دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

**دانشگاه علوم پزشکی اردبیل**

# دانشکده پزشکی

**پایان نامه جهت اخذ درجهٔ دکترای حرفه ای رشته پزشکی**

**عنوان: بررسی تأثیر کورکومین بر روی بیان miR-708 و miR-383 و ژن‌های هدف این میرناها در سلول‌های بنیادی $CD44^+$ و غیر بنیادی $CD44^-$ جدا شده از رده سلولی سرطان پروستات PC3**


**نگارش:**

**رضا پناهی زاده**

**اساتید راهنما:**

**دکتر نوروز نجف‌زاده**

**دکتر امیراحمد عرب‌زاده**

**اساتید مشاور:**

**دکتر فرهاد جدی**

**دکتر کاظم نجاتی کشکی**


**شهریور ماه ۱۴۰۲**

**شماره پایان‌نامه: ۰۹۵۱**

## گواهی اصالت پایان‌نامه

بسمه‌تعالی

بدین‌وسیله اعلام می‌نماید که این پایان‌نامه بر اساس نتایج بررسی‌ها/ تحقیقات انجام‌یافته توسط اینجانب بوده و به‌وسیله خودم انشا گردیده است و قبلاً به‌عنوان پایان‌نامه در سایر مقاطع و دوره‌های تحصیلی ارائه نگردیده است.

بدین‌وسیله اصالت (ORIGINALITY) و صحت نتایج این پایان‌نامه مورد تأیید اینجانب، استاد راهنما می‌باشد.

تقدیم به

**مادر مهربانم،** قلبی که همواره برایم می‌تپد و همیشه مایه احساس آرامش و امنیتم بوده است؛ صدایی آرام و دلنشین که همیشه از زبانش عشق را می‌شنوم و غم را فراموش می‌کنم.

**پدرم بزرگوارم،** ستونی استوار که همیشه به جانبم ایستاده و به من اعتماد کرده است؛ آرامشی که با حضورش در کنارم، همیشه در دسترسم و در لحظات سخت دستگیرم بوده است.

**برادر عزیز و دوست‌داشتنی‌ام،** دوست و همراهی وفادار که با شوخ‌طبعی‌اش، همیشه به من لحظاتی از خنده و شادی هدیه می‌دهد و انرژی مثبتش، همیشه من را به جلو سوق داده است.

و در آخر تقدیم به **سمای من،** که تنها انگیزه و امیدواری و دلخوشی روزهای اخیر زندگی ام بوده است.

سپاس پروردگار را که مرا یاری رساند تا بتوانم مقطع تحصیلی دکتری حرفه‌ای را به پایان رسانده و گامی در راستای اعتلای علم بردارم.

از استاد راهنمای گرانقدرم جناب آقای **دکتر نوروز نجفزاده** که وجودشان همیشه قوتی برای انجام کارهایم بوده است و بدون شک انجام این پایان نامه بدون کمک و راهنمایی‌های ارزنده ایشان امکانپذیر نبوده است، کمال تشکر را دارم.

از اساتید بزرگوارم جناب آقایان **دکتر امیراحمد عرب زاده، دکتر فرهاد جدی و دکتر کاظم نجاتی کشکی** برای تمام حمایت‌ها و زحمات بی دریغشان سپاسگزاری می‌کنم.

از سرکار خانم **دکتر نرگس سوسنگر**، جناب آقای **دکتر محمدقاسم گلمحمدی** و جناب آقای **دکتر علی نیاپور** که زحمت داوری این رساله را به عهده داشتند سپاس فراوان دارم.

تشکر از تمامی معلمان اساتیدی که توفیق دانش آموزی و دانشجویی در محضرشان را داشتم.

از دوست عزیزم جناب آقای **دکتر محمدامین وطن خواه** که همراه همیشگی من بوده‌اند و اوقات خوشی را در کنار هم سپری کرده‌ایم، تقدیر و تشکر دارم.

