



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته علوم تشریحی

عنوان:

بررسی اثرات سیتوتوکسیک ترکیب دارویی متفورمین،

دوسه تاکسل و ۵-فلورواوراسیل بر سلولهای سرطان

معدده (AGS)

اساتید راهنما:

دکتر نوروز نجف زاده - دکتر محمد قاسم گل محمدی

اساتید مشاور:

دکتر رامین سلیم نژاد - دکتر فرهاد جدی

نگارش: مریم فاتحی اقدام

تاریخ دفاع: تابستان ۹۸

شماره‌ی پایان نامه: ۰۵۱

صلى الله عليه وسلم

شکر شایان نثار ایزد منان که توفیق راهم ساخت تا این رساله را به پایان برسانم.

به پاس تعبیر عظیم و انسانی شان از کلمه ایثار و از خودگذشتگی،
و به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند، این رساله را تقدیم
می کنم به :

پدر و مادرم

که از نگاهشان صلابت

از رفتارشان محبت

و از صبرشان ایستادگی را آموختم...

به استاد گرانقدرم جناب آقای دکتر نجف زاده که سرای علم و دانش را با راهنمایی
های کار ساز و سازنده بارور ساختند...

به خانواده عزیزم که وجودشان شوق زیستن و صبرشان مایه پشتکار من است. به
ویژه خواهر عزیزتر از جانم که بیش از همه و پیش از همگان این اثر را مدیون
شان هستم. بی شک اگر همکاری و همدلی شان نبود این اثر با این فرجام به
انجام نمی رسید. حضور مهربانش را در برگ برگ این دفتر به تماشا می نشینم...

و تقدیم به روح پاک همکلاسی های عزیزم ، نسیم ناصری و سلمان محمدی نسب که
از خاک دل کردند تا به افلاک برسند. یادها ، اندیشه ها و خاطراتشان پیوسته با من
خواهد بود...

تشکر و قدر دانی

سپاس بی کران پروردگار یکتا را که هستی مان بخشید و به طریق علم و دانش رهنمونمان شد و به همنشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت. آفریدگاری که خویشتن را به ما شناساند و درهای علم را بر ما گشود و عمری و فرصتی عطا فرمود تا بدان، بنده ضعیف خویش را در طریق علم و معرفت بیازماید.

سپاس و قدردانی ویژه از استاد فاضل و گرانقدر، جناب آقای دکتر نوروز نجف زاده دارم که به دلیل از خودگذشتگی و با یاریها و راهنماییهای بی چشمداشت که بسیاری از سختیها را برایم آسانتر نمودند و همواره با سعه صدر راهنمای من بودند. بدین وسیله از بزرگواری، حسن سلوک و حمایت بی دریغ ایشان تشکر و قدردانی می نمایم. سپاس از استادان گرانقدرم، دکتر محمد قاسم گل محمدی، دکتر رامین سلیم نژاد و دکتر فرهاد جدی که از همکاری و راهنماییهای علمی شان بهره جستهم. سپاس از اساتید گرانقدر دکتر محمدماذنی، دکتر کیوان امیرشاهرخی و استاد ودود ملک زاده که داروری این رساله را متقبل شدند.

سپاس از دوستان عزیزم خانم ها دکترهااله مکبر، ندا حسینعلی، سحر صبور، که همواره نگارنده را مورد لطف و محبت خود قرار دادند و وجودشان شادی بخش و صفایشان مایه آرامش بود. همچنین سپاس ویژه تقدیم می کنم به آقایان اقبال متولی باشی، علی محمدی، محمد نعمتیان و یاور محبی که بی دریغ یاریم کردند و امیدم را چندبرابر... و در پایان از کلیه کارکنان آزمایشگاه و تمام کسانی که در پیشبرد این رساله همکاری کردند سپاسگذارم.

مریم فاتحی اقدام

بررسی اثرات سیتوتوکسیک ترکیب دارویی متفورمین، ۵-فلوروراسیل و دوسه تاکسل روی سلولهای سرطان معده (AGS)

