



دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه دکتراى حرفه ای رشته پزشکی

بررسی تاثیر نانوذرات مغناطیسی حاوی سیس پلاتین بر رشد و خواص بنیادینگی سلول های CD44

مثبت سرطان پستان

نگارش:

میلاد نیری

اساتید راهنما:

دکتر ایرج فیضی

دکتر امیر احمد عرب زاده

استاد مشاور:

دکتر کاظم نجاتی کشکی

مهر ۱۴۰۲

شماره پایان نامه :

۰۱۱۲۳





دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه دکتراى حرفه ای رشته پزشکی

بررسی تاثیر نانوذرات مغناطیسی حاوی سیس پلاتین بر رشد و خواص بنیادینگی سلول های CD44

مثبت سرطان پستان

نگارش:

میلاد نیری

اساتید راهنما:

دکتر ایرج فیضی

دکتر امیر احمد عرب زاده

استاد مشاور:

دکتر کاظم نجاتی کشکی

مهر ۱۴۰۲

شماره پایان نامه :

۰۱۱۲۳

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۲	فصل اول مقدمه
۳	۱-۱: مقدمه
۳	۱-۲: بیان مسأله
۶	۱-۳: اهداف و فرضیات طرح
۶	۱-۳-۱: اهداف کلی
۶	۱-۳-۲: اهداف اختصاصی
۶	۱-۳-۳: اهداف کاربردی
۶	۱-۳-۴: فرضیات یا سوالات طرح
۶	۱-۵: تعاریف واژه اختصاصی
۶	سرطان پستان:
۷	بنیادینگی:
۷	خود نوسازی:
۷	پوتنسی
۷	داروی سیس پلاتین:
۹	فصل دوم بررسی متون
۱۰	۲-۱: مبانی نظری:
۱۰	۲-۱-۱: پستان
۱۱	۲-۱-۱-۱: بافت شناسی پستان:
۱۲	۲-۱-۱-۲: سلولهای اپیتلیالی پستان:

- ۱۳-۱-۳: بافت چربی پستان: ۱۳.....
- ۱۳-۱-۴: سلولهای فیروپلاستی پستان: ۱۳.....
- ۱۴-۱-۲: سرطان پستان: ۱۴.....
- ۱۵-۱-۲-۱: اپیدمیولوژی سرطان پستان: ۱۵.....
- ۲۰-۱-۲-۱: طبقه بندی سرطان پستان: ۲۰.....
- ۲۸-۱-۳: بنیادینگی ۲۸.....
- ۳۰-۱-۴: سیس پلاتین ۳۰.....
- ۳۱-۱-۵: انکپسولاسیون دارو داخل نانوذرات ۳۱.....
- ۳۳-۲: پیشینه پژوهش: ۳۳.....
- ۳۹..... فصل سوم مواد و روش کار ۳۹.....
- ۴۰-۱-۳: نوع پژوهش ۴۰.....
- ۴۰-۲-۳: جامعه آماری، روش نمونه گیری، حجم نمونه ۴۰.....
- ۴۰-۳-۳: روش گرد آوری اطلاعات ۴۰.....
- ۴۰..... جداسازی سلول های CD44+ از سلول های سرطان پستان رده MCF-7 ۴۰.....
- ۴۱..... ارزیابی سمیت سلولی با تکنیک MTT ۴۱.....
- ۴۱..... سنجش بیان ژن ها ۴۱.....
- ۴۲-۳-۴: معیار های ورود به مطالعه ۴۲.....
- ۴۲-۳-۵: معیار خروج از طرح ۴۲.....
- ۴۲-۳-۶: روش تجزیه و تحلیل داده ها و بررسی آماری ۴۲.....
- ۴۲-۳-۷: ملاحظات اخلاقی ۴۲.....
- ۴۳-۳-۸: جدول متغیر های مطالعه ۴۳.....
- ۴۴-۳-۹: مواد و وسایل مورد نیاز ۴۴.....