و در پایان از تمامی عزیزانی که در طول انجام این پروژه مرا یاری کرده‌اند کمال تشکر و قدردانی را ابراز می‌نمایم.

# فهرست مقالات منتشر شده از پایان نامه

Panahizadeh, R., Vatankhah, M. A., Jeddi, F., Arabzadeh, A., Nejati-Koshki, K., Salimnejad, R., Najafzadeh, N. Cytotoxicity of curcumin against CD44± prostate cancer cells: Roles of miR-383 and miR-708. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 2023; (): -. doi: 10.22038/ajp.2023.21913

# فهرست مطالب


**چکیده:..... ۱**

**۱- مقدمه ..... ۴**

۱-۱- اهمیت موضوع و انگیزه تحقیق..... ۴

۱-۲- اهداف و فرضیات طرح ..... ۱۰

۱-۲-۱- هدف کلی طرح..... ۱۰

۱-۲-۲- اهداف اختصاصی طرح..... ۱۰

۱-۲-۳- فرضیات..... ۱۱

۱-۳- تعریف واژه های اختصاصی ..... ۱۱

**۲- مروری بر متون .....۱۵**

۲-۱- سرطان: ..... ۱۵

۲-۲- سرطان پروستات: ..... ۱۵

۲-۲-۱- میزان بروز و اپیدمیولوژی ..... ۱۵

۲-۲-۲- سبب شناسی و عوامل خطر سرطان پروستات..... ۱۶

۲-۲-۳- روند بروز و مرگ و میر سرطان پروستات ..... ۱۶

۲-۲-۴- تشخیص و درمان سرطان پروستات..... ۱۷

۲-۳- سلول های بنیادی سرطان..... ۱۸

۲-۳-۱- مارکر بنیادی CD44..... ۲۰

۲-۴- میرناها ..... ۲۱

۲-۴-۱- میرناها و سرطان..... ۲۱

۲-۴-۱-۱- میر۷۰۸..... ۲۳

۲-۴-۱-۲- میر۳۸۳..... ۲۴

۲-۵- کورکومین ..... ۲۶
۲-۵-۱- کورکومین و سلول های بنیادی ..... ۲۷
۲-۵-۲- کورکومین و میرناها ..... ۲۷
**۳- مواد و روش کار ..... ۳۰**
۳-۱- نوع پژوهش ..... ۳۰
۳-۲- مکان و زمان انجام مطالعه ..... ۳۰
۳-۳- فهرست تجهیزات آزمایشگاهی مورد استفاده ..... ۳۰
۳-۴- فهرست وسایل و ظروف آزمایشگاهی مورد استفاده ..... ۳۱
۳-۵- فهرست مواد، ترکیبات شیمیایی و کیت های آنزیمی مورد استفاده در تحقیق ..... ۳۳
۳-۶- رده سلولی ..... ۳۳
۳-۷- روش تهیه مواد استفاده شده در تحقیق ..... ۳۴
۳-۷-۱ روش تهیه ی ۱ لیتر محلول PBS (1X) ..... ۳۴
۳-۷-۲- روش تهیه ۱ لیتر محیط کشت RPMI 1640 ..... ۳۴
۳-۷-۳- روش تهیه ی تریپسین-EDTA ..... ۳۵
۳-۷-۴- نحوه تهیه بافر جدا کننده مورد استفاده در MACS ..... ۳۵
۳-۷-۵- روش تهیه ی رنگ MTT ..... ۳۵
۳-۷-۶- روش تهیه ی محلول DAPI با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر ..... ۳۶
۳-۷-۷- نحوه ی تهیه بافر EDTA (0.5M) ..... ۳۶
۳-۸- کشت سلولی ..... ۳۶
۳-۸-۱- نحوه ی پاساژ دادن سلول ها ..... ۳۷
۳-۸-۲- تعویض محیط کشت سلول ..... ۳۷
۳-۹- روش انجام تکنیک MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) ..... ۳۸

