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 تاثیر داربست نانوفیبری بارگذاری شده با ماده اولئوروپین بر القای مرگ برنامه ریزی شده در سلول های MKN-45 مقاوم به ۵-فلورویوراسیل

نگارش:

نیما جعفری پور

اساتید راهنما:

دکتر امیر احمد عرب زاده

دکتر کاظم نجاتی کشکی

استاد مشاور:

دکتر حامد حقی امین جان

شهریور ماه ۱۴۰۲

شماره پایان نامه: ۱۰۸۳

شکر شایان نثار ایزد منان که توفیق فراهم ساخت تا این رساله را به پایان برسانم، ماحصل آموخته هایم را تقدیم می کنم به آنان که

مهر آسمانی شان آرام بخش آلام زمینی است

به گرم ترین تکیه گاه زندگیم ،مادر مهربانم

به همسفر مهربان زندگیم ،همسر عزیزم

که هرچه آموخته ام درمکتب عشق شما آموختم وهرچه بکوشم قطره

ای ازدریای بی کران مهربانی تان را سپاس نتوانم بگویم.

امروزهستی ام به امید شماست وفردا کلید باغ بهشتم رضای شما

ره آوردی گرانتر از این ارزان نداشتم تا به خاک پایتان نثارکنم

باشدکه حاصل تلاشم نسیم گونه غبارخستگی تان را بزداید.

بوسه بردستان پرمهرتان

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

بسی شایسته است ازاستاد راهنمای اول، استادی فرهیخته و فرزانه جناب دکتر کاظم نجاتی که با کرامتی چون خورشید ، سرزمین دل را روشنی بخشیدند و گلشن سرای علم و دانش را با راهنمایی های کار ساز و سازنده بارور ساختند وبنده را همواره مورد لطف ومحبت خود قرار داده اند; تقدیر و تشکر نمایم. سپاس از استاد گرانقدرم ،دکتر امیر احمد عرب زاده که از همکاری و راهنمایی های علمی شان بهره جسته‌ام. سپاس از اساتید گرانقدر و و محترم آقایان دکتر فرهاد جدی و دکتر نوروز نجف زاده و خانم دکتر فرزانه فتحی که داوری این رساله را متقبل شدند.

همچنین از همسر مهربانم که در تمام مراحل زندگی حامی و پشتوانه من بوده تشکر میکنم.

عنوان فهرست مطالب صفحه

چکیده: ۱
(۱-۱) -مقدمه: ۵
۱-۱-مقدمه و بیان مسئله: ۵
(۱-۲) اهداف و فرضیات طرح ۱۱
(۱-۲-۱) هدف کلی طرح ۱۱
(۱-۲-۲) اهداف اختصاصی طرح ۱۱
(۱-۲-۳)فرضیات ۱۲
(۱-۳) تعریف واژه های اختصاصی ۱۲
(۲-۱)بررسی متون: ۱۴
(۲-۱-۱)سرطان ۱۴
(۲-۱-۲)سرطان معده ۱۵
(۲-۱-۳)طبقه بندی سرطان معده ۱۶
(۲-۲)اپیدمیولوژی ۱۸
(۲-۳) اتیولوژی ۲۰
(۲-۴)نقش ژنتیک در اتیولوژی آدنوکارسینوم معده : ۲۰
(۲-۵)عوامل خطرساز سرطان معده: ۲۲
(۲-۶)غربالگری سرطان ۲۳

(۲-۷)تظاهرات بالینی آدنوکارسینوم معده ۲۳

(۲-۸) فلورواوراسیل..... ۲۷

(۲-۹-۱)اولوروپین ۲۹

(۲-۹-۲)مکانیزم ضدسرطانی ۳۰

(۲-۱۰)پیشینه تحقیق: ۳۰

(۳-۱) نوع پژوهش:..... ۳۷

(۳-۲)مکان انجام مطالعه:..... ۳۷

(۳-۳) جامعه آماری و روش نمونه گیری: ۳۷

(۳-۴)متغیر ها: ۳۷

(۳-۵)روش گردآوری اطلاعات: ۳۷

(۳-۶)روش تجزیه و تحلیل داده ها و بررسی آماری: ۳۸

(۳-۷)ملاحظات اخلاقی: ۳۸

(۳-۸)داروها: ۳۹

(۳-۹)آماده سازی محیط کشت RPMI 1640..... ۴۲

(۳-۱۰-۱)کشت و آماده‌سازی سلول MKN-45..... ۴۲

(۳-۱۰-۲) شمارش سلولی و تخمین IC50 داروی 5-FU با انجام تست MTT..... ۴۳

(۳-۱۰-۳) مقاوم‌سازی رده سلولی سرطان معده براساس پروتکل بالینی ۴۵

(۴-۱۰-۳)تخمین IC50 داروی OLEOREUPIEN با انجام تستMTT..... ۴۶

(۵-۱۰-۳) ساخت داربست نانوفیبری حاوی اولوروپین و بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن. ۴۶