۴۶ RPMI 1640 کشت آماده سازی محیط کشت
۴۷ تست های سلولی و مولکولی
۴۷ MCF-7 سلول کشت و آماده سازی سلول
۴۸ MTT تست شمارش سلولی و تخمین IC50 داروی نانوذره حاوی سیس پلاتین با انجام تست
۵۰ RNA استخراج
۵۲ بررسی کیفیت RNA استخراج شده
۵۴ سنتز cDNA
۵۸ طراحی پرایمر ها
۵۸ Real Time PCR تکنیک
۶۳ آنالیز منحنی ذوب
۶۳ آنالیز نسبت بیان ژن
۶۷ فصل چهارم نتایج
۶۸ ۴-۱: ویژگی های فیزیکو-شیمیایی نانو ذرات:
۶۸ ۴-۲: تعیین تاثیر نانوذره حاوی سیس پلاتین بر میزان بقا در سلولهای CD44+ سرطان پستان با استفاده از روش
۶۹ MTT
۶۹ اثر ۲۴ ساعته:
۷۰ اثر ۴۸ ساعته:
۷۰ ۴-۳: تعیین تاثیر نانوذرات حاوی سیس پلاتین بر بیان ژنهای مرتبط با بنیادینگی (Sox2, Oct4, Nanog, Klf4)
۷۱
۷۳ ژن Sox2
۷۴ ژن Klf4
۷۵ ژن Nanog

۷۶.....	ژن Oct4.....
۷۸.....	فصل پنجم بحث و نتیجه گیری.....
۷۹.....	۵-۱: بحث.....
۸۲.....	۵-۲: محدودیت ها.....
۸۳.....	۵-۳: نتیجه گیری.....
۸۴.....	۵-۴: پیشنهادات برای پژوهش های بعدی.....
۸۵.....	۵-۵: ترجمان دانش.....

فهرست شکل ها و نمودارها

صفحه	عنوان
۱۱.....	شکل ۲-۱: آناتومی مقطعی پستان.....
۱۴.....	شکل ۲-۲: بافت طبیعی پستان.....
۱۷.....	شکل ۲-۴: شایع ترین نوع بروز سرطان در سال ۲۰۲۰ در هر کشور.....
۲۰.....	شکل ۲-۵: نرخ های استاندارد شده سنی بروز و مرگ و میر در منطقه برای سرطان سینه زنان در سال ۲۰۲۰.....
۱۸.....	شکل ۲-۶: مسیر جهانی بیمار برای مدیریت سرطان پستان در ۳ قسمت مراقبت متوالی نشان داده شده است: فاصله زمانی بیمار، فاصله تشخیصی و فاصله درمان.....
۲۳.....	شکل ۲-۷: ایمونوهیستوشیمی سرطان سینه مهاجم لومینال A، A، گیرنده استروژن مثبت، رنگ آمیزی هسته ای. B، گیرنده پروژسترون مثبت، رنگ آمیزی هسته ای. C، HER-2 1+ منفی، رنگ آمیزی غشایی. D، Ki-67 مثبت ۳٪، رنگ آمیزی هسته ای.....

شکل ۸-۲: ایمونوهیستوشیمی سرطان سینه مهاجم لومینال A, B. گیرنده استروژن مثبت، رنگ آمیزی هسته ای. B, گیرنده پروژسترون مثبت، رنگ آمیزی هسته ای. C, HER2 1 + منفی، رنگ آمیزی غشایی. D, Ki-67 مثبت ۳۰٪، رنگ آمیزی هسته ای. ۲۵.....

شکل ۹-۲: ایمونوهیستوشیمی کارسینوم تهاجمی پستان HER2 . A, گیرنده استروژن مثبت، رنگ آمیزی هسته ای. B, گیرنده پروژسترون مثبت، رنگ آمیزی هسته ای. C, HER2 3 + مثبت، رنگ آمیزی غشایی. D, Ki-67 مثبت ۵٪، رنگ آمیزی هسته ای. ۲۶.....

شکل ۱۰-۲: ایمونوهیستوشیمی سرطان سینه مهاجم سه گانه منفی. A, گیرنده استروژن منفی است. B, گیرنده پروژسترون منفی است. C, HER2 0 + منفی، رنگ آمیزی غشایی. D, Ki67 مثبت ۱۰٪، رنگ آمیزی هسته ای. ۲۸.....

شکل ۱۳-۲: مکانیسم زیربنایی تنظیم بنیادینگی CSC و کمک CSC ها به علائم سرطان. ۳۰.....

شکل ۱-۳ محیط کشت RPMI 1640..... ۴۷.....

شکل ۲-۳ شمارش سلولی با لام نئوپار..... ۴۹.....

شکل ۳-۳ کشت سلول ها در پلیت ۶ خانه..... ۵۰.....

شکل ۶-۳ دستگاه نانو دراپ..... ۵۳.....

شکل ۷-۳ الکتروفورز..... ۵۴.....

شکل ۴-۳ کیت سنتز cDNA..... ۵۷.....

شکل ۵-۳ Thermal Cycler..... ۵۷.....

شکل ۶-۳ مسترمیکس Real Time PCR..... ۶۱.....

شکل ۷-۳ Real time PCR work station..... ۶۲.....

شکل ۸-۳ Light Cycler..... ۶۲.....