۳-۱۰- روش MTT ..... ۳۹
۳-۱۱- بررسی آپوپتوز سلولی با تکنیک رنگ آمیزی DAPI ..... ۴۱
۳-۱۲- بررسی بیان ژن های هدف با استفاده از RT-PCR ..... ۴۱
۳-۱۲-۱- استخراج RNA ..... ۴۲
۳-۱۲-۲- سنتز c-DNA ..... ۴۴
۳-۱۲-۲-۱- مراحل آماده سازی مواد و انجام واکنش سنتز c-DNA ..... ۴۴
۳-۱۲-۳- Real Time PCR ..... ۴۶
۳-۱۲-۳-۱- دستگاه مخصوص PCR و سیستم کامپیوتری متصل به دستگاه ..... ۴۶
۳-۱۲-۳-۲- مراحل انجام تکنیک Real time PCR: ..... ۴۷
۳-۱۳- آنالیز آماری ..... ۵۰
۳-۱۴- ملاحظات اخلاقی: ..... ۵۰
**۴- نتایج: ..... ۳۸**
۴-۱- کشت سلول های سرطان پروستات PC-3 ..... ۳۸
۴-۲- نتایج حاصل از تکنیک MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) ..... ۳۸
۴-۳- مقدار $IC_{50}$ و میزان بقا سلولی ..... ۳۹
۴-۴- بررسی تغییرات مورفولوژیکی هسته ای و میزان آپاپتوز سلول های سرطانی بعد از تیمار با کورکومین بوسیله تکنیک رنگ آمیزی با DAPI ..... ۴۲
۴-۵- بررسی میزان بیان miRNA ها و ژنهای هدف در سلول های $CD44^{\pm}$ رده ی PC-3 تیمار شده با غلظت های مختلف کورکومین در مقایسه با گروه کنترل ..... ۴۵
**۵- بحث و نتیجه گیری: ..... ۶۱**
۵-۱- تفسیر نتایج و مقایسه با سایر مطالعات ..... ۶۱
۵-۲- محدودیت های مطالعه: ..... ۶۷

۵-۳- نتیجه گیری کلی ..... ۶۸
۵-۴- پیشنهادات: ..... ۶۹
۵-۵- ترجمان دانش: ..... ۷۰
**۶- منابع ..... ۷۳**

## فهرست اشکال، جداول و نمودارها

جدول ۱-۳: مقادیر و مواد لازم جهت سنتز اختصاصی CDNA ..... ۴۵

جدول ۲-۳: شرایط دمایی واکنش سنتز CDNA..... ۴۵

جدول ۳-۳: مقادیر و مواد لازم برای انجام REAL TIME PCR ..... ۴۸

جدول ۴-۳: شرایط دمایی واکنش REAL-TIME PCR ..... ۴۸

جدول ۵-۳: توالی ژن های مورد استفاده در این مطالعه..... ۴۹

جدول ۶-۳: توالی میرناهای مورد استفاده در مطالعه..... ۴۹

شکل ۱-۴ سلولهای سرطان پروستات PC-3 که با بزرگنمایی ۴۰X توسط میکروسکوپ نوری گرفته شده است..... ۳۸

شکل ۲-۴ سلولهای سرطان پروستات PC-3 متعاقب انجام تکنیک MACS. فلش ها نشانگر سلول های $CD44^+$ میباشند. ..... ۳۹

شکل ۲-۴ میزان بقای سلولی به دست آمده از اثر غلظت های مختلف کورکومین بر روی سلول های ±CD44 رده ی PC-3 توسط MTT ASSAY. غلظت کورکومین بر حسب میکرومولار می باشد. ..... ۴۱

شکل ۳-۴ میزان آپاپتوز سلول های سرطانی -CD44 رده سلولی PC-3 بعد از تیمار با غلظت های مختلف کورکومین بوسیله تکنیک رنگ آمیزی با DAPI ..... ۴۳