(۶-۱۰-۳)تکثیر سلولها بر روی داربست و تیمار با دارو ۵۰

(۷-۱۰-۳) بررسی میزان تکثیر سلولها روی داربست با تکنیک MTT ۵۰

(۸-۱۰-۳) استخراج RNA ۵۱

(۹-۱۰-۳) بررسی کیفیت RNA استخراج شده ۵۴

(۱۰-۱۰-۳)سنتز cDNA..... ۵۶

(۱۱-۱۰-۳) طراحی پرایمر ها ۵۹

(۱۲-۱۰-۳)تکنیک REAL TIME PCR ۶۰

(۱۳-۱۰-۳)آنالیز منحنی ذوب ۶۳

(۱۴-۱۰-۳)آنالیز نسبت بیان ژن ۶۴

(۱-۴)نتایج کشت سلول..... ۶۷

(۱-۱-۴)سنتز داربست و بررسی مورفولوژی آن با SEM و FTIR و نرم افزار IMAGEJ..... ۶۷

(۲-۱-۴)میزان تکثیر سلول‌ها روی داربست طی روزهای سوم و پنجم ۷۰

(۲-۴)نتایج استخراج RNA..... ۷۲

(۳-۴) بررسی بیان ژن های BAX, BCL-2, P53..... ۷۳

(۱-۵) بحث ۷۶

(۴-۵)پیشنهادات ۸۲

فهرست اشکال

عنوان | صفحه

شکل ۱-۲ ساختار داروی ۵-فلورواوراسیل..... ۲۸

شکل ۲- ۲ ساختار اولوروپین..... ۲۹

شکل ۳-۲ مسیرهای سیگنالینگ اولوروپین ۳۰

شکل ۱-۳محیط کشت RPMI 1640 ..... ۴۳

شکل ۲-۳شمارش سلولی با لام نئوپار..... ۴۵

شکل ۳- ۳ پلی کاپورلاکتون(POLYCAPROLACTONE) ۴۹

شکل ۴-۳پلی اتیلن گلیکول(POLYETHYLENE GLYCOL) ۵۰

شکل ۵-۳دستگاه الکترواسپینینگ..... ۵۰

شکل۶-۳ ELISA READER..... ۵۲

شکل ۷-۳ کشت سلول ها در پلیت ۶ خانه..... ۵۳

شکل ۸-۳ دستگاه نانو دراپ ۵۵

شکل ۹-۳ الکتروفورز ۵۶

شکل ۱۰-۳ کیت سنتز cDNA ۵۹

شکل ۱۱-۳ THERMAL CYCLER ۶۰

شکل ۱۲-۳ مسترمیکس REAL TIME PCR ۶۳

شکل ۱۳-۳ REAL TIME PCR WORK STATION ۶۴

شکل ۱۴-۳ LIGHT CYCLER ۶۴

شکل ۱-۴ سلولهای MKN-45 ..... ۶۸

شکل ۲-۴داربست نانوفایبری PCL-PEG ۶۸

شکل ۳-۴ SEM نانوفایبر PCL-PEG و آنالیز ضخامت آن با IMAGE J ۶۹

شکل ۴-۴ SEM نانوفایبر PCL-PEG حاوی داروی اولوروپین و آنالیز ضخامت آن با IMAGE J ... ۷۰

شکل ۵-۴ طیف FTIR نانوفایبر PCL-PEG حاوی داروی اولوروپین ۷۱

شکل ۶-۴ نتایج تکثیر سلول های MKN-45 مقاوم به ۵-FU بر روی داربست به مدت ۷۲ ساعت. و ۱۲۰ ساعت. کاهش زنده مانی سلولها را نشان میدهد ۷۲

شکل ۷-۴ بررسی استخراج RNA به وسیله ژل الکتروفورز ۷۴

شکل ۸-۴ سطح بیان ژن های P53,BAX,B-CL2 در سلولهای مقاوم(سمت راست) و حساس(سمت چپ) به داروی ۵-فلورویوراسیل در داربست حاوی داروی اولوروپین. ۷۵

عنوان **فهرست جداول** **صفحه**

جدول ۱-۳ وسایل مورد نیاز ۴۰

جدول ۲-۳ تجهیزات مورد نیاز ۴۱

جدول ۳- ۳ مواد مورد نیار ۴۲

جدول ۴-۳ مواد و مقادیر موردنیاز آنها جهت سنتز cDNAژن های هدف طبق پروتکل یکتا تجهیز(میکس اول) ۵۷

جدول ۵-۳ مواد و مقادیر موردنیاز آنها جهت سنتز cDNAژن های هدف طبق پروتکل یکتا تجهیز(میکس دوم) ۵۸

جدول ۶-۳ برنامه دمایی سنتز cDNA..... ۵۹

جدول ۷-۳ توالی پرایمر ژن‌های مورداستفاده در RT-PCR..... ۶۰

جدول ۸-۳ مواد و مقادیر استفاده شده در Real Time PCR..... ۶۲

جدول ۹-۳ زمان بندی دمایی Real Time PCR ۶۳

جدول ۱-۴ بررسی استخراج RNA با دستگاه نانودراپ..... ۷۳

اختصارات:

