





دانشگاه آزاد اسلامی
واحد پزشکی تهران

پایان نامه :

جهت دریافت دکترای پزشکی

موضوع :

بررسی فعالیت ضدسرطانی اولئانولیک اسید ترپنوئیدی جدا شده از پوست سیب با

استفاده از سلولهای سرطانی لنفوم B خون انسان

استاد راهنما:

جناب آقای دکتر مهرداد هاشمی

استاد مشاور:

سرکار خانم دکتر ملیحه انتظاری

نگارش:

عیسی یزدانی

شماره پایان نامه : ۴۸۳۴

تابستان ۱۳۹۰



Islamic Azad University

Tehran Medical Branch

Thesis:

For Doctorate of Medicine

Subject:

**Anti-cancer effect of Oleanolic terpenoid acid extracted from
apple on human B-cell lymphoma**

Thesis Adviser:

Dr. Mehrdad Hashemi

Consultant Adviser:

Dr. Maliheh Entezari

Written by:

Issa Yazdani

Summer 2011

No. 4834

تقدیم به

پدر و مادر بسیار عزیزم

که همواره مدیون و مرهون الطاف و محبت های بی دریغ آنها بوده

و هستم.

تقدیم به اساتید بسیار گرانقدرم،

جناب آقای دکتر مهرداد هاشمی

و

سرکار خانم دکتر ملیحه انتظاری

به خاطر تمام آنچه در محضر ایشان آموختم.

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۱	چکیده فارسی
۲	فصل اول: کلیات تحقیق
۷	فصل دوم: مروری بر ادبیات تحقیق و پیشینه تحقیق
۲۵	فصل سوم: روش اجرای تحقیق
۴۳	فصل چهارم: یافته ها
۴۷	فصل پنجم: نتیجه گیری و پیشنهادات
۵۱	فهرست منابع
۵۳	چکیده انگلیسی

فهرست جداول

صفحه	عنوان
۳۳	جدول ۱: تغییر رنگ فنل قرمز در محیطهای اسیدی و بازی
۴۴	جدول ۲- OD های خوانده شده توسط دستگاه الایزا ریدر

فهرست نمودارها

صفحه

عنوان

۴۵

نمودار ۱- OD های خوانده شده توسط دستگاه الیزا ریدر

۴۶

نمودار ۲- میانگین توان حیاتی سلولهای سرطانی تحت تیمار و غلظت های مختلف اسید اولنانولیک

فهرست اشکال

صفحه

عنوان

۴۰

شکل ۱- مراحل انجام کار در طی مطالعه

بررسی فعالیت ضدسرطانی اولئانولیک اسید ترپنوئیدی جدا شده از پوست سیب با

استفاده از سلولهای سرطانی لنفوم B خون انسان

دانشجو: عیسی یزدانی استاد راهنما: جناب آقای دکتر مهرداد هاشمی

استاد مشاور: سرکار خانم دکتر ملیحه انتظاری

تاریخ دفاع: شماره پایان نامه: ۴۸۳۴ کد شناسایی پایان نامه: ۱۳۶۱۰۱۰۱۸۹۲۰۰۶

هدف: این مطالعه به منظور بررسی فعالیت ضدسرطانی اولئانولیک اسید ترپنوئیدی جدا شده از

پوست سیب با استفاده از سلولهای سرطانی لنفوم B خون انسان انجام شده است.

روش مطالعه: این تحقیق بصورت تجربی (Experimental) و *in vitro* انجام شده است و در آن

کشت سلولهای لنفوم B و MTT و بررسی توان حیاتی Viability سلولهای مذکور انجام شد.

یافته ها: میانگین توان حیاتی مشاهده شده در گروه کنترل ۱۰۰ درصد و در رقت ۱ میکرولیتر،

۸۹/۹۰ درصد، در رقت ۱۰ میکرولیتر ۶۸/۴۹ درصد و در رقت ۵۰ میکرولیتر ۴۳/۸۳ درصد

بود که بر اساس آزمون آنالیز واریانس یک سویه، اختلاف آماری معناداری را نشان می داد ($P < 0.0001$).

رقت ۴۰ میکرولیتر به عنوان IC_{50} در نظر گرفته شد.

نتیجه گیری: در مجموع بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه و مقایسه آنها با سایر مطالعات مشابه

صورت گرفته در این زمینه، چنین استنباط می شود که از آنجایی که اولئانولیک اسید ترپنوئیدی

جدا شده از پوست سیب اثرات ضدسرطانی بسیار خوبی دارد، اقدامات لازم در جهت ترویج

فرهنگ استفاده از میوه ها به ویژه سیب به عنوان یک میوه مفید صورت گیرد.



