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 بیان ژن های مرتبط با اتوفاژی در سلول های MKN-45 مقاوم به ۵-فلورویوراسیل

نگارش:

مهدی رنجبر

اساتید راهنما:

دکتر کاظم نجاتی کشکی -دکتر امیراحمد عرب‌زاده

استاد مشاور:

دکتر حامد حقی امین جان

آبان ماه ۱۴۰۲

شماره پایان‌نامه:

۰۱۰۸۱

بسم الله الرحمن الرحیم

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 بیان ژن های مرتبط با اتوفاژی در سلول های MKN-45 مقاوم به ۵-فلورویوراسیل

نگارش:

مهدی رنجبر

اساتید راهنما:

دکتر کاظم نجاتی کشکی -دکتر امیراحمد عرب‌زاده

استاد مشاور:

دکتر حامد حقی امین جان

آبان ماه ۱۴۰۲

شماره پایان‌نامه:

۰۱۰۸۱

تقدیم به

خانواده ام که همیشه پشت وپناهم بودند...

تشکر و قدردانی

حمد و سپاس پروردگار را که اندیشیدن را به بشر ارزانی داشت ، تا با کنکاش در تمام اسرار آفرینش یکایک ذرات هستی را جلوه ای از حق بداند و از جهل و نادانی دوری گزیند .پروردگاری که رحمت مداوم و بی پایانش بر من در تمام زندگانی نثار گشت و فرصتی ارزشمند فراهم گردید تا در محضر اساتید گرانبها در حد توان اندیشه و فکر خویش به کسب علم و معرفت بپردازم و نیز الطاف و عنایت بی حدش افزون تر از پیش حاصل شد تا سختی تحصیل و پژوهش آسان گردد.

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 اقای دکتر جدی و خانم دکتر فتحی که داوری این رساله را متقبل شدند .

فهرست مطالب

چکیده:..... ۱

۱- مقدمه ۴

۱-۱- مقدمه و بیان مسئله: ۴

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 ۱۱

۱-۳- تعریف واژه های اختصاصی ۱۲

۲- مروری بر متون.....۱۴

۲-۱- سرطان ۱۴

۲-۲- سرطان معده ۱۵

۲-۳- طبقه بندی سرطان معده ۱۶

۲-۴- اپیدمیولوژی ۱۸

۲-۵- اتیولوژی ۱۹

۲-۶- عوامل خطرساز سرطان معده ۲۱

۲-۷- غربالگری سرطان ۲۲

۲-۸- تظاهرات بالینی آدنوکارسینوم معده ۲۳

۲-۹- فلورواوراسیل ۲۶

۱-۹-۲- اولئوروپین ۲۸
۱-۱-۹-۲- مکانیزم ضدسرطانی ۲۹
۱۰-۲-پیشینه تحقیق: ۲۹
۳- مواد و روش کار ۳۴
۱-۳- نوع پژوهش ۳۴
۲-۳- مکان انجام مطالعه: ۳۴
۳-۳- جامعه آماری و روش نمونه گیری: ۳۴
۴-۳- متغیر ها: ۳۴
۵-۳- روش گردآوری اطلاعات: ۳۵
۶-۳- روش تجزیه و تحلیل داده ها و بررسی آماری: ۳۶
۷-۳- ملاحظات اخلاقی: ۳۶
۸-۳- داروها: ۳۶
۹-۳-تجهیزات مورد نیاز ۳۷
۱۰-۳-مواد مورد نیاز ۳۷
۱۱-۳آماده سازی محیط کشت RPMI 1640 ..... ۳۹
۱-۱۱-۳ کشت و آماده‌سازی سلول MKN-45 ..... ۴۰
۲-۱۱-۳شمارش سلولی و تخمین IC50 داروی ۵-FU با انجام تست MTT ۴۰
۳-۱۱-۳ مقاوم‌سازی رده سلولی سرطان معده براساس پروتکل بالینی ۴۳
۴-۱۱-۳ تخمین IC50 داروی Oleoreupien با انجام تستMTT ۴۴
۵-۱۱-۳ ساخت داربست نانوفیبری حاوی اولئوروپین و بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن ۴۵
۶-۱۱-۳ تکثیر سلولها بر روی داربست و تیمار با دارو ۴۹
۷-۱۱-۳بررسی میزان تکثیر سلولها روی داربست با تکنیک MTT ۴۹
۸-۱۱-۳ استخراج RNA ۵۰

۳-۱۱-۹ بررسی کیفیت RNA استخراج شده ۵۳
۳-۱۱-۱۰ سنتز cDNA ۵۵
۳-۱۱-۱۱ طراحی پرایمر ها ۵۹
۳-۱۱-۱۲ تکنیک Real Time PCR ۶۰
۳-۱۱-۱۳ آنالیز منحنی ذوب ۶۵
۳-۱۱-۱۴ آنالیز نسبت بیان ژن ۶۶

۴- نتایج: ۳۸

۴-۱نتایج کشت سلول ۳۸

۴-۱-۱ سنتز داربست و بررسی مورفولوژی آن با SEM و FTIR و نرم افزار Imagej ۳۸
۴-۱-۲ میزان تکثیر سلول‌ها روی داربست طی روزهای سوم و هفتم ۴۲

۴-۲ نتایج استخراج RNA ۴۴

۴-۳ بررسی بیان ژن های Beclin-1 و LC3 ..... 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

