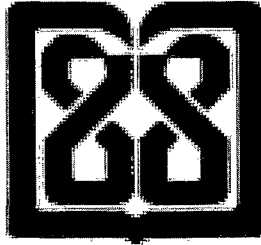


اسم
مجلس
مجلس



9.12.21



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران
دانشکده داروسازی

پایان نامه:

جهت دریافت درجه دکتری

موضوع:

بررسی اثر کتوتیفن بر کاهش مقاومت دارویی سلول های
سرطانی پستان T47D مقاوم به تاموکسیفن (T47D/TAMR-6)

استاد راهنما:

دکتر ابراهیم عزیزی

استاد مشاور:

دکتر سید ناصر استاد

۱۳۸۶ / ۴ / ۳۱۳

نگارش:

سمیه حنفی

شماره پایان نامه: ۴۶۳۲

سال تحصیلی: ۸۵-۱۳۸۴

۹۰۵۶۷

...و رسالت من این خواهد بود
تا دو استکان چای داغ را ،
از میان دو یست جنگ خونین
به سلامت بگذرانم
تا در شبی بارانی ،
انها را
با خدای خویش
چشم در چشم هم ، نوش کنیم.

"زنده یاد حسین پناهی"

خدای من!

من تو را به خودت شناختم ، با خودت و به واسطه خودت .
تو بودی که مرا به خودت خواندی و دعوتم کردی .
سپاس خدایی را سزاست که تا صدایش می کنم ، پاسخم می گوید ،
اگرچه وقتی او مرا صدا می زند ، من کاهلی می کنم و سهل انگاری برای پاسخ
گفتم .

سپاس خدایی را سزاست که از من بی نیاز است ، اما با من دوستی می کند و به من
محبت می ورزد .

خدایا! من رسیده ام به این حقیقت شیرین که مسافر مقصد تو راهش نزدیک است و تو
پوشیده نیستی از بندگان خودت .

و آنچه تو را نادیدنی می کند ، پرده کردار بندگان است .

خدای من! من همان نادانم که تو آموزشش داده ای و دانایی اش بخشیده ای !

من همان گمراهم که تو به راهش آورده ای و هدایتش کرده ای !

خداوندا! من از تو ایمان می طلبم ، ایمانی که تا دیدار خودت دوام بیاورد .

و از تو می خواهم که مرا بر آن ایمان زنده بداری .

مرا بر آن ایمان بمیرانی

و هم بر آن ایمان مبعوث گردانی .

خداوندا! بصیرت در دینت را به من عنایت فرما

و ادراک حکمتت را

و فهم و دریافت علمت را و هر دو بال رحمتت را .

و مرا برای آنچه نزد توست ، اشتیاق ببخش .

و مرا در راه خودت بمیران .

(دریافتی از دعای ابو حمزه ثمالی)



تقدیم به خانواده کوچکم: پدرم ، مادرم و برادرم؛ به پاس
همراهی شان و دلگرمی بخشیدن هاشان.

تقدیم به استاد بزرگوارم: جناب آقای دکتر عزیزی؛ به پاس
پیگیری های مستمر و صبر بی نظیرشان.

با تشکر از جناب آقای دکتر استاد.

با سپاس از سرکار خانم دکتر فولاددل ، خانم دکتر بازرگان ، خانم
دکتر کعبی نژادیان ، آقای دکتر عبدالمحمدی و خانم سپیده کروی؛
به خاطر همه مهربانی ها و لطفشان.

و با تشکر از اساتید ارجمند: جناب آقای دکتر شریف زاده و جناب آقای
دکتر قهرمانی.

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
	فصل اول: مقدمه
۳.....	۱-۱ سرطان
۳.....	۱-۱-۱ سرطان پستان
۳.....	۲-۱-۱ ریسک فاکتورهای ابتلای به سرطان پستان
۶.....	۳-۱-۱ درمان سرطان پستان
۸.....	• دوکسوروبیسین
۱۱.....	۴-۱-۱ داروهای هورمونی مورد استفاده در سرطان پستان
۱۵.....	• تاموکسیفن
۲۴.....	۲-۱ مقاومت دارویی
۲۶.....	۱-۲-۱ مکانیسم های مختلف مقاومت دارویی اکتسابی
۳۱.....	۲-۲-۱ مقاومت متقاطع یا Multidrug resistance (MDR)
۳۲.....	MDR-1/P-gp (۱-۲-۲-۱)