- تصویر ۱-۴: تصویر SEM نانو ذرات با مقیاس $1\mu\text{M}$ ۶۸
- نمودار ۱-۴، تاثیر نانو ذره حاوی سیس پلاتین و سیس پلاتین بر روی زنده مانده سلول ها طی ۲۴ ساعت ۶۹
- نمودار ۲-۴، تاثیر نانو ذره حاوی سیس پلاتین و سیس پلاتین بر روی زنده مانده سلول ها طی ۴۸ ساعت ۷۰
- تصویر ۲-۴، نتیجه الکتروفورز RNA استخراج شده در آگارز ۲٪ ۷۱
- نمودار ۳-۴: نمودار amplification ۷۲
- نمودار ۴-۴: منحنی Melting ژن های (Sox2, Oct4, Nanog, Klf4) ۷۲
- نمودار ۵-۴، تاثیر تیمار ها (سیس پلاتین و نانو ذره حاوی سیس پلاتین) بر بیان ژن Sox2 در غلظت های ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومول ۷۳
- نمودار ۶-۴، تاثیر تیمار ها (سیس پلاتین و نانو ذره حاوی سیس پلاتین) بر بیان ژن Klf4 در غلظت های ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومول ۷۴
- نمودار ۷-۴، تاثیر تیمار ها (سیس پلاتین و نانو ذره حاوی سیس پلاتین) بر بیان ژن Nanog در غلظت های ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومول ۷۵
- نمودار ۸-۴، تاثیر تیمار ها (سیس پلاتین و نانو ذره حاوی سیس پلاتین) بر بیان ژن Oct4 در غلظت های ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومول ۷۶

فهرست جداول

صفحه	عنوان
۲۲	جدول ۱-۲: طبقه بندی انواع سرطان پستان.....
۴۴	جدول ۱-۳ وسایل مورد نیاز.....
۴۴	جدول ۲-۳ تجهیزات مورد نیاز.....
۴۵	جدول ۳-۳ مواد مورد نیاز.....
۵۵	جدول ۴-۳ مواد و مقادیر مورد نیاز آنها جهت سنتز cDNA ژن های هدف طبق پروتکل یکتا تجهیز.....
۵۶	جدول ۵-۳ مواد و مقادیر مورد نیاز آنها جهت سنتز cDNA ژن های هدف طبق پروتکل یکتا تجهیز.....
۵۶	جدول ۶-۳ برنامه دمایی سنتز cDNA.....
۵۸	جدول ۷-۳ توالی پرایمر ژن های مورد استفاده در RT-PCR.....
۶۰	جدول ۸-۳ مواد و مقادیر استفاده شده در Real Time PCR.....
۶۱	جدول ۹-۳ زمان بندی دمایی Real Time PCR.....

بررسی تاثیر نانوذرات مغناطیسی حاوی سیس پلاتین بر رشد و خواص بنیادینگی سلول های

CD44 مثبت سرطان پستان

چکیده:

زمینه: سرطان پستان شایعترین سرطان در زنان بعد از سرطان غیرملانومی پوست و دومین علت مرگ ناشی از سرطان در زنان پس از سرطان ریه است

هدف: پژوه حاضر با هدف تعیین اثر مهاری نانوذرات مغناطیسی حاوی سیس پلاتین بر رشد و خواص بنیادینگی سلول های CD44 مثبت سرطان پستان انجام شده است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش پس از ارزیابی دقیق خواص فیزیکی شیمیایی (با استفاده از روش SEM) نانوذرات اندازه گیری شد. سپس با استفاده از تکنیک های MTT و PCR سمیت سلولی و بیان ژن های مرتبط با بنیادینگی نیز اندازه گیر گردید.

یافته‌ها: تیمار نانوذرات مغناطیسی حاوی سیس پلاتین و سیس پلاتین تنها میتواند باعث کاهش زنده مانی سلول ها CD44+ پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت بصورت معنادار گردد ($P\text{-value} < 0.05$). همچنین این دو ماده میتواند نرخ بیان ژن های مربوط با بنیادینگی شامل Sox2, Oct4, Nanog و Klf4 را به طور معناداری کاهش دهد ($P\text{-value} < 0.05$).
نتیجه‌گیری: تاثیر دارو در داخل نانو ذره نسبت به حالت آزاد دارو بر روی کشندگی سلول های سرطانی با توجه به نتایج بدست آمده بیشتر میباشد.

کلمات کلیدی: نانوذرات سیس پلاتین، سلول های سرطان سینه + CD44، بیان ژن، زنده ماندن سلول، سرکوب

تومور