



دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه دکتراى حرفه ای رشته پزشکی

عنوان:

بررسی اثر اولوروپین بر روی رده های سلولی سرطان معده (AGS، MKN-45 و

(KATO III

نگارش:

حسام دانش

استاد راهنما:

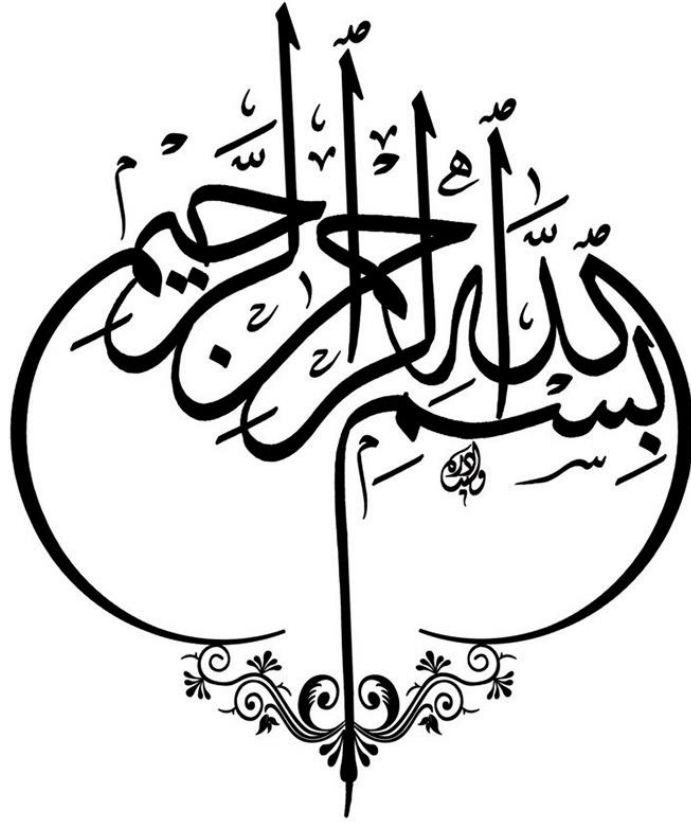
دکتر الهام صفرزاده

استاد مشاور:

دکتر نسرين فولادی

شهریور ماه ۱۴۰۱

شماره پایان نامه: ۰۹۳۰



گواهی اصالت پایان نامه

بسمه تعالی

بدین وسیله اعلام می‌نماید که این پایان نامه بر اساس نتایج بررسی‌ها/ تحقیقات انجام یافته توسط اینجانب بوده و به وسیله خودم انشاء گردیده است و قبلاً به عنوان پایان نامه در سایر مقاطع و دوره‌های تحصیلی ارایه نگردیده است.

بدین وسیله اصالت (ORIGINALITY) و صحت نتایج این پایان نامه مورد تایید اینجانب، استاد راهنما می‌باشد.

به پاس تعبیر عظیم و انسانی شان از کلمه ایثار و از خودگذشتگان
به پاس عاطفه سرشار و گرمای امیدبخش وجودشان که در این
سردترین روزگاران بهترین پشتیبان است;
به پاس قلب‌های بزرگشان که فریادرس است و سرگردانی و ترس در
پناهمان به شجاعت می‌گراید;
و به پاس محبت‌های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی‌کند;
این مجموعه را به پدر و مادر عزیزم تقدیم می‌کنم.

سپاس‌گزاری

بر خود واجب می‌دانم از استاد راهنما سرکار خانم دکتر صفرزاده
که به عنوان استاد راهنما در مراحل مختلف این پایان‌نامه همواره با
سعه صدر و گشاده رویی در کنار من بودند و در طول مدت تحصیل
از راهنمایی‌های اخلاقی و علمی ایشان بهره‌جسته‌ام تشکر و قدردانی
نمایم.

فهرست اختصارات:

5-FU: 5- Fluorouracil

AGS cell line: A human gastric adenocarcinoma cell-line

BCL2: B-cell lymphoma 2

DAPI: DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) is a blue-fluorescent DNA stain that exhibits ~20-fold enhancement of fluorescence upon binding to AT regions of dsDNA.