چکیده

سابقه و هدف: تاکنون ترکیب های دارویی زیادی بر علیه سرطان معده استفاده شده است. علی الرغم استفاده از داروهای شیمی درمانی ۵- فلوروراسیل و دوسه تاکسل، مقاومت دارویی در برخی از سرطان ها در حال افزایش می باشد. متفورمین در ترکیب با داروهای شیمی درمانی رایج می تواند در درمان سرطان معده موثر واقع شود. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر سمیت ترکیب متفورمین و دوسه تاکسل و ۵-فلوروراسیل بر روی سلولهای سرطانی رده AGS معده انجام شده است.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، سلولهای سرطان معده در محیط RPMI1640 و در ۱۰ درصد سرم گاوی کشت داده شدند و برای بررسی سمیت سلولی، سلولها تحت تاثیر غلظت های مختلف متفورمین (۱ تا ۸۰ میلی مولار)، دوسه تاکسل (۰.۶ - ۲۲.۵ نانومول) و ۵-فلوروراسیل (۰.۰۴۵-۱۲ میکروگرم بر میلی لیتر) قرار گرفتند. سپس تکثیر سلولی با روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت و بعد از تعیین IC₅₀، آپوپتوز سلولی با روش آکریدین اورنج/اندیوم بروماید مورد ارزیابی قرار گرفت. تکنیک های ایمونوسیتوشیمی به منظور بررسی بیان پروتئین Shh و کلونوزنیک برای بررسی تأثیر گروه های دارویی بر توانایی تشکیل کلونی استفاده شد.

یافته ها: بررسی نتایج نشان داد که متفورمین و داروهای دوسه تاکسل و ۵- فلوروراسیل به صورت وابسته به غلظت و زمان اثرات سمیت سلولی داشتند و بعد از تیمار سلولها با ترکیب متفورمین/دوسه تاکسل و متفورمین/۵-فلوروراسیل میزان IC₅₀ به صورت معنی داری کاهش یافت ($p < 0.05$). به طوری که با توجه به شاخص ترکیبی (CI)، ترکیب متفورمین/دوسه تاکسل و متفورمین/۵-فلوروراسیل در مقایسه با تیمار به تنهایی اثر سینرژسم بر روی سلول های AGS دارد. بعد از تیمار سلولها با ترکیب های دارویی فوق میزان آپوپتوز سلولی به طور قابل توجه و معنی داری در مقایسه با تیمار به تنهایی افزایش یافت ($P < 0.05$). ارزیابی ایمونوسیتوشیمی نشان داد که در گروه های تیمار شده تعداد سلول های بیان کننده پروتئین Shh نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافت. همچنین نتایج نشان داد که تعداد کلنی ها در تیمار ترکیبی سلولهای AGS با متفورمین در مقایسه با استفاده به تنهایی ۵-فلوروراسیل و دوسه تاکسل کاهش قابل ملاحظه ای داشته است.

نتیجه گیری: یافته های این مطالعه نشان داد که استفاده از ترکیب متفورمین با دوسه تاکسل و ۵- فلوروراسیل می تواند در درمان بیماران مبتلا به سرطان معده موثر واقع بشود.

واژگان کلیدی: متفورمین - دوسه تاکسل - ۵- فلوروراسیل - سرطان معده - آپوپتوز - Shh

عنوان:

صفحه

فصل اول، طرح تحقیق.....	۱
۱-۱ مقدمه و بیان مساله	۲
۲-۱ تعریف واژگان کلیدی	۶
سرطان	۶
۵-فلوروووراسیل	۶
دوسه تاکسل	۶
متفورمین	۶
AGS	۶
۳-۱ اهداف:	۷
۱-۳-۱ هدف کلی	۷
۱-۳-۲ اهداف اختصاصی	۷
۳-۳-۱ اهداف کاربردی	۷
۴-۱ فرضیات یا سوالات تحقیق:	۸
فصل دوم: پیشینه ی تحقیق.....	۹
۱-۲ سرطان	۱۰
۲-۲ سرطان معده	۱۱
۳-۲ طبقه بندی سرطان معده	۱۲
۴-۲ اپیدمیولوژی	۱۴
۵-۲ اتیولوژی	۱۵
۶-۲ عوامل خطر ساز سرطان معده	۱۷
۷-۲ غربالگری سرطان	۱۸
۸-۲ تظاهرات بالینی آدنوکارسینوم معده	۱۸
۹-۲ فلوروووراسیل	۲۱
۱۰-۲ دو سه تاکسل	۲۳

