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 ترکیب کورکومین با پاکلی تاکسل بر روی مقاومت دارویی و بیان miR-148a و ژن های هدف آن در سلول های بنیادی بیان کننده CD44 جداشده از رده سلولی سرطان پروستات PC3

نگارش:

محمدامین وطن خواه

اساتید راهنما:

دکتر نوروز نجف زاده

دکتر امیراحمد عرب زاده

اساتید مشاور:

دکتر فرهاد جدی

دکتر کاظم نجاتی کشکی

بهمن ماه ۱۴۰۲

شماره پایان نامه:۰۹۵۲

گواهی اصالت پایان نامه

باسمه 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، ماحصل آموخته هایم را تقدیم می کنم به آنان که مهرآسمانی شان آرام بخش آلام زمینی است

به استوارترین تکیه گاهم، دستان پرمهر پدرم

به سبزترین نگاه زندگیم ،چشمان سبز مادرم

به همسفر مهربان زندگیم ،خواهر 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 قدردانی

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 نوروز نجف زاده** 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 استادان گرانقدرم، **دکتر امیر احمد عرب زاده، دکتر فرهاد جدی** و **دکتر کاظم نجاتی** که از همکاری و راهنمایی های علمی شان بهره جسته‌ام. سپاس از اساتید گرانقدر **آقای دکتر علی نیاپور، آقای دکتر رامین سلیم نژاد و خانم دکتر نرگس سوزنگر** که داوری این رساله را متقبل شدند.

سپاس از دوست عزیزم **آقای دکتر رضا پناهی زاده** که همواره نگارنده را مورد لطف و محبت خود قرار داه اند و وجودشان شادی بخش و صفایشان مایه آرامش بود.

فهرست مقالات منتشر شده:

Vatankhah MA, Panahizadeh R, Nejati-Koshki K, Arabzadeh M, Arabzadeh AA, Najafzadeh N. Curcumin Upregulates miR-148a to Increase the Chemosensitivity of CD44-Positive Prostate Cancer Stem Cells to Paclitaxel Through Targeting the MSK1/IRS1 axis. Drug Res (Stuttg). 2022 Oct;72(8):457-465. doi: 10.1055/a-1867-4805. Epub 2022 Jul 22. PMID: 35868335.

