



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 اثر کومارین و نانوکومارین در القای آپتوز و کاهش مهاجرت رده های

سلولی سرطان پروستات (PC3) و (DU145)

نگارش:

سالار عبدالله پوراصل

استاد راهنمای اول:

دکتر الهام صفرزاده

استاد راهنمای دوم:

دکتر عفت ایرانی جم

مهر ماه ۱۴۰۲

شماره پایان نامه:

۰۱۱۵۷

گواهی اصالت پایاننامه

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.

تقدیم به

پدر و مادر عزیز و مهربانم
که در سختی‌ها و
دشواری‌های زندگی همواره
یاوری دلسوز و فداکار
و پشتیبانی محکم و مطمئن
برایم بوده‌اند.

سپاسگذار کسانی هستم که
سرآغاز تولد من هستید. از
یکی زاده می‌شوم و از

دیگری جاودانه. استادی که
سپیدی را بر تخته سیاه
زندگی‌ام نگاشت و مادری که
تار مویی از او پپای من سیاه
نماند.

تقدیر و تشکر

اکنون که به یاری خداوند این دوره را به
پایان رسانیده‌ام، بر خود واجب می‌دانم
از استاد راهنمای بزرگوارم خانم دکتر
صفرزاده به پاس زحمات بی‌شائبه

شان در طی انجام این تحقیق
سپاسگزاری نمایم.

همچنین از اساتید گرانمایه، جناب آقای
دکتر امانی، آقای دکتر نجف زاده و آقای
دکتر جدی که زحمت داورى این پایان
نامه را بر عهده داشتند نهایت تشکر را
دارم.

از سایر اساتید بزرگ، خانم دکتر ایرانی
جم که شاگردى محضرشان از بزرگترین
افتخارات زندگى علمى ام می باشد، کمال
تشکر را دارم.

فهرست اختصارات:

5ARI	5 α -Reductase Inhibitor
BPH	Benign Prostatic Hyperplasia
BRCA	BReast CAncer gene
DALY	Disability-Adjusted Life Year
DRE	Digital Rectum Examination
IC50	half maximal Inhibitory Concentration
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MTT Bromide	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium
PSA	Prostate-specific antigen
qRT-PCR	Quantitative Real-time PCR
SCC:	Squamous Cell Carcinoma
TCC:	Transitional Cell Carcinoma
TURS:	TransRectal UltraSound

فهرست مندرجات و ضمایم:

۴	۱-مقدمه:
۴	۱-۱-مقدمه و بیان مسئله:
۷	۱-۲-اهداف طرح:
۷	۱-۲-۱-هدف کلی طرح:
۸	۲-۲-۱-اهداف اختصاصی طرح:
۸	۳-۱-فرضیات طرح:
۹	۴-۱-تعریف واژه های اختصاصی:
۱۲	۲-مروری بر متون:
۱۲	۱-۲-کلیات :
۱۲	۱-۱-۲-سرطان:
۱۲	۲-۱-۲-سرطان پروستات:
۱۲	۲-۱-۲-۱-میزان بروز و اپیدمیولوژی:
۱۳	۲-۱-۲-۲-آسیب شناسی:
۱۳	۲-۱-۲-۳-سبب شناسی:
۱۹	۲-۱-۲-۴-تشخیص
۲۰	۲-۱-۲-۵-مرحله بندی و درجه بندی:
۲۱	۲-۱-۲-۶-درمان سرطان پروستات
۲۲	۳-۱-۲-کومارین
۲۴	۲-۲-پیشینه تحقیق:
۲۹	۳-مواد و روش کار:

۲۹	۱-۳- نوع مطالعه:
۲۹	۲-۳- جامعه آماری و روش نمونه گیری:
۲۹	۳-۳- متغیر ها:
۳۰	۴-۳- روش تجزیه و تحلیل داده ها و بررسی آماری:
۳۰	۵-۳- ملاحظات اخلاقی:
۳۰	۶-۳- متدولوژی مطالعه:
۳۳	۷-۳- طرح مطالعه:
۳۳	۱-۷-۳- سنتز نانوکومارین:
۳۳	۲-۷-۳- کشت سلولی:
۳۳	۱-۲-۷-۳- انجماد زدایی سلول ها
۳۴	۲-۲-۷-۳- تعویض محیط کشت سلول ها
۳۴	۳-۲-۷-۳- پاساژ سلولی
۳۵	۴-۲-۷-۳- فریز کردن سلول ها
۳۶	۴-۲-۷-۳- انجام شمارش سلولی
۳۷	۳-۷-۳- تست MTT:
۳۹	۴-۷-۳- تست Wound healing assay:
۳۹	۵-۷-۳- بررسی آپاپتوز (فلوسایتومتری):
۴۴	۶-۷-۳- بررسی بیان ژن (Real time PCR):
۴۴	۱-۳-۷-۶- استخراج RNA
۴۶	۲-۳-۷-۶- سنتز c-DNA
۴۷	۱-۲-۳-۷-۶- مراحل آماده سازی مواد و انجام واکنش سنتز c-DNA
۴۸	۳-۳-۷-۶- Real Time PCR
۴۸	۱-۳-۷-۶- دستگاه مخصوص PCR و سیستم کامپیوتری متصل به دستگاه ...
۴۹	۲-۳-۷-۴-۳- مراحل انجام کار:
۵۱	۳-۸- روش جمع آوری اطلاعات و ابزار های مورد استفاده:

