



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 تغییرات بیان miR-19 و miR-508 در سلولهای سرطان معده مقاوم به ۵-

فلورواوراسیل بعد از تیمار با اسید آسکوربیک

نگارش:

حامد خضوعی

اساتید راهنما:

دکتر کاظم نجاتی گشکی

دکتر امیر احمد عرب زاده

مهر ماه ۱۴۰۲

شماره پایان نامه : ۰۱۱۲۴

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.

شکر شایان نثار ایزد منان که توفیق فراهم ساخت تا این رساله را به پایان برسانم،

تقدیم به پدر و مادر عزیزم

خدای را بسی شاکرم که از روی کرم پدر و مادری فداکار نصیبم ساخته تا در سایه
درخت پر بار وجودشان بیاسایم و از ریشه آنها شاخ و برگ گیرم و از سایه وجودشان
در راه کسب علم و دانش تلاش نمایم.

والدینی که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر بودنم چرا
که این دو وجود پس از پروردگار مایه هستی ام بوده اند دستم را گرفتند و راه رفتن
را در این وادی زندگی پر از فراز و نشیب آموختند.

آموزگارانی که برایم زندگی؛ بودن و انسان بودن را معنا کردند

حال این برگ سبزی است تحفه درویش تقدیم آنان....

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 فریاد رس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت

می‌گراید

و به پاس محبت‌های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی‌کند.

این مجموعه را به پدر و مادر عزیزم تقدیم می‌کنم.

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 از استاد راهنمای اول، استادی فرهیخته و فرزانه جناب **آقای 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 و بنده را همواره مورد لطف و محبت 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 جستهم. سپاس از اساتید گرانقدر **دکتر علی نیاپور**، **دکتر حامد حقی** و **دکتر الهام صفرزاده** که داوری این رساله را متقبل شدند.

فهرست اختصارات:

5-FU: 5- Fluorouracil

AGS cell line: A human gastric adenocarcinoma cell-line

DNA: deoxyribonucleic acid

GIST: A gastrointestinal stromal tumor

HER2: human epidermal growth factor receptor 2

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

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

فهرست مندرجات و ضمایم

صفحه	عنوان
۴	۱-مقدمه:.....
۴	۱-۱-مقدمه و بیان مسئله:.....
۷	۲-۱-اهداف طرح:.....
۷	۱-۲-۱-هدف کلی طرح:.....
۷	۲-۲-۱-اهداف اختصاصی طرح:.....
۸	۳-۱-فرضیات طرح:.....
۸	۴-۱-تعریف واژه های اختصاصی:.....
۱۱	۲- بررسی متون:.....
۱۱	۱-۲- کلیات :.....
۱۲	۲-۱-۲- سرطان معده:.....
۱۲	۲-۱-۲-۱- کلیات و اپیدمیولوژی:.....
۱۳	۲-۲-۱-۲- آسیب شناسی.....
۱۴	۲-۲-۱-۲-۳- سبب شناسی.....
۱۶	۲-۲-۱-۲-۴- تظاهرات بالینی.....
۱۷	۲-۲-۱-۲-۵- تشخیص.....
۱۷	۲-۲-۱-۲-۶- درمان آدنوکارسینوم معده.....
۱۹	۲-۳-۱-۲- داروی ۵-فلورواوراسیل.....
۲۱	۲-۴-۱-۲- آنتی اکسیدان ها.....
۲۱	۲-۴-۱-۲-۱- کلیات.....
۲۱	۲-۴-۱-۲-۲- آسکوربیک اسید.....
۲۳	۲-۵-۱-۲- miRNA.....
۲۴	۲-۲-پیشینه تحقیق:.....

۲۹	۳- مواد و روش کار:
۲۹	۳-۱- نوع مطالعه:
۲۹	۳-۲- جامعه آماری و روش نمونه گیری:
۲۹	۳-۳- متغیرها:
۳۰	۳-۴- روش تجزیه و تحلیل داده ها و بررسی آماری:
۳۰	۳-۵- ملاحظات اخلاقی:
۳۰	۳-۶- داروها:
۳۰	۳-۷- فهرست تجهیزات آزمایشگاهی مورد استفاده:
۳۲	۳-۸- فهرست ظروف و وسایل آزمایشگاهی مورد استفاده:
۳۳	۳-۹- فهرست مواد و ترکیبات شیمیایی مورد استفاده:
۳۴	۳-۱۰- طرح مطالعه:
۳۴	۳-۱۰-۱- کشت رده‌ی سلولی MKN45
۳۴	۳-۱۰-۲- انجمادزدایی سلولها
۳۵	۳-۱۰-۳- تعویض محیط کشت سلولها
۳۵	۳-۱۰-۴- پاساژ سلولی
۳۶	۳-۱۰-۵- فریز کردن سلولها
۳۶	۳-۱۰-۶- انجام شمارش سلولی
۳۷	۳-۱۰-۷- رده سلولی MKN-45 مقاوم به 5-FU
۳۸	۳-۱۰-۸- تعیین IC50
۳۸	۳-۱۰-۹- آزمایش MTT
۳۹	۳-۱۰-۱۰- استخراج RNA تام از سلول
۴۱	۳-۱۰-۱۱- ارزیابی کمی و کیفی RNA استخراج شده
۴۱	۳-۱۰-۱۲- طراحی پرایمر
۴۱	۳-۱۱- واکنش رونویسی معکوس RT-PCR (سنتز cDNA)