فهرست مطالب

چکیده: ۱

۱-مقدمه: ۴

۱-۱-مقدمه و بیان مسئله: ۴

۱-۲-اهداف طرح: ۱۴

۱-۲-۱- هدف کلی طرح: ۱۴

۱-۲-۲- اهداف اختصاصی طرح: ۱۴

۱-۲-۳-فرضیات طرح: ۱۵

۱-۳-تعریف واژه های اختصاصی: ۱۶

۲- بررسی متون: ۱۶

۲-۱-سرطان پروستات: ۱۶

۲-۲-پاکلی تاکسل: ۱۹

۲-۳-سلول های بنیادی سرطان: ۲۰

۲-۴-مارکرهای سلول های بنیادی: ۲۱

۲-۵-miR-148a: ۲۳

۲-۷-مطالعات جهان: ۲۶

۳- مواد و روش کار: ۳۴

۳-۱-نوع پژوهش: ۳۴

۳-۲-مکان انجام مطالعه: ۳۴

۳-۳- جامعه آماری و روش نمونه گیری: ۳۴
۳-۴-متغیر ها: ۳۵
۳-۵-روش گردآوری اطلاعات: ۳۷
۳-۶-روش تجزیه و تحلیل داده ها و بررسی آماری: ۳۷
۳-۷-ملاحظات اخلاقی: ۳۷
۳-۸-داروها: ۳۸
۳-۹-فهرست تجهیزات آزمایشگاهی مورد استفاده: ۳۸
۳-۱۰-فهرست وسایل و ظروف آزمایشگاهی مورد استفاده: ۳۹
۳-۱۱-فهرست مواد، ترکیبات شیمیایی مورد استفاده در تحقیق: ۴۱
۳-۱۲-روش تهیه مواد استفاده شده در مطالعه: ۴۲
۳-۱۲-۱-روش تهیه ی۱ لیتر محیط کشت RPMI-1640: ۴۲
۳-۱۲-۲-روش تهیه ی ۱ لیتر محلول PBS(1X): ۴۲
۳-۱۲-۳-روش تهیه ی تریپسین-EDTA: ۴۳
۳-۱۲-۴-روش تهیه ی رنگ MTT: ۴۳
۳-۱۲-۵-روش تهیهی محلول پارافرمالدهید۴٪: ۴۴
۳-۱۲-۶-روش تهیهی ۲۰۰ میلیلیتر محلول Blocking برای ایمونوسیتوشیمی: ۴۴
۳-۱۲-۷- نحوه تهیه بافر جدا کننده مورد استفاده در MACS: ۴۵
۳-۱۳-کشت سلولی: ۴۵
۳-۱۳-۱-نحوه ی پاساژ دادن سلول ها: ۴۵
۳-۱۳-۲-تعویض محیط کشت سلول: ۴۶

۳-۱۴-روش انجام تکنیک MACS (Magnetic Activate Cell Sorting): ۴۷
۳-۱۵-روش MTT: ۴۹
۳-۱۶-رنگ آمیزی DAPi: ۵۰
۳-۱۷-ایمونوسیتوشیمی: ۵۱
۳-۱۷-۱-کشت و تیمار سلول: ۵۱
۳-۱۷-۲-محلولسازی: ۵۱
۳-۱۷-۳-رقیقسازی آنتیبادی: ۵۲
۳-۱۷-۴-طریقهی انجام تکنیک ایمونوسیتوشیمی: ۵۲
۳-۱۸-بررسی بیان ژن با روش real time PCR: ۵۳
۳-۱۸-۱-کشت سلولی: ۵۳
۳-۱۸-۲-استخراج RNA: ۵۴
۳-۱۸-۳-اندازه گیری مقدار RNA استخراج شده: ۵۶
۳-۱۸-۴-سنتز cDNA از RNA استخراج شده: ۵۶
۳-۱۸-۵-Real Time PCR: ۵۷
۴- یافته ها: ۶۰
۴-۱-کورکومین باعث افزایش اثرات ضد سرطانی پاکلی تاکسل در سلول های $CD44^+$ سرطان پروستات می شود ۶۰
۴-۲-کورکومین باعث افزایش میزان آپوپتوز در سلول های $CD44^+$ سرطان پروستات می شود ۶۲
۶۴

۴-۳-ترکیب کورکومین با پاکلی تاکسل باعث کاهش میزان بیان پروتئین های P-gp و CD44 در سلول های $CD44^+$ سرطان پروستات می شود ۶۵
۴-۴- تاثیر کورکومین، پاکلی تاکسل و ترکیب آن ها بر روی میزان بیان miR-148a، MSK1 و IRS1 در سلول های $CD44^+$ سرطان پروستات..... ۶۸
۵-بحث و نتیجه گیری:..... ۷۰
۵-۱-بحث: ۷۰
۵-۲- محدودیت مطالعه: ۷۶
۵-۳-نتیجه گیری : ۷۷
۵-۴-پیشنهادات: ۷۸
۵-۵-ترجمان دانش: ۷۹
6- منابع: ۸۱

فهرست جداول و تصاویر

جدول ۱-۳. جدول متغیرات ۳۵
جدول ۲-۳. مراحل سنتز cDNA ۵۷
جدول ۳-۳: مقادیر و مواد لازم برای انجام real time PCR ۵۹
جدول ۴-۳: شرایط دمایی واکنش Real-time PCR ۵۹
تصویر ۱-۴. میزان مهار رشد رده سلولی های +CD44 پس از تیمار با کورکومین و پاکلی تاکسل با روش MTT ۶۱
تصویر ۲-۴. میزان آپوپتوز سلول های +CD44پس از تیمار با کورکومین با رنگ آمیزی DAPi ۶۳
تصویر ۳-۴. میزان آپوپتوز سلول های +CD44 پس از تیمار با پاکلی تاکسل و ترکیب کورکومین با پاکلی تاکسل با رنگ آمیزیDAPi ۶۴
تصویر ۴-۴. میزان بیان پروتئین P-gp در سلول های $CD44^{+}$ پس از تیمار با کورکومین، پاکلی تاکسل و ترکیب آن ها با رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی ۶۶
تصویر ۵-۴. میزان بیان پروتئین CD44 در سلول های $CD44^{+}$ پس از تیمار با کورکومین، پاکلی تاکسل و ترکیب آن ها با رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی ۶۷
تصویر ۶-۴. میزان بیان mir-148a، MSK1 و IRS1 در سلول های +CD44 سرطان پروستات پس از تیمار با کورکومین، پاکلی تاکسل و ترکیب آن ها با Real time PCR . ۶۹