DNA: deoxyribonucleic acid

GIST: A gastrointestinal stromal tumor

HER2: human epidermal growth factor receptor 2

KATO III cell line: A human gastric carcinoma cell line

MALT Lymphoma: mucosa-associated lymphoid tissue

MKN-45 cell line: A high-potential peritoneal dissemination gastric cancer cell line

MMP-13: Matrix Metalloproteinase 13

MTT:3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

PBS: Phosphate-buffered saline

qRT-PCR: Quantitative Real-time PCR

RNA: Ribonucleic acid

Rpm: revolutions per minute

miRNA: MicroRNA

VCAM-1: vascular cell adhesion molecule 1

فهرست مندرجات و ضمایم

صفحه

عنوان

۲	فصل اول: مقدمه
۳	۱-۱- مقدمه و بیان مسئله:
۶	۱-۲- اهداف طرح:
۶	۱-۲-۱- هدف کلی طرح:
۶	۱-۲-۲- اهداف اختصاصی طرح:
۷	۱-۳- فرضیات طرح:
۷	۱-۴- تعریف واژه های اختصاصی:
۹	فصل دوم: بررسی متون
۱۰	۲-۱- کلیات:
۱۰	۲-۱-۱- ادنوکارسینوم معده:
۱۰	۲-۱-۲-۱- میزان بروز و اپیدمیولوژی:
۱۱	۲-۱-۲-۲- آسیب شناسی:
۱۲	۲-۱-۲-۳- سبب شناسی:
۱۴	۲-۱-۲-۴- تظاهرات بالینی:
۱۵	۲-۱-۲-۵- تشخیص:
۱۵	۲-۱-۲-۶- درمان آدنوکارسینوم معده:
۱۷	۲-۱-۳- لنفوم اولیه معده:
۱۸	۲-۱-۳-۱- درمان لنفوم اولیه معده:
۱۹	۲-۱-۴- سارکوم غیرلنفوئید معده:
۲۰	۲-۱-۵- اولوروپین:
۲۱	۲-۱-۵-۱- مکانیزم ضدسرطانی:

۲۲	پیشینه تحقیق:
۲۶	فصل سوم: مواد و روش کار
۲۷	۳-۱- نوع مطالعه:
۲۷	۳-۲- جامعه آماری و روش نمونه گیری:
۲۷	۳-۳- متغیرها:
۲۸	۳-۴- روش تجزیه و تحلیل داده ها و بررسی آماری:
۲۸	۳-۵- ملاحظات اخلاقی:
۲۸	۳-۶- متدولوژی مطالعه:
۳۰	۳-۷- طرح مطالعه:
۳۱	۳-۷-۱- آماده سازی محیط کشت RPMI 1640
۳۱	۳-۷-۲- شمارش و تعیین درصد سلول های زنده جدا شده به روش Dye Exclusion ..
۳۲	۳-۷-۳- تست MTT جهت تعیین IC50 دوز مناسب اولوروپین
۳۲	۳-۷-۴- بررسی آپتوز سلولی با تکنیک رنگ آمیزی DAPI
۳۳	۳-۷-۵- بررسی آپتوز به روش Annexin-V با دستگاه فلوسیتومتری
۳۳	۳-۷-۶- تست بهبود زخم جهت بررسی مهاجرت و متاستاز سلولی
۳۴	۳-۷-۷- بررسی بیان ژن های هدف با استفاده از RT-PCR
۳۴	۳-۷-۸- استخراج RNA
۳۶	۳-۷-۹- سنتز c-DNA
۳۷	۳-۷-۹-۱- مراحل آماده سازی مواد و انجام واکنش سنتز c-DNA
۳۸	۳-۷-۱۰- Real Time PCR
۳۸	۳-۷-۱۰-۱- دستگاه مخصوص PCR و سیستم کامپیوتری متصل به دستگاه
۴۰	۳-۷-۱۱- ژن های مورد بررسی در این مطالعه
۴۱	۳-۸- روش جمع آوری اطلاعات و ابزار های مورد استفاده:
۴۲	فصل چهارم: نتایج

۴-۱- میزان مهار رشد رده‌های سلولی سرطان معده پس از تیمار با اولوروپین با روش MTT	۴۳
۴-۲- میزان مهاجرت و متاستاز سلول های سرطانی بعد از تیمار با اولوروپین بوسیله تکنیک Wound healing assay	۴۶
۴-۳- میزان آپاپتوز سلول های سرطانی بعد از تیمار با اولوروپین بوسیله تکنیک رنگ آمیزی DAPI	۴۷
۴-۴- میزان بیان ژنهای هدف در رده سلولی KATO III تیمار شده با اولوروپین در مقایسه با گروه کنترل	۴۹
۴-۵- میزان بیان ژنهای هدف در رده سلولی AGS تیمار شده با اولوروپین در مقایسه با گروه کنترل	۵۷
۴-۶- میزان بیان ژنهای هدف در رده سلولی MKN-45 تیمار شده با اولوروپین در مقایسه با گروه کنترل	۶۵
۴-۷- میزان آپاپتوز سلول های سرطانی بعد از تیمار با اولوروپین بوسیله فلوسیتومتری	۷۳
فصل پنجم: بحث	۷۶
۵-۱- تفسیر نتایج و مقایسه با سایر مطالعات:	۷۷
۵-۲- محدودیت های طرح:	۸۲
۵-۳- نتیجه گیری کلی:	۸۳
۵-۴- پیشنهادات:	۸۴
ششم: منابع	۸۵