۲۵.....	۱۱-۲ متفورمین.....
۲۹.....	۱۲-۲ سیگنالینگ Shh و اهمیت آن
۲۹.....	۱-۱۲-۲ Shh و سلول‌های بیان کننده‌ی آن
۲۹.....	۲-۱۲-۲ Shh و نقش آن در سرطان معده
۳۰.....	۲-۱۳ مطالعات جهان
۳۴.....	فصل سوم: شیوه اجرای طرح.....
۳۵.....	۳-۱ نوع پژوهش
۳۵.....	۳-۲ ملاحظات اخلاقی
۳۵.....	۳-۳ مکان و زمان انجام مطالعه
۳۵.....	۳-۴ روش گردآوری اطلاعات.....
۳۶.....	۳-۵ داروها
۳۶.....	۳-۶ فهرست تجهیزات آزمایشگاهی مورد استفاده
۳۷.....	۳-۷ فهرست وسایل و ظروف آزمایشگاهی مورد استفاده
۳۸.....	۳-۸ فهرست مواد، ترکیبات شیمیایی مورد استفاده در تحقیق
۳۹.....	۳-۹ روش تهیه مواد استفاده شده در تحقیق.....
۳۹.....	۱-۹-۳ روش تهیه ۱ لیتر محیط کشت RPMI-1640.....
۳۹.....	۲-۹-۳ روش تهیه ۱ لیتر محلول PBS(1X).....
۳۹.....	۳-۹-۳ روش تهیه ۱ ترپسین-EDTA.....
۴۰.....	۴-۹-۳ روش تهیه ۱ رنگ MTT.....
۴۰.....	۵-۹-۳ روش تهیه ۱ محلول پارافرمالدهید ۴٪.....
۴۱.....	۶-۹-۳ روش تهیه ۱ یک لیتر محلول TBS (10X , 1X).....
۴۱.....	۷-۹-۳ روش تهیه ۱ ۲۰۰ میلی لیتر محلول Blocking یا TBS ⁺⁺ برای ایمونوسیتوشیمی
۴۲.....	۳-۱۰ روش کار.....
۴۲.....	۱-۱۰-۳ کشت سلولی.....
۴۲.....	۲-۱۰-۳ فریز کردن.....
۴۲.....	۳-۱۰-۳ بازیافت فریز و کشت آن

۴۳ ۳-۱۰-۴ نحوه‌ی پاساژ دادن سلول ها
۴۳ ۳-۱۰-۵ تعویض محیط کشت سلول
۴۴ ۳-۱۰-۶ روش MTT
۴۶ ۳-۱۰-۷ روش رنگ آمیزی آکریدین اورنج/تیدیوم بروماید
۴۷ ۳-۱۰-۸ ایمونوسیتوشیمی
۴۷ ۳-۱۰-۸-۱ کشت و تیمار سلول
۴۸ ۳-۱۰-۸-۲ محلول سازی
۴۸ ۳-۱۰-۸-۳ رقیق سازی آنتی بادی
۴۸ ۳-۱۰-۸-۴ طریقه‌ی انجام تکنیک ایمونوسیتوشیمی
۴۹ ۳-۱۰-۹ روش کلونوزنیک
۵۱ ۳-۱۱ آنالیز آماری
۵۲ فصل چهارم: نتایج
۵۳ ۴-۱ کشت سلول های AGS
۵۳ ۴-۲ تاثیر غلظت های مختلف ۵-فلورو اوراسیل و دوسه تاکسل و گروه ترکیبی با متفورمین بر میزان حیات سلول های AGS
۵۸ ۴-۳ نتایج تکنیک آکریدین اورنج/تیدیوم بروماید
۶۲ ۴-۴ بررسی بیان پروتئین Shh با تکنیک ایمونوسیتوشیمی
۶۶ ۴-۵ بررسی نتایج حاصل از کلونوزنیک
۶۹ فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری
۷۰ ۵-۱ بحث
۷۸ ۵-۲ نتیجه گیری
۷۹ ۵-۳ محدودیت ها
۸۰ ۵-۴ پیشنهادات
۸۱ ۵-۵ منابع

فهرست جداول

صفحه

عنوان

جدول ۱-۴	مقادیر IC_{50} توسط سنجش MTT پس از تیمار سلول‌های AGS (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) با غلظت‌های مختلف دو سه تاکسل و ۵-فلوروووراسیل به تنهایی و در ترکیب با غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میلی مولار متفورمین	۵۶
جدول ۲-۴	شاخص ترکیبی برای متفورمین و ۵-فلوروووراسیل در رده سلولی AGS	۵۷
جدول ۳-۴	شاخص ترکیبی برای متفورمین و دو سه تاکسل در رده سلولی AGS	۵۷
جدول ۴-۴	درصد سلول‌های آپوپتوتیک در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های مشخص شده دو سه تاکسل و ۵-فلوروووراسیل	
	به تنهایی و در ترکیب با غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میلی مولار متفورمین بر اساس رنگ آمیزی آکریدین اورنج/تیدیوم بروماید بر روی رده سلولی AGS	۵۹