فهرست اختصارات:

µM: micro Molar

CSC: Cancer Stem Cell

DAPI: DAPI (4′,6-diamidino-2-phenylindole) is a blue-fluorescent DNA stain that exhibits ~20-fold enhancement of fluorescence upon binding to AT regions of dsDNA.

DMSO: Dimethyl Sulfoxide

DNA: deoxyribonucleic acid

EDTA: Ethylene di amine tetra acetic acid

IC_{50}: half-maximal inhibitory concentration

MACS: Magnetic activating cell sorting

miRNA: MicroRNA

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

ng: nano gram

PBS: Phosphate-buffered saline

PC3 cell line: A human prostate cancer cell-line

qRT-PCR: Quantitative Real-time PCR

RNA: Ribonucleic acid

Rpm: revolutions per minute

UV: Ultraviolet

بررسی تاثیر ترکیب کورکومین با پاکلی تاکسل بر روی مقاومت دارویی و بیان miR-148a و ژن های هدف آن در سلول های بنیادی بیان کننده CD44 جداشده از رده سلولی سرطان پروستات PC3

چکیده:

زمینه: سرطان پروستات دومین عامل مرگ ناشی از سرطان در بین مردان می باشد. مقاومت به پاکلی تاکسل یک چالش بزرگ در موارد پیشرفته سرطان پروستات است. کورکومین به عنوان یک آنتی اکسیدان طبیعی نقش بسیار مهمی در افزایش سایتوتوکسیسیته سلول های بنیادی سرطان ایفا می کند.

هدف: هدف از این مطالعه تعیین اثر کورکومین در کاهش مقاومت دارویی نسبت به پاکلی تاکسل از طریق تنظیم بیان miR-148a و ژن های هدف آن در سلول های بنیادی سرطان پروستات می باشد.

مواد و روش ها: برای تعیین میزان بقای سلولی از روش های MTT و رنگ آمیزی DAPi استفاده شد. برای بررسی میزان بیان پروتئین های P-gp و CD44 از رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی استفاده شد. در نهایت برای ارزیابی تاثیر کورکومین و پاکلی تاکسل بر روی میزان بیان miR-148a و ژن های هدف آن از روش Real time PCR استفاده شد.

نتایج: ترکیب کورکومین و پاکلی تاکسل در مقایسه با پاکلی تاکسل به تنهایی به صورت قابل توجه باعث کاهش میزان IC50 در سلول های $CD44^+$ گردید. هم چنین ترکیب این داروها با یک دیگر باعث افزایش میزان آپوپتوز در سلول های سرطان پروستات شد. نتایج مطالعات ما هم چنین نشان داد زمانی که کورکومین و پاکلی تاکسل با یک دیگر ترکیب شدند، میزان بیان CD44 و P-gp در مقایسه با پاکلی تاکسل تنها کاهش پیدا کرد. تیمار هم زمان سلول های سرطانی با کورکومین و پاکلی تاکسل میزان بیان miR-148a را افزایش و میزان بیان ژن های هدف آن شامل MSK1 و IRS1 را کاهش داد.

نتیجه گیری: کورکومین باعث بهبود حسساسیت سلول های سرطان پروستات نسبت به پاکلی تاکسل از طریق افزایش بیان miR-148a و کاهش بیان ژن های هدف آن می شود.

کلمات کلیدی: سرطان پروستات، کورکومین، پاکلی تاکسل، miR-148a، MSK1، IRS1، مقاومت دارویی