شکل ۴-۴ میزان آپاپتوز سلول های سرطانی $CD44^+$ رده سلولی PC-3 بعد از تیمار با غلظت های مختلف کورکومین بوسیله تکنیک رنگ آمیزی با DAPI ..... ۴۳

نمودار ۱-۴ درصد آپاپتوز سلول های سرطانی $CD44^-$ رده سلولی PC-3 بعد از تیمار با غلظت های مختلف کورکومین..... ۴۴

نمودار ۲-۴ درصد آپاپتوز سلول های سرطانی $CD44^+$ رده سلولی PC-3 بعد از تیمار با غلظت های مختلف کورکومین..... ۴۴

نمودار ۳-۴ میزان بیان MIR-383 در سلول های -CD44 رده ی PC-3 تیمار شده با غلظت های ۱۵ و ۳۰ میکرومولار کورکومین در مقایسه با گروه کنترل .....۴۶

نمودار ۴-۴ میزان بیان MIR-383 در سلول های $CD44^+$ رده ی PC-3 تیمار شده با غلظت های ۵۰ و ۸۰ میکرومولار کورکومین در مقایسه با گروه کنترل .....۴۶

نمودار ۵-۴ میزان بیان ژن PRDX3 در سلول های $CD44^-$ رده ی PC-3 تیمار شده با غلظت های ۱۵ و ۳۰ میکرومولار کورکومین در مقایسه با گروه کنترل ..... ۴۸

نمودار ۶-۴ میزان بیان ژن LDHA در سلول های $CD44^-$ رده ی PC-3 تیمار شده با غلظت های ۱۵ و ۳۰ میکرومولار کورکومین در مقایسه با گروه کنترل ..... ۴۸

نمودار ۷-۴ میزان بیان ژن PRDX3 در سلول های $CD44^+$ رده ی PC-3 تیمار شده با غلظت های ۵۰ و ۸۰ میکرومولار کورکومین در مقایسه با گروه کنترل ..... ۵۰

نمودار ۸-۴ میزان بیان ژن LDHA در سلول های $CD44^+$ رده ی PC-3 تیمار شده با غلظت های ۵۰ و ۸۰ میکرومولار کورکومین در مقایسه با گروه کنترل ..... ۵۰

نمودار ۹-۴ میزان بیان MIR-708 در سلول های $CD44^-$ رده ی PC-3 تیمار شده با غلظت های ۱۵ و ۳۰ میکرومولار کورکومین در مقایسه با گروه کنترل ..... ۵۲

نمودار ۱۰-۴ میزان بیان MIR-708 در سلول های $CD44^+$ رده ی PC-3 تیمار شده با غلظت های ۵۰ و ۸۰ میکرومولار کورکومین در مقایسه با گروه کنترل ..... ۵۲

نمودار ۱۱-۴ میزان بیان ژن LSD1 در سلول های $CD44^-$ رده ی PC-3 تیمار شده با غلظت های ۱۵ و ۳۰ میکرومولار کورکومین در مقایسه با گروه کنترل ..... ۵۴

نمودار ۱۲-۴ میزان بیان ژن RAP1B در سلول های $CD44^-$ رده ی PC-3 تیمار شده با غلظت های ۱۵ و ۳۰ میکرومولار کورکومین در مقایسه با گروه کنترل..... ۵۴

نمودار ۱۳-۴ میزان بیان ژن LSD1 در سلول های $CD44^+$ رده ی PC-3 تیمار شده با غلظت های ۵۰ و ۸۰ میکرومولار کورکومین در مقایسه با گروه کنترل .....۵۶

نمودار ۱۴-۴ میزان بیان ژن RAP1B در سلول های +CD44 رده ی PC-3 تیمار شده با غلظت های ۵۰ و ۸۰ میکرومولار کورکومین در مقایسه با گروه کنترل.....۵۶