- ۳۷..... بیان P-gp در بافت های طبیعی (۲-۲-۲-۱)
- ۳۹..... بیان P-gp در سلولهای سرطانی (۳-۲-۲-۱)
- ۴۰..... معکوس کردن مقاومت دارویی متقاطع ناشی از P-gp (۳-۲-۱)
- ۴۱..... ترکیبات نسل اول
- ۴۴..... ترکیبات نسل دوم
- ۴۷..... ترکیبات نسل سوم
- ۶۷..... کنوتیفن
- ۷۰..... نقش P-gp در اثر گذاری بر فارماکوکینتیک ترکیبات ضد سرطان (۴-۲-۱)
- ۷۲..... مشکلات ناشی از استفاده از ترکیبات تغییر دهنده MDR (۵-۲-۱)

فصل دوم: مواد و روش ها

- ۷۵..... (۱-۲) وسایل و مواد مورد استفاده
- ۷۵..... (۱-۱-۲) ظروف
- ۷۵..... (۲-۱-۲) رده های سلولی
- ۷۵..... (۳-۱-۲) مواد
- ۷۶..... (۴-۱-۲) دستگاه ها
- ۷۷..... (۲-۲) روش تحقیق
- ۷۷..... (۱-۲-۲) آماده سازی محلول ها
- ۷۹..... (۲-۲-۲) دفریز کردن ویال حاوی سلول T47D و T47D/TAMR-6
- ۸۰..... (۳-۲-۲) پاساژ سلولی
- ۸۱..... (۴-۲-۲) فریز کردن سلولها
- ۸۲..... (۵-۲-۲) شمارش سلولی مستقیم به روش Trypan blue dye exclusion
- ۸۳..... (۶-۲-۲) شمارش سلولی غیر مستقیم به روش MTT
- (۳-۲) آزمایشات انجام شده

۱-۳-۲) بررسی اثر غلظت های مختلف کتوتیفن در مقایسه باتاموکسیفن، دوکسوروبیسین و وراپامیل بر رشد سلول های T47D و T47D/TAMR-6	۸۴
۲-۳-۲) بررسی اثرات معکوس کنندگی وراپامیل و غلظت های مختلف کتوتیفن در خصوص تاموکسیفن و دوکسوروبیسین بر سلول های T47D و T47D/TAMR-6	۸۵
۳-۳-۲) ایمونوسیتو شیمی	۸۷
۱-۳-۳-۲) آماده سازی محلول ها	۸۷
۲-۳-۳-۲) آماده سازی سلول ها	۸۸
آزمون های آماری	۹۲

فصل سوم: نتایج

۱-۳) اثر غلظت های مختلف کتوتیفن در مقایسه باتاموکسیفن، دوکسوروبیسین و وراپامیل بر رشد سلول های T47D و T47D/TAMR-6	۹۴
۲-۳) اثرات معکوس کنندگی وراپامیل و غلظت های مختلف کتوتیفن در خصوص تاموکسیفن و دوکسوروبیسین بر سلول های T47D و T47D/TAMR-6	۹۹
۳-۳) IC ₃₀ کتوتیفن برای سلول های parent	۱۰۴
۴-۳) IC ₃₀ کتوتیفن برای سلول های resistant	۱۰۵
۵-۳) تغییرات بیان P-gp توسط تاموکسیفن، کتوتیفن و مخلوط آن دو به روش ایمونوسیتوشیمی	۱۰۶

فصل چهارم:

بحث	۱۱۰
-----	-----

فصل پنجم:

منابع	۱۲۱
-------	-----

فهرست اشکال

عنوان	صفحه
شکل ۱: اثر غلظت های مختلف کتوتیفن در مقایسه با تاموکسیفن ، دوکسوروبیسین و وراپامیل بر رشد سلول های T47D و T47D/ TAMR-6 در مدت ۴۸ ساعت	۹۶
شکل ۲: اثر غلظت های مختلف کتوتیفن در مقایسه با تاموکسیفن ،دوکسوروبیسین و وراپامیل بر رشد سلول های T47D و T47D/ TAMR-6 در مدت ۷۲ ساعت.....	۹۷
شکل ۳: اثر غلظت های مختلف کتوتیفن در مقایسه با تاموکسیفن ،دوکسوروبیسین و وراپامیل بر رشد سلول های T47D و T47D/TAMR-6 در مدت ۹۶ ساعت	۹۸
شکل ۴: اثرات معکوس کنندگی کتوتیفن و وراپامیل در ارتباط با تاموکسیفن ودوکسوروبیسین بر سلول های T47D و T47D/ TAMR-6 در مدت ۴۸ ساعت	۱۰۱
شکل ۵: اثرات معکوس کنندگی کتوتیفن و وراپامیل در ارتباط با تاموکسیفن ودوکسوروبیسین بر سلول های T47D و T47D/ TAMR-6 در مدت ۷۲ ساعت	۱۰۲
شکل ۶: اثرات معکوس کنندگی کتوتیفن و وراپامیل در ارتباط با تاموکسیفن ودوکسوروبیسین بر سلول های T47D و T47D/ TAMR-6 در مدت ۹۶ ساعت	۱۰۳
شکل ۷: IC ₃₀ کتوتیفن برای سلول های parent	۱۰۴
شکل ۸: IC ₃₀ کتوتیفن برای سلول های resistant	۱۰۵

