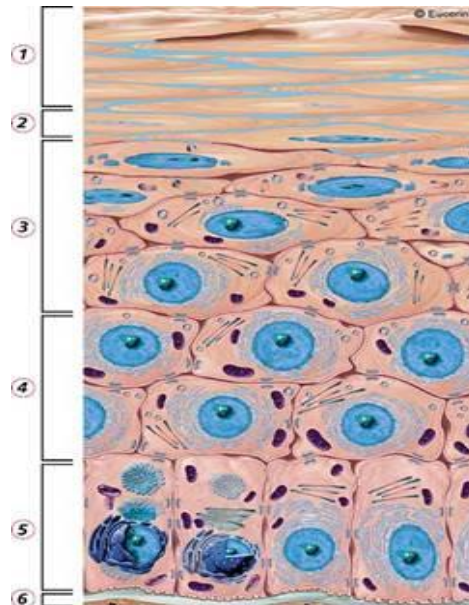
شکل 2-4 لایه مختلف اپیدرم را نشان می دهد

4-2-1- لایه بازال

لایه بازال همان لایه زاینده است (شکل 3 و 4) که بعنوان غشاء پایه شناخته شده است. سلولهای این قسمت شبیه سایر سلولهای بدن دارای ارگانهای از قبیل ریبوزوم و میتوکندری بوده و از نظر متابولیکی فعال نمیباشند.



شکل 3- هیستولوژی سلول های بازال



شکل 4- لایه های مختلف پوست

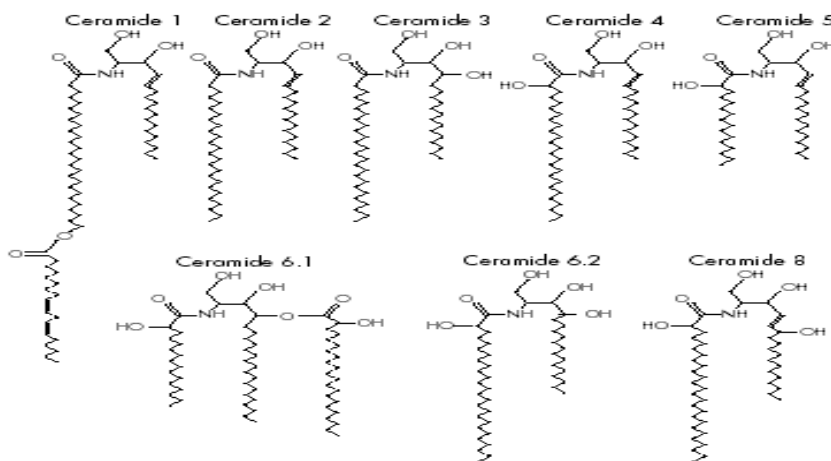
1 - Horny layer ، 2 - Clear layer ، 3 - Granular layer ، 4 - Prickle-cell layer ، 5 - Basallayer و

6 - Basal membrane

لانسیتها تنها سلولهای موجود در این لایه هستند که قادر به تقسیم میتوز می باشند تقسیم سلولهای پایه هر 200 تا 400 ساعت یکبار انجام می گیرد همانندسازی یک سلول در همان لایه می ماند و سلول دیگر به لایه های بالایی مهاجرت

می‌کند کراتینوسیت‌ها بوسیله همی‌دسموزوم‌ها به غشاء متصل شده‌اند. از بین رفتن اتصال بین سلول‌های پایه و غشاء پایه باعث ریزش مو می‌گردد.

این لایه در انسان دارای ترکیب بی‌نظیری از چربی‌ها برای بیشترین نفوذپذیری است. میزان چربی این لایه در افراد مختلف و در قسمتهای مختلف متفاوت است اما بیشتر در چندین لایه دوتایی قرار گرفته‌اند ترکیبات این لایه شامل: سرامیدها، اسیدهای چرب، کلسترول، سولفات کلسترول و دسترول، استرول و فاقد فسفولیپید می‌باشد. سرامیدهای این لایه در هشت کلاس طبقه‌بندی شده‌اند که در شکل (5) نشان داده شده است. سرامیدها همراه اسیدهای چرب کلسترول و سولفات کلسترول خواص آمفی‌فیلیک لازم را برای لایه‌های دوتایی چربی فراهم می‌سازد.



شکل 5- سرامید های موجود در لایه بازال

عملکردهای گوناگون در پایداری لایه‌های 2 تایی چربی به عهده کلاسهای متفاوت سرامیدها می‌باشد. به عنوان مثال سرامید نوع I لایه 2 تایی چربی را بهم پرچ می‌کند و لایه‌های دوتایی چربی به عهده کلاسهای متفاوت سرامیدها می‌باشد. به عنوان مثال سرامید نوع I لایه 2 تایی چربی را بهم پرچ می‌کند و استحکام دهنده مولکولی در بین دو لایه می‌باشد.

علاوه بر کراتینوسیت ها و لامینای چربی ، آب نقش کلیدی در ایجاد لایه *Stratum corneum* بازی می‌کند . وجود آب می تواند نقش میانجی فعالیت های آنزیمهای هیپوستیک موجود در بین این لایه را بازی کند . مضاف بر این که عملکرد آب بدون کراتینوسیت ها در تنظیم فعالیت آنزیمهایی که در تولید رطوبت طبیعی پوست (Natural factor moisturizing) نقش دارند قابل توجه است . همچنین آب بدلیل خاصیت شکل پذیری از ضربات مکانیکی وارد بر پوست جلوگیری می‌نماید .