اختصارات:

**CD44:** cluster of differentiation 44

**CSC:** Cancer Stem Cell

**DAPI:** 4′,6-diamidino-2-phenylindole

**DMSO:** Dimethyl Sulfoxide

**DNA:** deoxyribonucleic acid

**$IC_{50}$:** half-maximal inhibitory concentration

**LDHA gene:** Lactate Dehydrogenase A

**LSD1 gene:** Lysine Demethylase 1A

**MACS:** Magnetic activating cell sorting

**MIR383 gene:** MicroRNA 383

**MIR708 gene:** MicroRNA 708

**miRNA:** MicroRNA

**PBS:** Phosphate-buffered saline

**PC3:** a human prostate cancer cell line

**PRDX3 gene:** Peroxiredoxin 3

**qRT-PCR:** Quantitative Real-time PCR

**RAP1B gene:** a member of RAS oncogene family

**RNA:** Ribonucleic acid

**RPM:** revolutions per minute

**بررسی تاثیر کورکومین بر روی بیان miR-708 و miR-383 و ژن های هدف این میرناها در سلولهای بنیادی $CD44^+$ و غیر بنیادی $CD44^-$ جدا شده از رده سلولی سرطان پروستات PC3**

چکیده:

**زمینه:** سلول های بنیادی سرطانی باقی مانده در بافت های تومور پس از درمان ممکن است باعث عود یا متاستاز سرطان پروستات شوند. کورکومین پتانسیل امیدوارکننده ای برای هدف قرار دادن سلول های بنیادی سرطان دارد.

**هدف:** در این مطالعه، هدف ما ارزیابی اثرات ضدسرطانی کورکومین بر بیان miR-383-5p **و** miR-708-5p و ژن های هدف آن ها در سلول های بنیادی $CD44^+$ و سلول های غیربنیادی $CD44^-$ های جدا شده از رده سلولی سرطان پروستات PC3 است.

**مواد و روش ها:** ما از روش MTT برای تعیین دوز بهینه ضدسرطانی کورکومین بر روی سلول‌های $CD44^{\pm}$ سرطان پروستات استفاده کردیم. سپس، تغییرات مورفولوژیکی هسته را با استفاده از رنگ‌آمیزی DAPI ارزیابی کردیم. همچنین از qRT-PCR برای تشخیص میزان بیان miRNA و سطوح بیان ژن پس از تیمار سلول ها با کورکومین استفاده شد.

**نتایج:** کورکومین به طور قابل توجهی آپوپتوز را در سلول‌های $CD44^-$ و $CD44^+$ سرطان پروستات به شکل وابسته به دوز افزایش داد (P-value <0.05). سمیت سلولی کورکومین در برابر سلول‌های $CD44^-$ ($IC_{50}$ = 40.30 2.32 µM) موثرتر از سلول‌های $CD44^+$ ($IC_{50}$ = )

83.31 ± 2.91 μM) بود. همچنین، کورکومین با القای بیان miR-383-5p و miR-708-5p ژن‌های هدف آنها LDHA، PRDX3 و RAP1B، LSD1 را کاهش داد.

**نتیجه گیری:** یافته‌های ما نشان می‌دهد که کورکومین، با القای بیان میرناهای سرکوب‌کننده ی تومور، miR-383-5p و miR-708-5p، و مهار ژن‌های هدف آن‌ها، سمیت سلولی را علیه سلول‌های $CD44^{\pm}$ سرطان پروستات القا می‌کند. مطالعات بیشتر بالینی بر روی کورکومین در انسان می‌تواند نتایج کمک کننده ای را در کنترل سرطان پروستات ارائه دهد.

**کلمات کلیدی:** نئوپلاسم های پروستات؛ میرناها ;hsa-miR-383-5p ;hsa-miR-708-5p؛ کورکومین؛