مقدمه و بیان اهمیت مسئله:

سرطان بیماری ای است که در آن سلول‌های بدن در یک تومور بدخیم به طور غیر عادی تقسیم و تکثیر می‌شوند و بافت‌های سالم را نابود می‌کنند. سلول‌های سرطانی از ساز و کارهای عادی تقسیم و رشد سلول‌ها جدا می‌افتند. علت دقیق این پدیده نامشخص است؛ ولی احتمال دارد عوامل ژنتیکی یا عوامل بیرونی همچون ویروس و مواد سرطانزا موثر باشد. در یک جاندار سالم، همیشه بین میزان تقسیم سلول، مرگ سلولی و تمایز، یک تعادل وجود دارد. در حال حاضر سرطان یکی از علل عمده مرگ و میر در جهان می‌باشد که در سنین مختلف وجود دارد ولی احتمال بروز آن با افزایش سن افزایش می‌یابد. بطوری که بر طبق گزارش انجمن بهداشت آمریکا سالیانه ۱۵ میلیون از مردم جهان دچار سرطان می‌شوند که تقریباً ۶,۲ میلیون نفر در اثر سرطان فوت می‌کنند و ۱۳٪ از کل ۵۸ میلیون مرگ در سراسر جهان را بخود اختصاص می‌دهد بیش از ۷۰٪ تمام مرگ‌ها ناشی از سرطان در کشور های کم در آمد یا با در آمد متوسط اتفاق می‌افتد (۱).

سرطان یک بیماری هتروژن می‌باشد که بوسیله یک توده سلول بدخیم مشخص شده که منجر به خراب شدن عملکرد فیزیولوژیک نرمال سلول‌ها می‌شود. سلول‌های تومورال اغلب تغییرات مضاعفی در تشکیلات آپوپتوز ایجاد می‌کنند که منجر به افزایش سطوح رشد و تکثیر سلول‌ها می‌شود. سرنوشت سلول در هر زمان، بوسیله فاکتورهای رشد، پیام‌های محیطی و برخی پروتئین‌ها و پیامبرهای سلولی، کنترل می‌شود. جهش‌هایی که منجر به تغییر هر یک از فاکتورهای

موثر در سرنوشت سلول، می‌شوند باعث بهم خوردن نظم دقیقی که در تنظیم رشد و تکثیر و تمایز سلول ها وجود دارد می‌شود و می‌تواند منجر به بروز سرطان شود. سلول‌های سرطانی کنترل خود را بر چرخه سلولی از دست داده و به طور مداوم و بدون توجه به پیام‌های سلولی و فاکتورهای رشد، به تکثیر ادامه می‌دهند. فاکتورهایی که نقص در آنها منجر به از دست رفتن کنترل رشد و تکثیر سلول‌ها و بروز سرطان می‌شوند به دو دسته تقسیم می‌شوند: انکوپروتئین‌ها و پروتئین‌های سرکوبگر تومور. بر طبق برآوردهای انجام شده ممکن است بیش از ۷۵٪ سرطان‌ها دارای منشاء محیطی باشد که می‌توان آلودگی، دخانیات، مواد غذایی، الکل، برخی پرتوها و نیز رشد و تکثیر ویروس‌ها را نام برد. آسیب‌ها و تغییرات ژنتیکی ایجاد شده در توالی DNA و بروز جهش در ژن‌ها و دیگر تغییرات در ساختار کروموزومی در سرطان‌های نقش بسزایی دارند. بسیاری از مواد جهش‌زا و سرطان‌زا از طریق رادیکال‌های آزاد از جمله گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species {ROS}) اثر تخریبی خود را نشان می‌دهند موادی که بعنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کنند، می‌توانند آثار زیان‌بار ROS را کاهش دهند؛ لذا مصرف اسیدهای چرب دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند دفاع و ایمنی بدن را در مقابل تولید رادیکال‌های آزاد افزایش داده و بعنوان ضد سرطان عمل کند (۱ و ۲). بر همین اساس در این مطالعه به بررسی فعالیت ضدسرطانی اولئانولیک اسید ترپنوئیدی جدا شده از پوست سیب با استفاده از سلول‌های سرطانی لنفوم B خون انسان پرداختیم.