فهرست تصاویر

صفحه

عنوان

-
- تصویر ۱. تغییرات بیان P-gp توسط تاموکسیفن، کتوتیفن و مخلوط آن دو در سلول های T47D به
روش ایمنوسیتوشیمی ۱۰۷
- تصویر ۲. تغییرات بیان P-gp توسط تاموکسیفن، کتوتیفن و مخلوط آن دو در سلول های
T47D/TAMR-6 به روش ایمنوسیتوشیمی ۱۰۸

خلاصه

مقاومت دارویی ناشی از بیان بیش از حد P-gp مانع مهمی در دارو درمانی سرطان ها می باشد. گزارشات مبنی بر توانایی کتوتیفن و وراپامیل در حساس سازی سلول های سرطانی با بیان بیش از حد P-gp به برخی داروهای ضد سرطان وجود دارد. همچنین گزارشات متناقضی در مورد اثرات تاموکسیفن بر بیان و فعالیت P-gp منتشر شده است. لذا ما اثرات کتوتیفن و تاموکسیفن بر بیان P-gp و اثرات ضد سرطانی تاموکسیفن و دوکسوروبیسین (در حضور و عدم حضور وراپامیل و غلظت های مختلف کتوتیفن) بر سلولهای T47D و T47D/TAMR-6 را بررسی نمودیم. سلولهای T47D و زیر گروه مقاوم به تاموکسیفن آن که در آزمایشگاه ما تهیه شده بودند، در پلیت های ۹۶ خانه کاشته شدند تا به روش MTT سمیت سلولی داروها تعیین گردد. همچنین سلولها جهت تعیین بیان P-gp به روش ایمونوسیتوشیمی در اسلایدهای چندخانه در حضور داروها کاشته شدند. کتوتیفن و وراپامیل اثرات تاموکسیفن را بر هر دو رده سلولی افزایش دادند. بعلاوه کتوتیفن و وراپامیل به تنهایی نیز باعث کاهش تکثیر سلولی شدند. اما هیچکدام از داروها اثر بارزی بر بیان P-gp نداشتند. نتایج ما و گزارشات قبلی نشان می دهد که اثرات سینرژیستی کتوتیفن یا وراپامیل با تاموکسیفن احتمالا بیشتر ناشی از تداخل با فعالیت P-gp و نه بیان آن است. بدیهی است این موضوع می تواند باعث افزایش غلظت داخل سلولی و در نتیجه سمیت بیشتر تاموکسیفن در سلولهای سرطانی گردد.

فصل اول:

مقدمه

۱-۱) سرطان

به دلیل تنوع بسیار زیاد ، دخالت عوامل ژنتیکی در بروز و پیشرفت بیماری ، شیوع قابل توجه در جوامع و مرگ و میر نسبتا بالا به علت عدم پاسخ دهی به درمان های متداول ، سرطان از اهمیت بالایی برخوردار است . (۱ و ۲) سرطان ، اختلالی سلولی است که در نتیجه تغییر مکانیسم های کنترل کننده رشد و تمایز سلول ها به وجود می آید . سلول های سرطانی بیش از حد تکثیر می یابند و تومورهایی ایجاد می کنند که می توانند بافت های مجاور را مورد تهاجم قرار دهند . سلولهای توموری توانایی تکرار چرخه تکثیر و مهاجرت به نواحی دیگر بدن و درگیر نمودن اعضای گوناگون را در فرایندی موسوم به متاستاز ، دارا می باشند . این سلولها غالبا اختلالات ژنتیکی دارند که نشان دهنده عدم ثبات ژنتیکی آنها است . (۳ و ۴) بیشترین میزان مرگ و میر ناشی از سرطان به ترتیب مربوط است به سرطان ریه ، پستان ، پروستات ، روده بزرگ . (۵)