۴-یافته ها	۵۳
۴-۱- مطالعات سایتوتوکسیتی رده‌های سلولی سرطان پروستات پس از تیمار با کومارین و نانوکومارین با روش MTT	۵۳
۴-۲- میزان مهاجرت و متاستاز سلول های سرطانی بعد از تیمار با کومارین و نانوکومارین بوسیله تکنیک Wound healing assay	۵۷
۴-۳- میزان بیان ژنهای هدف در رده سلولی PC3 و DU145 تیمار شده با کومارین و نانوکومارین در مقایسه با گروه کنترل	۶۰
۴-۴- بررسی القای آپتوز به روش فلوسایتومتری با استفاده از رنگ سنجی Annexin V/PI	۷۱
۴-۴-۱: بررسی القای آپتوز سلول های PC-3 تیمار شده با کومارین و نانوکومارین ...	۷۲
۴-۴-۲: بررسی القای آپتوز سلول های DU145 تیمار شده با کومارین و نانوکومارین	۷۵
۵-بحث:	۸۰
۵-۱- تفسیر نتایج و مقایسه با سایر مطالعات:	۸۰
۵-۲- نتیجه گیری کلی:	۸۳
۵-۳- پیشنهادات:	۸۴
۵-۴- ترجمان دانش:	۸۵
منابع:	۸۷
Abstract	۹۶

فهرست جداول، اشکال و نمودارها:

شکل ۱-۲: ساختار مولکولی کومارین.....	۲۲
شکل ۲-۲: ساختار مولکولی انواع کومارین ها.....	۲۳
شکل ۱-۳: انواع مرگ سلولی.....	۴۰
شکل ۲-۳: مکانیسم اتصال Annexin V-FITC به فسفاتیدیل سرین (PS).....	۴۱
جدول ۱-۳: مقادیر و مواد لازم جهت سنتز اختصاصی cDNA.....	۴۷
جدول ۲-۳: شرایط دمایی واکنش سنتز cDNA.....	۴۷
جدول ۳-۳: مقادیر و مواد لازم برای انجام real time PCR.....	۴۹
جدول ۳-۴: شرایط دمایی واکنش Real-time PCR.....	۴۹
جدول ۳-۵: پرایمرهای مورد استفاده.....	۵۰
نمودار ۱-۴: میزان مهار رشد رده سلولی PC3 پس از تیمار با کومارین و نانوکومارین با روش MTT در ۲۴ ساعت.....	۵۳
نمودار ۲-۴: میزان مهار رشد رده سلولی PC3 پس از تیمار با کومارین و نانوکومارین با روش MTT در ۴۸ ساعت.....	۵۴
نمودار ۳-۴: میزان مهار رشد رده سلولی DU145 پس از تیمار با کومارین و نانوکومارین با روش MTT در ۲۴ ساعت.....	۵۵
نمودار ۴-۴: میزان مهار رشد رده سلولی DU145 پس از تیمار با کومارین و نانوکومارین با روش MTT در ۴۸ ساعت.....	۵۶
نمودار ۵-۴: مهاجرت و متاستاز سلول های سرطانی رده PC3 بعد از تیمار با کومارین و نانوکومارین بوسیله تکنیک Wound healing assay در ۲۴ و ۴۸ ساعت.....	۵۸
نمودار ۶-۴: مهاجرت و متاستاز سلول های سرطانی رده DU145 بعد از تیمار با کومارین و نانوکومارین بوسیله تکنیک Wound Healing Assay در ۲۴ و ۴۸ ساعت.....	۵۹
نمودار ۷-۴: میزان بیان ژن Vimentin در رده سلولی PC3 و DU145 تیمار شده با کومارین و نانوکومارین در مقایسه با گروه کنترل.....	۶۰
نمودار ۸-۴: میزان بیان ژن TP53 در رده سلولی PC3 و DU145 تیمار شده با کومارین و نانوکومارین در مقایسه با گروه کنترل.....	۶۱
نمودار ۹-۴: میزان بیان ژن CD274 در رده سلولی PC3 و DU145 تیمار شده با کومارین و نانوکومارین در مقایسه با گروه کنترل.....	۶۲