اهداف

هدف کلی

تعیین فعالیت ضدسرطانی اولئانولیک اسید ترپنوئیدی جدا شده از پوست سیب با استفاده از سلولهای

سرطانی لنفوم B خون انسان

اهداف ویژه/فرعی

۱- تعیین توزیع فراوانی دوز موثر با بیشترین اثر ضدسرطانی

اهداف کاربردی

ارائه راهکارهایی مناسب جهت کاهش میزان بروز سرطان در جامعه

سوالات

۱. آیا اولئانولیک اسید ترپنوئیدی جدا شده از پوست سیب اثر ضد سرطانی دارد؟

۲. دوز موثر اولئانولیک اسید ترپنوئیدی جدا شده از پوست سیب با بیشترین اثر ضدسرطانی چه

دوزی می باشد؟

فرضیات

اولئانولیک اسید ترپنوئیدی جدا شده از پوست سیب اثر ضد سرطانی دارد.

تعریف واژه ها

- اسید اولئانولیک:

از جمله اسیدهای چرب ترپنوئیدی موجود در پوست سیب.

- اثر ضد سرطانی:

اثر همراه با کاهش تعداد سلولهای سرطانی به صورت In Vitro.

فصل دوم

مروری بر ادبیات تحقیق و پیشینه تحقیق

بررسی متون:

سیستم لنفاوی یک شبکه بهم پیوسته از عروق، غدد و اندامهای اختصاصی است که نقش های متعددی من جمله عملکرد دفاعی دارد و لنفوم بیماری بدخیم این سیستم می باشد. در این بیماری، سلولهای سیستم لنفاوی دچار اختلال در رشد شده، به سرعت و خارج از کنترل و نظم طبیعی سلولهای بدن تکثیر می شوند. به همین دلیل، مکانهای تجمع این سلولها دچار رشد بی رویه می گردد. به دلیل اینکه سلولهای سیستم لنفاوی در تمام نقاط بدن پراکنده هستند، این بدخیمی ممکن است کبد، طحال، مغز استخوان یا هر جای دیگر بدن را مبتلا نماید (۱).

لنفوم نوعی بدخیمی است که در لنفوسیتها ایجاد می شود. لنفوم غیر هوچکین در هر سنی می تواند بروز کرده و علایم آن به صورت بزرگی غدد لنفاوی، تب و کاهش وزن است. لنفوم هوچکین انواع مختلفی دارد. این بیماری به انواع مهاجم (با رشد سریع) و انواع با رشد آهسته تقسیم بندی شده و منشأ آن می تواند از سلول های B یا سلول های T باشد. لنفوم غیر هوچکین سلول B شامل لنفوم بورکیت، لوسمی لنفوسیتی مزمن، لنفوم سلول B بزرگ منتشر، لنفوم فولیکولر، لنفوم سلول بزرگ ایمنوبلاستیک، لنفوم پیش ساز سلول B و لنفوم سلول مانتل است. لنفوم غیر هوچکین سلول T شامل مایکوزیس فونگوئیدس، لنفوم سلول بزرگ آناپلاستیک و لنفوم پیش ساز سلول T است. لنفومی که بعد از پیوند مغز استخوان یا سلول های بنیادی ایجاد می شود معمولاً از نوع سلول B است. پیش آگهی و درمان به نوعی بیماری و مرحله آن بستگی دارد. لنفومها به دو دسته اصلی تقسیم می شوند: لنفوم هوچکین (Hodgkin's Lymphoma) و لنفوم غیر هوچکین (Non-Hodgkin's Lymphoma).

(Hodgkin's Lymphoma). تفاوت این دو بیماری در نوع و سرمنشاء سلول بدخیم است. علاوه

براین، سیر این دو بیماری و پاسخ آنها به درمان نیز تفاوت قابل توجهی نشان می دهد (۳ و ۴).

لنفوم هوچکین

این بیماری اولین بار در سال ۱۸۳۲ توسط توماس هوچکین که یک پزشک انگلیسی بود شرح داده

شد. دکتر هوچکین همچنین برای اولین بار تفاوت بین علائم و سیر بالینی لنفوم هوچکین و غیر

هوچکین را به روشنی نشان داد. لنفوم هوچکین در سالهای قبل از ۱۹۷۰ سبب مرگ تقریباً تمام

مبتلایان می شد. با تکامل روشهای درمانی، در حال حاضر این بیماری یکی از قابل درمان ترین

بدخیمی هاست و قسمت عمده ای از بیماران مبتلا قابل علاج کامل هستند. علت این بیماری

مشخص نیست. ممکن است عواملی از محیط، خصوصیات ژنتیک فرد و همچنین عوامل عفونی

در ایجاد بیماری دارای نقش باشند. سیر بیماری لنفوم از یک غده لنفاوی که بصورت پایدار بزرگ

شده است شروع می شود. رشد این غده به آهستگی ادامه می یابد و به تدریج غدد اطراف خود را