فهرست جداول، اشکال و نمودارها

۲۰	تصویر ۱-۲. ساختار مولکولی اولوروپین.....
۲۱	تصویر ۲-۲. مسیرهای سیگنالینگ متاثر از اولوروپین.....
۲۷	جدول ۱-۳. جدول متغیرات.....
۳۷	جدول ۲-۳: مقادیر و مواد لازم جهت سنتز اختصاصی cDNA.....
۳۷	جدول ۳-۳: شرایط دمایی واکنش سنتز cDNA.....
۳۹	جدول ۴-۳: مقادیر و مواد لازم برای انجام Real time PCR.....
۳۹	جدول ۵-۳: شرایط دمایی واکنش Real-time PCR.....
۴۰	جدول ۶-۳: توالی ژن های مورد استفاده در این مطالعه.....
	نمودار ۱-۴: میزان مهار رشد رده سلولی KATO III پس از تیمار با اولوروپین با
۴۳	روش MTT.....
	نمودار ۲-۴: میزان مهار رشد رده سلولی MKN-45 پس از تیمار با اولوروپین با
۴۴	روش MTT.....
	نمودار ۳-۴: میزان مهار رشد رده سلولی AGS پس از تیمار با اولوروپین با روش
۴۵	روش MTT.....
	نمودار ۴-۴: مهاجرت و متاستاز سلول های سرطانی بعد از تیمار با اولوروپین
۴۶	بوسیله تکنیک Wound healing assay.....
	نمودار ۵-۴: میزان آپاپتوز سلول های سرطانی بعد از تیمار با اولوروپین بوسیله
۴۷	تکنیک رنگ آمیزی با DAPI.....
	نمودار ۶-۴: میزان بیان ژنهای هدف در رده سلولی KATO III تیمار شده با
۴۹	اولوروپین در مقایسه با گروه کنترل.....
	نمودار ۷-۴: میزان بیان ژن BCL2 در رده سلولی KATO III تیمار شده با
۵۰	اولوروپین در مقایسه با گروه کنترل.....

- نمودار ۴-۸ : میزان بیان ژن **Cas3** در رده سلولی **KATO III** تیمار شده با اولوروپین در مقایسه با گروه کنترل..... ۵۱
- نمودار ۴-۹ : میزان بیان ژن **E-Cadherin** در رده سلولی **KATO III** تیمار شده با اولوروپین در مقایسه با گروه کنترل..... ۵۲
- نمودار ۴-۱۰ : میزان بیان ژن **MMP-13** در رده سلولی **KATO III** تیمار شده با اولوروپین در مقایسه با گروه کنترل..... ۵۳
- نمودار ۴-۱۱ : میزان بیان ژن **P53** در رده سلولی **KATO III** تیمار شده با اولوروپین در مقایسه با گروه کنترل..... ۵۴
- نمودار ۴-۱۲ : میزان بیان ژن **VCAM-1** در رده سلولی **KATO III** تیمار شده با اولوروپین در مقایسه با گروه کنترل..... ۵۵
- نمودار ۴-۱۳ : میزان بیان ژن **Vimentin** در رده سلولی **KATO III** تیمار شده با اولوروپین در مقایسه با گروه کنترل..... ۵۶
- نمودار ۴-۱۴ : میزان بیان ژنهای هدف در رده سلولی **AGS** تیمار شده با اولوروپین در مقایسه با گروه کنترل..... ۵۷
- نمودار ۴-۱۵ : میزان بیان ژن **BCL2** در رده سلولی **AGS** تیمار شده با اولوروپین در مقایسه با گروه کنترل..... ۵۸
- نمودار ۴-۱۶ : میزان بیان ژن **Cas3** در رده سلولی **AGS** تیمار شده با اولوروپین در مقایسه با گروه کنترل..... ۵۹
- نمودار ۴-۱۷ : میزان بیان ژن **E-Cadherin** در رده سلولی **AGS** تیمار شده با اولوروپین در مقایسه با گروه کنترل..... ۶۰
- نمودار ۴-۱۸ : میزان بیان ژن **MMP-13** در رده سلولی **AGS** تیمار شده با اولوروپین در مقایسه با گروه کنترل..... ۶۱
- نمودار ۴-۱۹ : میزان بیان ژن **P53** در رده سلولی **AGS** تیمار شده با اولوروپین در مقایسه با گروه کنترل..... ۶۲