دو شکل ملانین وجود دارد یکی پرملانین که به شکل سیاه یا قهوه ای است و دیگر فنوملانین که کمتر رایج است و به شکل زرد یا قرمز می باشد . این ملانین ها بصورت ترکیبی در ملانوسیتها وجود دارد . ملانوسیتها وجود دارد . ملانوسیت از طریق ارتباطات دندریتی با کراتینوسیت‌های همجوار ارتباط برقرار می کند این اتصال باعث انتقال ملانوسیت ها به سلولهای کراتینوسیت می‌شود .

نسبت ملانوسیت به کرانوتینوسیت در پوست به صورت 2 به 5 است . این نسبت در سطوحی که کمتر در دسترس است به 1 و 20 می‌رسد . میزان تحریک ملانوسیتها متناسب با افزایش شدت نور به میزان تشکیل رنگدانه در میان سلولهای پایه بستگی دارد . ملانینها در پوست حکم یک چاهک انرژی را دارد که اشعه uv را جذب می‌کند . و رادیکالهای آزاد را هم تجزیه می‌کنند . تعداد ملانوسیتها در پوست افراد تیره و روشن یکسان است اما افراد با پوست تیره ملانوسیت های فعالتری دارند .

سلولهای لانگرهانس ، دیگر سلولهای لایه بازال می باشند و تنها نمایش و نامگذاری آن به یک دانشجوی پزشکی در سال 1860 برمی‌گردد . اما 4 سال طول کشید تا نقشی که در پوست بازی می‌کند مشخص شود .

این سلولها مزوروتیک هستند و ارتباط با سلولهای

کراتینوسیت را از این طریق برقرار می کنند . سلولهای لانگرهانس از مغز استخوان مشتق می شوند و بعنوان سلولهای ارائه دهنده آنتی ژن پوست شناسایی شده اند. اگر سلولهای لانگرهانس کارایی فاگوسیتوز را ندارند اما آنتی ژنها را به لنفوسیت های گره های لنفاوی موجود در پوست ارائه می دهند.

5-2-1- لایه دانه دار (Stratum granulosum)

پس از لایه شاخی این لایه قرار دارد . سلولهای کراتینوسیت در این لایه نیز همچنان در حال تمایز و سنتز کراتین هستند و شروع به پهن شدن می کنند . لایه دانه دار دارای آنزیمهایی هستند که سبب کاهش ترکیبات حیاتی سلول از جمله هسته و ارگانها می شوند . شکل دانه دار آنها بخاطر وجود ساختارهای دانه دار کراتوهیالین است که حاوی کراتین می باشند.

6-2-1- لایه شفاف Stratum lucidum

در این لایه هسته سلولها تجزیه شده و کراتینه شدن سلولها ادامه پیدا می کند . همراه آن تغییرات مورفولوژیکی بیشتری جهت مسطح شدن سلولها حادث می گردد . گاهی قطرات چربی نیز در این لایه دیده می شود که احتمالاً ناشی از تجزیه لیزوزوم ها می باشد . ضخامت پوست در قسمتهای مختلف به این لایه مربوط می شود.

7-2-1- Stratum comun

این لایه آخرین محصول تمایز سلولهای اپیدرمی می باشد . معمولاً این لایه از 10 تا 15 ردیف سلول با ضخامت **10µm** تشکیل شده در اپیدرم زنده ضخیم ترین حالت این لایه در کف دست و پا و نازکترین حالت آن در لبها یافت می شود . این دو لایه نازک حاوی سلولهای مرده ، بدون هسته ،

کراتینه شده و فرو رفته در ماتریکسی از چربی هستند .
 نقش این لایه کنترل از دست دادن آب و جلوگیری از ورود
 مواد مضر مثل میکروارگانیسم ها می باشد. سلولهای کراتینی
 این لایه شبیه خشت های آجری در ساروجی از لیپیدهای دو
 لایه ای جداسازی شده اند. سلولهای کراتینوسیت چند ضلعي
 کشیده و نسبتاً پهن بوده و حدود $0/2-1/5\mu\text{m}$ ضخامت دارند
 بطورکلی طول عمر يك سلول دختر که از لایه بازال شروع به
 تمایز می کند تا به این لایه برسد 14 روز در نظر گرفته
 شده است. تا در این لایه تا زمان ریزش، سلولها روزهای
 بیشتری را سپری می کنند. کراتینوسیت ها در این مرحله
 کوزئوسیت نامیده می شوند. سطح طبیعی این لایه به اجزاء
 مهم موجود در آن بستگی دارد که شامل 80% - 75% پروتئین،
 15% - 5% چربی و 10% - 5% مواد ناشناخته می باشد. 70% این
 پروتئینها آلفاکراتین، 10% بتاکراتین و 5% پروتئین
 پوشش سلولي است آنزیمها و دیگر پروتئینها نیز 15%
 باقیمانده را تشکیل می دهند. پروتئین پوشش سلولي تقریباً
 غیرقابل حل بوده در برابر حالات شیمیایی بسیار مقاوم
 هستند (3-9).

3-1- انواع تومور های پوستی:

1-3-1- تومورهای بد خیم

Squamous cell carcinoma

بر اثر تابش پدیدار می شود و از BCC سریعتر رشد کرده و
 زخم می شود. بررسی تاریخچه آسیب شناسی دقیقی جهت افتراق
 بین این دو کارسینوما لازم است. هر دو اثر در معرض قرار
 گرفتن شدید اشعه خورشید ایجاد شده و تغییرات رنگدانه ای
 خالدار را نشان می دهد. رنگ زخم آن متمایل به زرد بوده
 و لایه دوم آن الاستیک شده و در آن آتروفی پدید می آید.
 این زخمها خشن، ناهموار و خشک بوده و جراحیهای فلس دار