- نمودار ۱۰ - ۴: میزان بیان ژن BCL-2 در رده سلولی PC3 و DU145 تیمار شده با کومارین و نانوکومارین در مقایسه با گروه کنترل..... ۶۳
- نمودار ۱۱ - ۴: میزان بیان ژن CASP3 در رده سلولی PC3 و DU145 تیمار شده با کومارین و نانوکومارین در مقایسه با گروه کنترل..... ۶۵
- نمودار ۱۲ - ۴: میزان بیان ژن CASP9 در رده سلولی PC3 و DU145 تیمار شده با کومارین و نانوکومارین در مقایسه با گروه کنترل..... ۶۶
- نمودار ۱۳ - ۴: میزان بیان ژن CDH1 در رده سلولی PC3 و DU145 تیمار شده با کومارین و نانوکومارین در مقایسه با گروه کنترل..... ۶۷
- نمودار ۱۴ - ۴: میزان بیان ژن SNAIL1 در رده سلولی PC3 و DU145 تیمار شده با کومارین و نانوکومارین در مقایسه با گروه کنترل..... ۶۸
- نمودار ۱۵ - ۴: میزان بیان ژن MMP9 در رده سلولی PC3 و DU145 تیمار شده با کومارین و نانوکومارین در مقایسه با گروه کنترل..... ۶۹
- نمودار ۱۶ - ۴: میزان بیان ژن MMP13 در رده سلولی PC3 و DU145 تیمار شده با کومارین و نانوکومارین در مقایسه با گروه کنترل..... ۷۰
- شکل ۴-۴: بررسی القای آپتوز ناشی از کومارین و نانوکومارین در رده سلولی PC3..... ۷۳
- نمودار ۱۷-۴: نتایج آنالیز فلوسایتومتری با Annexin V/PI سلول های PC-3 تیمار شده..... ۷۴
- شکل ۴-۵: بررسی القای آپتوز ناشی از کومارین و نانوکومارین در رده سلولی DU145..... ۷۶
- نمودار ۱۸-۴: نتایج آنالیز فلوسایتومتری با Annexin V/PI سلول های PC-3 تیمار شده..... ۷۷

بررسی اثر کومارین و نانوکومارین در القای آپاپتوز و کاهش مهاجرت سلولی رده

سلولی سرطان پروستات (PC3) و (DU145)

چکیده:

زمینه: سرطان پروستات از جمله سرطان های شایع با درصد مرگ و میر بالاست. تاکنون، مطالعات بسیار زیادی برای یافتن انواع روش های درمانی برای این بیماری با کمترین عوارض جانبی صورت گرفته است. کومارین عضوی از خانواده مواد فنلی در گیاهان می باشد و به عنوان یکی از محصولات متابولیسم ثانویه رایج در شیرهی واکوئولی شناخته می شود. این مواد فنلی از نظر فیزیولوژیکی فعال هستند و دارای خاصیت سایتوتوکسیک هستند و از طریق اختلال در تقسیم هسته و رشد و نیز بازدارندگی آنزیم هایی مانند آمیلازها یا ساکارازها ایفای نقش می کنند. کومارین به عنوان یک ترکیب سایتوتوکسیک تاثیرات مهمی در روند تغییر بیان ژن ها دارد. از این ویژگی کومارین برای تغییر بیان ژن های سلول های سرطانی و القای آپاپتوز استفاده می شود. کومارین به صورت نانوفرموله می تواند اثرات متفاوت تری نسبت به حال مشتق نشده داشته باشد.

هدف: هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات ضد مهاجرت (ضد متاستازی) و القا کنندگی آپاپتوز توسط نانوکومارین از طریق القای تغییرات در سطح بیان ژن های vimentin و E-cadherin در رده سلولی سرطان پروستات می باشد.

مواد و روش ها: طی این مطالعه از دو رده سلولی PC3 و DU145 استفاده شد. سلول ها در بازه های زمانی ۲۴، ۴۸ ساعت و در غلظت های مختلف تیمار شدند. میزان سایتوتوکسیسته ترکیبات مورد مطالعه و IC50 در بازه های زمانی ۲۴، ۴۸ ساعت با تکنیک MTT سنجش شد. درصد آپوپتوز سلولی با تست فلوسیتومتری تعیین گردید. میزان مهاجرت و متاستاز سلولی با

استفاده از تکنیک بهبود زخم ارزیابی شد و در نهایت میزان بیان ژن های TP53 و CASP3 و CASP9 و MMP-9 و MMP-13 و E-Cadherin و Vimentin و BCL-2 و SNAIL1 و CD274 در هر دو رده سلولی مورد مطالعه با تکنیک RT-PCR بررسی شد.

یافته ها: نتایج آزمون های انجام شده نشان دهنده افزایش چشمگیر میزان آپوپتوز در هر دو رده سلولی به دنبال تیمار با کومارین و نانوکومارین در مقایسه با گروه کنترل بود. پس از آزمایش بهبود زخم نیز کاهش مهاجرت سلول ها پس از مواجهه با کومارین و نانوکومارین 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 TP53 و CASP3 و CASP9 و E-Cadherin و کاهش بیان BCL2 و MMP-9 و MMP-13 و Vimentin در دو رده سلولی بود.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان دهنده تاثیرات مثبت کومارین و نانوکومارین جهت سرکوب سلول های سرطانی، القاء آپوپتوز، مهار مهاجرت سلولی و در نهایت تاثیرات چشمگیر بر روی بیان انکوژن های مختلف داشت. همچنین نتایج بیانگر تاثیر بهتر نانوکومارین در مقابل کومارین بود. لذا میتوان از این ترکیب بعنوان یک گزینه کاربردی جهت بررسی های بیشتر در بالین استفاده نمود.

واژگان کلیدی: کومارین، نانوکومارین، سرطان، پروستات