- نمودار ۴-۲۰ : میزان بیان ژن VCAM-1 در رده سلولی AGS تیمار شده با اولوروپین در مقایسه با گروه کنترل ۶۳
- نمودار ۴-۲۱ : میزان بیان ژن Vimentin در رده سلولی AGS تیمار شده با اولوروپین در مقایسه با گروه کنترل ۶۴
- نمودار ۴-۲۲ : میزان بیان ژنهای هدف در رده سلولی MKN-45 تیمار شده با اولوروپین در مقایسه با گروه کنترل ۶۵
- نمودار ۴-۲۳ : میزان بیان ژن BCL2 در رده سلولی MKN-45 تیمار شده با اولوروپین در مقایسه با گروه کنترل ۶۶
- نمودار ۴-۲۴ : میزان بیان ژن Cas3 در رده سلولی MKN-45 تیمار شده با اولوروپین در مقایسه با گروه کنترل ۶۷
- نمودار ۴-۲۵ : میزان بیان ژن E-Cadherin در رده سلولی MKN-45 تیمار شده با اولوروپین در مقایسه با گروه کنترل ۶۸
- نمودار ۴-۲۶ : میزان بیان ژن MMP-13 در رده سلولی MKN-45 تیمار شده با اولوروپین در مقایسه با گروه کنترل ۶۹
- نمودار ۴-۲۷ : میزان بیان ژن P53 در رده سلولی MKN-45 تیمار شده با اولوروپین در مقایسه با گروه کنترل ۷۰
- نمودار ۴-۲۸ : میزان بیان ژن VCAM-1 در رده سلولی MKN-45 تیمار شده با اولوروپین در مقایسه با گروه کنترل ۷۱
- نمودار ۴-۲۹ : میزان بیان ژن Vimentin در رده سلولی MKN-45 تیمار شده با اولوروپین در مقایسه با گروه کنترل ۷۲
- نمودار ۴-۳۰ : میزان آپاپتوز رده سلولی KATO III بعد از تیمار با اولوروپین بوسیله تکنیک فلوسیتومتری ۷۳
- نمودار ۴-۳۱ : میزان آپاپتوز رده سلولی AGS بعد از تیمار با اولوروپین بوسیله تکنیک فلوسیتومتری ۷۴

نمودار ۴-۳۲: میزان آپايتوز رده سلولى MKN-45 بعد از تيمار با اولوروپين

بوسيله تكنيك فلوسيتومتري..... ۷۵

-

بررسی اثر اولوروپین بر روی رده های سلولی سرطان معده (AGS، MKN-45 و KATO III)

چکیده:

زمینه: سرطان معده یکی از شایع ترین بدخیمی ها در سراسر جهان می باشد که فراوانی آن در کشورهای آسیایی به طور معناداری بیشتر از سایر مناطق گزارش شده است. مطالعات متعددی به بررسی خواص ضد سرطانی اولوروپین در بدخیمی های مختلف پرداخته اند.

هدف: ما نیز طی پژوهش حاضر اثرات ضد سرطانی مواجهه با اولوروپین را در رده های سلولی سرطان انسانی مورد بررسی قرار داده ایم.

مواد و روش ها: طی این مطالعه از سه رده سلولی AGS، KATO III، MKN-45 استفاده شد. سلول ها در بازه های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و در غلظت های مختلف تیمار شدند. میزان آپوپتوز سلولی به وسیله آزمون MTT، میزان IC50 در بازه های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، میزان مهاجرت و متاستاز سلولی با استفاده از تکنیک بهبود زخم و در نهایت میزان بیان BCL2، Caspase3، E-cadherin، MMP-13، P53، VCAM-1 و Vimentin در هر سه رده سلولی مورد مطالعه بررسی شد.

یافته ها: نتایج آزمون های انجام شده نشان دهنده افزایش چشمگیر میزان آپوپتوز در هر سه رده سلولی به دنبال تیمار با اولوروپین در مقایسه با گروه کنترل بود. پس از آزمایش بهبود زخم نیز کاهش مهاجرت سلول ها پس از مواجهه با اولوروپین مشهود بود. با افزایش مدت زمان انکوباسیون میزان حداقل غلظت جهت به نصف رساندن رشد سلولی در هر سه رده سلولی کاهش داشت. نتایج RT-PCR نشان دهنده افزایش بیان Cas-3، E-cadherin و P53 و کاهش بیان BCL2 و MMP-13 در هر سه رده سلولی بود.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان دهنده تاثیرات مثبت اولوروپین جهت سرکوب سلول های سرطانی، القاء آپوپتوز، مهار مهاجرت سلولی و در نهایت تاثیرات چشمگیر بر روی بیان انکوژن های مختلف بود. لذا می توان از این ترکیب بعنوان یک گزینه کاربردی جهت بررسی های بیشتر در بالین استفاده نمود.

واژگان کلیدی: اولوروپین، سرطان معده، AGS، KATO III، MKN-45