۶- منابع ۷۲

فهرست اشکال، جداول و نمودارها

شکل ۱-۱ نقش اتوفاژی در گرسنگی، سرکوب تومور و ارتقای تومور.....۸

شکل ۱-۲ ساختار ۵-فلورواوراسیل ۲۷

تصویر ۲-۲. ساختار مولکولی اولئوروپین ۲۸

تصویر ۳-۲. مسیرهای سیگنالینگ متاثر از اولئوروپین ۲۹

جدول ۱-۳. جدول متغیرات ۳۴

جدول ۲-۳. وسایل مورد نیاز.....۳۶

جدول ۳-۳. تجهیزات مورد نیاز ۳۷

جدول۴-۳ مواد مورد نیاز ۳۸

شکل ۱-۳ محیط کشت RPMI 1640 .....۳۹

شکل ۲-۳ شمارش سلولی با لام نئوبار ۴۲

جدول ۵-۳ پارامترهای داخلی دستگاه الکتروریسی ۴۶

شکل ۳-۳ پلی کاپورلاکتون (POLYCAPROLACTONE).....۴۷

شکل ۴-۳ پلی اتیلن گلیکول (POLYETHYLENE GLYCOL).....۴۸

شکل ۵-۳ دستگاه الکترواسپینینگ ۴۸

شکل ۳-۶ ELISA READER ۵۰

شکل ۳-۷ کشت سلولها در پلیت ۶ خانه ۵۱

شکل ۳-۸ دستگاه نانودراپ ۵۴

شکل ۳-۹ الکتروفورز ۵۵

جدول ۳-۶ مواد و مقادیر موردنیاز آن‌ها جهت سنتز CDNA ژن‌های هدف طبق پروتکل یکتا تجهیز ۵۶

جدول ۳-۷ مواد و مقادیر موردنیاز آن‌ها جهت سنتز CDNA ژن‌های هدف طبق پروتکل یکتا تجهیز ۵۷

جدول ۳-۸ برنامه دمایی سنتز CDNA ۵۸

شکل ۳-۱۰ کیت سنتز CDNA.....۵۸

شکل ۳-۱۱ THERMAL CYCLER ۵۹

جدول ۳-۹ .توالی پرایمر ژن‌های مورداستفاده درRT-PCR ۶۰

جدول ۳-۱۰ مواد و مقادیر استفاده شده در REAL TIME PCR.....۶۱

جدول ۳-۱۱ زمانبندی دمایی REAL TIME PCR ۶۳

شکل ۳-۱۲ مسترمیکس REAL TIME PCR ۶۴

شکل ۳-۱۳ REAL TIME PCR WORK STATION ۶۴

شکل ۳-۱۴ LIGHT CYCLER..... ۶۵

شکل ۴-۱ سلولهای MKN-45..... ۳۸

شکل ۴-۲ مراحل سنتز داربست نانوفایبری PCL-PEG ۳۹

شکل ۴-۳ نتایج سنتز داربست نانوفایبری PCL-PEG بدون دارو ۳۹

شکل ۴-۴ نتایج سنتز داربست نانوفایبری PCL-PEG با دارو ۴۰

شکل ۴-۵ نتایج حاصل از طیف سنجی FTIR ۴۱

شکل ۴-۶ میزان زنده مانی سلول های MKN-45 مقاوم به دارو ۴۳

شکل ۴-۷ میزان زنده مانی سلول های MKN-45 غیرمقاوم به دارو ۴۳

جدول ۴-۱ بررسی استخراج RNA با دستگاه نانودراپ ۴۴

شکل ۴-۸ بررسی استخراج RNA به وسیه ژل الکتروفورز ۴۵

شکل ۴-۹ میزان بیان ژن های LC3 II و BECLIN-1 در رده سلولی MKN-45 غیر مقاوم به دارو ۴۶

شکل ۴-۱۰ میزان بیان ژن های LC3 II و BECLIN-1 در رده سلولی MKN-45 مقاوم به دارو ۴۶

اختصارات:

DNA: deoxyribonucleic acid

MTT:3-(۴,۵-Dimethylthiazol-2-yl)-2,۵-Diphenyltetrazolium Bromide

PBS: Phosphate-buffered saline

qRT-PCR: Quantitative Real-time PCR

RNA: Ribonucleic acid

Rpm: revolutions per minute

miRNA: MicroRNA

DMSO: Dimethyl Sulfoxide

IC_{50}: half-maximal inhibitory concentration

ng: nano gram

ml: mili litter

بررسی تاثیر داربست نانوفیبری بارگذاری شده با ماده اولئوروپین بر القای بیان ژن های مرتبط بااتوفاژی 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 ۵-**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: هدف این مطالعه بررسی تاثیر داربست نانوفیبری بارگذاری شده با ماده اولئوروپین بر القای مرگ بیان ژن های مرتبط با اتوفاژی در سلول های **MKN-45** مقاوم به ۵-فلورویوراسیل می باشد.

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 اتوفاژی(**LC3،Beclin-1**) با استفاده از روش **Real-time PCR** در سلول‌های **MKN-45** مقاوم به ۵-**FU** در شرایط برون تنی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: در این مطالعه از داربست نانوفایبری **PCL-PEG** برای بارگیری داروی اولئوروپین 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 **MTT** هفت روزه قابل تایید است. همچنین طبق نتایج حاصل از **MTT** ترکیب دو داروی ۵-فلورویوراسیل و اولئوروپین بارگزاری شده در داربست **PCL-PEG**، فعالیت سایتوتوکسیسیته بالاتری نسبت به سایر گروه ها از خود نشان داد.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ترکیب دو داروی ۵-فلورویوراسیل و داروی اولئوروپین 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، اولئوروپین، ۵-فلورواوراسیل، داربست نانوفایبری، مقاومت دارویی، **LC3**، **Beclin-1** ، اتوفاژی