۱-۱-۱) سرطان پستان

سرطان پستان یکی از شایع ترین بدخیمی های زنان در دنیا است . میزان شیوع آن در کشورهای شرقی در مقایسه با غرب ، کمتر است . در واقع سرطان پستان ، یکی از علل اصلی مرگ زنان به ویژه در غرب می باشد . به طوری که علیرغم انجام عمل جراحی ، تقریبا ۳۵٪ از بیماران فوت می کنند . این سرطان تقریبا در ۱۰٪ از زنان جمعیت ها بروز می کند . البته به میزان کمتری (۱٪) در مردان نیز شایع است . (۱ و ۶) این سرطان ۱۸٪ از سرطان های زنان را شامل می شود . (۷)

۱-۱-۲) ریسک فاکتورهای ابتلای به سرطان پستان

۱) سن

میزان بروز سرطان پستان با سن افزایش می یابد ، به این ترتیب که هر ۱۰ سال ، میزان ابتلا دو برابر می شود تا اینکه منوپوز فرا رسد . (۷)

۲) ناحیه جغرافیایی

همانطور که گفته شد ، میزان ابتلا در کشورهای شرقی با غرب متفاوت است و نسبت ابتلا در غرب حدود ۵ برابر بیشتر است . گفته می شود که فاکتورهای محیطی اهمیت بیشتری از فاکتورهای ژنتیکی دارا هستند . (۷)

۳) زمان قاعدگی یا یائسگی

زنانی که زودتر از بقیه قاعده می شوند و یا دیرتر یائسگی را تجربه می نمایند ، ریسک ابتلای بیشتری دارند ، زنانی که پس از سن ۵۵ سالگی ، یائسه می شوند، دو برابر بیشتر از زنانی که قبل از ۴۵ سالگی یائسگی را تجربه می نمایند ، احتمال ابتلا دارند . (۷)

۴) سن اولین حاملگی

سن بالا در اولین حاملگی ، ابتلا به سرطان پستان را افزایش می دهد. بالاترین میزان ابتلا را گروهی دارند که اولین فرزند خود را پس از ۳۵ سالگی به دنیا آورده اند . (۷)

۵) تاریخچه خانوادگی

بیش از ۱۰٪ سرطان های پستان در کشورهای غربی در نتیجه استعداد ژنتیکی است . این بیماری از طریق هر یک از دو جنس قابل انتقال می باشد . در ضمن برخی افراد ممکن است بدون ابتلا به بیماری فقط نقش انتقال دهنده ژن را داشته باشند .

دو ژن BRCA1 و BRCA2 برای سرطان پستان شناخته شده اند که به ترتیب روی بازوی بلند کروموزوم ۱۷ و ۱۳ واقع هستند . برخی موتاسیون ها در این دو ژن با فرکانس بالاتری در برخی جمعیت ها رخ می دهند . جهش های ژنی در دو ژن دیگر (PTEN,P53) نیز ریسک بالایی

برای ابتلا به سرطان پستان فراهم می کنند . ریسک ابتلا به سرطان پستان در خانمی با یک فامیل درجه یک مبتلا ، دو برابر بیشتر است . (۷)

۶) ناراحتی خوش خیم قبلی پستان

زنانی که هایپرپلازی آتیپیکال اپیتلیال دارند ، ۴-۵ برابر ریسک ابتلای بیشتری به سرطان پستان دارند . (۷)

۷) تشعشع

تابش اشعه نیز سبب افزایش ریسک ابتلا به سرطان پستان می گردد . (۷)

۸) سبک زندگی

چاقی در زنان یائسه ، سبب دو برابر افزایش در ریسک ابتلا به سرطان پستان می گردد . ضمناً در برخی مطالعات نشان داده شده است که بین مصرف الکل و میزان بروز سرطان پستان ارتباط وجود دارد . (۷)

۹) ترکیبات ضد بارداری خوراکی

زمان شروع مصرف این ترکیبات در میزان بروز بیماری موثر می باشد . دیده شده است که زنانی که استفاده از این ترکیبات را در سنین زیر ۲۰ سالگی شروع می کنند ، ریسک ابتلای بالاتری دارند . (۷)

۱۰) درمانهای جایگزینی توسط هورمون ها

ریسک ابتلا به سرطان پستان در افرادی که تحت درمان های جایگزینی توسط هورمون ها بوده اند ، به ازای هر سال درمان ، با ضریب ۱/۰۲۳ افزایش می یابد . در ضمن ریسک ابتلا به این سرطان ، در افرادی که تحت درمان های ترکیبی از استروژن و پروژسترون بوده اند ، بیشتر از بقیه بیماران می باشد . (۷)