نیز درگیر می نماید. در موارد پیشرفته، با ورود سلولهای بدخیم به جریان خون، طحال، کبد و مغز

استخوان نیز ممکن است درگیر شوند. لنفوم هوچکین ممکن است در هر سنی بروز نماید. اما اکثر

موارد در سالهای اول بلوغ (۱۵ تا ۴۰ سالگی) یا در میانسالی (پس از سن ۵۵ سال) دیده می

شود. علائم اولیه این بیماری ممکن است مشابه انفلوآنزا باشد: تب، تعریق شبانه، لرز، احساس

خستگی و ضعف، بی اشتها، کاهش وزن و بزرگ شدن غدد لنفاوی. با پیشرفت بیماری، علائم

بارزتر شده، تشکیل غدد جدید و بزرگ شدن آنها سبب تاثیر بر اندامهای مختلف بدن می شود. باید

دانست که در ۷۵٪ بیماران، علامت بیماری تنها بزرگ شدن غده لنفاوی بدون هیچ علامت دیگر است. از این رو، باید غدد لنفاوی بزرگ بدون درد، حساسیت و قرمزی که مدتی پایدار مانده باشد را جدی تلقی کرده، برای درمان آن به پزشک مراجعه نمود. تشخیص این بیماری با برداشت قطعه ای از غده غیر طبیعی و بررسی ساختمان سلولهای تشکیل دهنده آن با استفاده از میکروسکوپ انجام می شود. درمان این بیماری با شیمی درمانی ترکیبی از چند دارو، اشعه درمانی یا ترکیب آنها انجام شده، تقریباً در ۹۰٪ موارد سبب شفای کامل بیمار می شود (۱، ۳، ۴).

لنفوم غیر هوچکین

این بیماری مجموعه ای از حدود ۳۵ بیماری مختلف را تشکیل می دهد که همگی حاصل بدخیم شدن لنفوسیت های طبیعی هستند. لنفوم های غیر هوچکین بر اساس اینکه از لنفوسیت های B یا T منشاء گرفته باشند، به دو دسته بزرگ تقسیم می شوند. در این گروه ها، از بیماری های به شدت تهاجمی و به سرعت کشنده تا بیماری های دارای سیر کند چندین ساله دیده می شود. سیر طبیعی لنفوم غیر هوچکین از لنفوم هوچکین کمتر قابل پیش بینی است و این بیماری می تواند با سهولت بیشتری به نواحی خارج از غدد لنفی تهاجم یابد (۳).

علائم اولیه لنفوم های غیر هوچکین مشابه لنفوم هوچکین با بزرگی غدد لنفاوی در نقاط مختلف بدن با درگیری بعضی از اندام های غیر از سیستم لنفاوی (درگیری مغز، پستان، بیضه، ...) است. با پیشرفت بیماری، ارگان های متفاوتی ممکن است درگیری پیدا کنند. تشخیص این بیماری نیز با بررسی میکروسکوپی قطعات بافت غیر طبیعی صورت می گیرد. درمان این طیف بیماری ها نیز با

ترکیبی از شیمی درمانی، اشعه درمانی یا هر دوی آنها صورت می گیرد. باید دانست که عاقبت لنفومهای غیر هوچکین به خوبی لنفوم هوچکین نیست اگرچه که هر یک از انواع این بیماری دارای پاسخ به درمان و سیر متفاوتی از سایرین است (۳ و ۴).

طبقه بندی انواع لنفوم ها

سازمان جهانی بهداشت لنفوم ها را به ۶ گروه اصلی طبقه بندی کرده است که هر کدام از آنها نیز دارای زیر گروه هایی می باشند (۱):

۱. نئوپلاسم های لنفوبیدی پیش ساز (Neoplasms Precursor Lymphoid)

○ لوسمی/لنفوم لنفوبلاستیک سلول بی طبقه بندی نشده (B lymphoblastic

(lymphoma NOS / leukemia

○ لوسمی/لنفوم لنفوبلاستیک سلول بی با اختلالات ژنتیکی متعدد

○ لوسمی/لنفوم لنفوبلاستیک سلول بی با جابجایی $t(9;22); bcr-abl1$

○ لوسمی/لنفوم لنفوبلاستیک سلول بی با جابجایی $t(v;11q23); MLL$

rearranged

○ لوسمی/لنفوم لنفوبلاستیک سلول بی با جابجایی $t(12;21); TEL-AML1$

ETV6-RUNX1

○ لوسمی/لنفوم لنفوبلاستیک سلول بی همراه با هیپرپلویدی (hyperploidy)

○ لوسمی/لنفوم لنفوبلاستیک سلول بی همراه با هیپوپلویدی (hypodiploidy)