DMSO: Dimethyl Sulfoxide

DNA: deoxyribonucleic acid

IC_{50}: half-maximal inhibitory concentration

miRNA: MicroRNA

ml: mili litter

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

ng: nano gram

PBS: Phosphate-buffered saline

PCL-PEG: polycaprolactone- polyethylene glycol

qRT-PCR: Quantitative Real-time PCR

RNA: Ribonucleic acid

Rpm: revolutions per minute

RPMI-1640: Roswell Park Memorial Institute

SEM:scanning electron microscope)

بررسی تاثیر داربست نانوفیبری بارگذاری شده با ماده اولئوروپین بر القای مرگ برنامه ریزی شده در سلول های MKN-45 مقاوم به ۵-فلورویوراسیل

چکیده:

زمینه: سرطان معده (gastric cancer) یکی از شایع‌ترین و کشنده‌ترین سرطان‌ها در دنیا به شمار می آید. معده در دستگاه گوارش بین مری و روده کوچک قرار گرفته و با ترشح آنزیم ، اسید معده و فاکتور جذب ویتامین B12 به هضم غذا کمک می‌کند. معده از سلول‌های اپیتلیال و غدد تشکیل شده که با غشای مخاطی پوشیده شده‌اند. یکی از روش های معمول و مرسوم در درمان سرطان به روش شیمی درمانی، استفاده از داروی 5-fluorouracil است که این دارو آنالوگ یوراسیل بوده و به محض ورود به سلول به فرم‌های فعال خود که شامل فلورودئوکسی یوریدین مونوفسفات (FdUMP)، فلورودئوکسی یوریدین تری فسفات (FdUTP) و فلورویوریدین تری فسفات (FUTP) است تبدیل شده و این فرم‌های فعال با مهار آنزیم تیمیدیلات سنتاز، به عنوان آنزیمی برای ساخت پیریمیدین‌ها، مانع از سنتز و ترمیم RNA و DNA و متعاقبا مانع از سنتز پروتئین می‌شوند. یک ترکیب اصلی در زیتون ۳و۴ دی هیدروکسی فنیل اتانول- النولیک اسید می باشد که به الوروپین (Oleuropein) معروف است.هدف این مطالعه بررسی تاثیر داربست نانوفیبری بارگذاری شده با ماده اولئوروپین بر القای مرگ برنامه ریزی شده در سلول های MKN-45 مقاوم به ۵-فلورویوراسیل می باشد.

هدف: ۱.تعیین تاثیر سمیت داربست حاوی ماده بیواکتیو الوروپین در سلولهای MKN-45 مقاوم به 5 –فلورویوراسیل نسبت به گروه کنترل

۲..تعیین تاثیر داربست حاوی ماده بیواکتیو الوروپین بر بیان ژنهای مسیر آپوپتوز (Bax،Bcl-2 و P53) در سلولهای MKN-45 مقاوم به ۵ –فلورویوراسیل و مقایسه آن با گروه کنترل

مواد و روش ها:

پس از خریداری رده سلولی MKN-45 ،انتقال به محیط کشت درون فلاسک و چندین سری پاساژ دادن سلول ها در فاز لگاریتمی مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی میزان بیان ژن‌های القاکننده آپوپتوز،(Bax، P53) و ژن ضد آپوپتوتیک(Bcl-2) با استفاده از روش Real-time PCR در سلول‌های MKN-45 مقاوم به 5-FU در شرایط برون تنی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: در این مطالعه از داربست نانوفایبری PCL-PEG برای بارگیری داروی اولوروپین و ایجاد بستری برای رشد و تکثیر سلولها استفاده شده است. طبق نتایج حاصل از تست MTT در روز سوم پس از تیمار، رهایش دارو از داربست از روز سوم به بعد انجام می‌گیرد و تاثیر دارو بر روی سلول‌ها در تست MTTپنج روزه قابل تایید است.

همچنین طبق نتایج حاصل از MTT ترکیب دو داروی اولوروپین بارگذاری شده در داربست PCL-PEG، فعالیت سایتوتوکسیسیته بالاتری نسبت به گروه دیگر از خود نشان داد.

نتایج: طبق محاسبات انجام شده، سطح بیان ژن BAX و P53 در سلولهای مجاور شده با داربست حاوی اولوروپین افزایش معنی داری نسبت به گروه دیگر نشان میدهد. و سطح بیان Bcl-2 در این گروه نیز نسبت به سایر گروه ها کاهش معنی دار داشته است. افزایشBax و

P53 و کاهش Bcl-2 دلیل بر افزایش آپوپتوز در سلولهای مقاوم مجاور شده با داربست حاوی اولوروپین است.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ترکیب داروی اولوروپین در بستر داربست نانوفایبری PCL-PEG پتانسیل مهار رشد سلول‌های سرطانی مقاوم به ۵-فلورویوراسیل را دارد و میتواند به عنوان یک رویکرد مناسب برای درمان سرطان معده در نظر گرفته شود.

کلمات کلیدی: سرطان معده، اولوروپین، ۵-فلورواوراسیل، داربست نانوفایبری، مقاومت دارویی، p53، BCL-2، Bax