۴۱ سنتز cDNA برای مطالعه miRNAها
۴۲ مراحل سنتز cDNA
۴۳ Real-time PCR با استفاده از miRNAها
۴۳ Real-time PCR اصول روش
۴۴ روش کار ارزیابی کمی بیان miRNAها
۴۴ تعیین میزان زنده مانده سلولی سرطان معده MKN-45 پس از تیمار با آسکوربیک اسید
۴۸
۴۹ 45
۴۹ 45
۵۰ 45
۵۰ 45
۵۲ بحث: ۵-۵
۵۲ ۱-۵- تفسیر نتایج و مقایسه با سایر مطالعات:
۵۶ ۲-۵- نتیجه گیری کلی:
۵۷ ۳-۵- پیشنهادات:
۵۸ ۴-۵: ترجمان دانش
۶۰ منابع ۶-۶
۶۷ Abstract

فهرست جداول، اشکال و نمودارها

۲۰	تصویر ۲-۱
۲۱	تصویر ۲-۲
۲۷	جدول ۳-۱
۳۸	جدول ۳-۲
۳۸	جدول ۳-۳
۳۹	جدول ۳-۴
۴۰	جدول ۳-۵
۴۱	جدول ۳-۶
۴۳	نمودار ۴-۱
۴۴	نمودار ۴-۲
۴۳	نمودار ۴-۳

بررسی تغییرات بیان **miR-19** و **miR-508** در سلولهای سرطان معده مقاوم به ۵-فلورواوراسیل بعد از تیمار با اسید آسکوربیک

چکیده:

زمینه: سرطان معده یکی از شایع ترین سرطان ها در سراسر جهان است که میزان شیوع آن در ایران و به خصوص استان اردبیل بالا می باشد و میزان بقای ۵ ساله در بیمارانی که در مراحل انتهایی تشخیص داده میشوند بسیار پایین است. سرطان معده نسبت به روش های درمانی کنونی پاسخ محدودی دارد و اغلب نسبت به شیمی درمانی مقاومت نشان میدهد. بنابراین به عوامل درمانی جدید به شدت در درمان سرطان معده مورد نیاز است. استفاده از ترکیبات جدیدی که آبشارهای خاص سیگنالینگ مرتبط با افزایش بقا را هدف قرار می دهند و از تأثیرات مخرب مرتبط درمان های قبلی جلوگیری می کند قابل توجه است.

هدف: در این مطالعه تاثیر آسکوربیک اسید (ویتامین C) بر بیان micro-RNA های 508 و 19a دخیل در مقاوت دارویی در سلولهای سرطان معده MKN-45 مقاوم به ۵-فلورواوراسیل مورد بررسی قرار می گیرد

مواد و روش ها: طی این مطالعه از رده سلولی MKN-45 مقاوم به 5FU استفاده شد. سلول ها در غلظت های مختلف با اسیداسکوربیک تیمار شدند. میزان IC50 در بازه زمانی ۴۸ ساعت به وسیله آزمون MTT، ، میزان بیان miR-19 و miR-508 توسط real time PCR بررسی قرار گرفتند.

یافته ها: میزان IC50 در سلول های سرطانی MKN-45 با غلظت های مختلف اسیداسکوربیک تعیین شد و ما در این مطالعه نشان دادیم که غلظت ۷.۵ میلی مولار باعث کاهش معنی دار زنده مانی سلول ها در مقایسه با گروه کنترل شد. همچنین بررسی میزان

بیان miR-19a و miR-508 نشان داد که اسیدآسکوربیک باعث افزایش میزان بیان miR-508 و کاهش میزان بیان انکوژن miR-19a می‌گردد. $p < 0.05$ معنا دار در نظر گرفته شد.

نتیجه گیری: یافته های این مطالعه نشان داد که استفاده از اسیدآسکوربیک در دوزهای بالا می تواند در کاهش مقاومت دارویی به ۵- فلورواوراسیل در درمان بیماران مبتلا به سرطان معده موثر واقع بشود.

واژگان کلیدی: آسکوربیک اسید، مقاومت دارویی، microRNA، سرطان معده، ۵-

فلورواوراسیل