فهرست تصاویر

عنوان	صفحه
تصویر ۱-۲ ساختار ۵-فلورواوراسیل	۲۲
تصویر ۲-۲ ساختار دوسه تاکسل	۲۴
تصویر ۲-۳ ساختار متفورمین	۲۶
تصویر ۲-۴ مکانیسم عملکرد متفورمین براساس دو مسیر غیر مستقیم (وابسته به انسولین) و مستقیم (غیر وابسته به انسولین) ..	۲۸
تصویر ۱-۴ سلولهای AGS	۵۳
تصویر ۲-۴ آنالیز سمیت سلولی غلظت های مختلف دو سه تاکسل و ۵-فلورواوراسیل به تنهایی در مقایسه با تیمار ترکیبی با غلظت های ۲۰ و ۴۰ میلی مولار متفورمین بر رده سلولی AGS	۵۵
تصویر ۳-۴ تاثیر غلظت های مختلف متفورمین و دوسه تاکسل و تیمار ترکیبی آن ها با استفاده از رنگ آمیزی آکریدین اورنج	
/اتیديوم برومايد بر رده سلول AGS	۶۰
تصویر ۴-۴ تاثیر غلظت های مختلف ۵-فلورواوراسیل و تیمار ترکیبی آن با متفورمین با استفاده از رنگ آمیزی آکریدین اورنج/اتیديوم برومايد بر رده سلول AGS	۶۱
تصویر ۴-۵ تصاویر تکنیک ایمونوسیتوشیمی در بیان پروتئین Shh در سلول های AGS تیمار شده با غلظت های مختلف متفورمین	۶۳
تصویر ۴-۶ تصاویر تکنیک ایمونوسیتوشیمی در بیان پروتئین Shh در سلول های AGS تیمار شده با غلظت های مختلف ۵-فلورواوراسیل به تنهایی و در ترکیب با غلظت های ۲۰ و ۴۰ میلی مولار متفورمین	۶۴
تصویر ۴-۷ تصاویر تکنیک ایمونوسیتوشیمی در بیان پروتئین Shh در سلول های AGS تیمار شده با غلظت های مختلف دو سه تاکسل به تنهایی و در ترکیب با غلظت های ۲۰ و ۴۰ میلی مولار متفورمین	۶۵
تصویر ۴-۸ تصاویر نشان دهنده کلنی های تشکیل شده به وسیله سلول های AGS پس از گذشت ۱۰ روز از تیمار به تنهایی متفورمین، ۵-فلورواوراسیل و دوسه تاکسل همراه با منحنی	۶۷
تصویر ۴-۹ تصاویر نشان دهنده کلنی های تشکیل شده به وسیله سلول های AGS پس از گذشت ۱۰ روز از تیمار ترکیبی متفورمین با داروهای ۵-فلورواوراسیل و دوسه تاکسل همراه با منحنی	۶۸

فهرست نمودارها

صفحه	عنوان
۴۵	فرمول ۳-۱ محاسبه‌ی بقاء سلولی.....
۴۵	فرمول ۳-۲ محاسبه‌ی شاخص ترکیبی.....
۶۳	نمودار ۴-۱ درصد سلول‌های AGS بیان کننده‌ی پروتئین shh با غلظت های مختلف متفورمین در تکنیک ایمنوسیتوشیمی.....
۶۳	نمودار ۴-۲ درصد سلول‌های بیان کننده‌ی پروتئین shh با غلظت های ۵-فلورو اوراسیل به تنهایی و در ترکیب با متفورمین در تکنیک ایمنوسیتوشیمی.....
۶۴	نمودار ۴-۳ درصد سلول‌های بیان کننده‌ی پروتئین shh با غلظت های دو سه تاکسل به تنهایی و در ترکیب با متفورمین در تکنیک ایمنوسیتوشیمی.....
۶۵	تکنیک ایمنوسیتوشیمی.....

فهرست علائم اختصاری:

DMSO: Dimethyl Sulfoxide

EDTA: EthyleneDiamineTetraacetic Acid

IC₅₀: The half maximal inhibitory concentration

mM: milli Molar

ng: nano gram

nM: nano Molar

PBS: Phospat Buffer Saline

Pm: pico Molar

SHH: Sonic Hehgehog

UV: UltraViolet

µg: micro gram

5-FU: 5-Fluorouracil