دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی بالینی

عنوان:

بررسی ارتباط بین میزان بیان IRAK1، BCRP و گلیکوپروتئین P با میزان حساسیت به داروهای متوترکسات و توپوتکان در چند رده سلولی سرطان پستان

توسط: سمانه راحمی

استاد راهنما: دکتر حسین فلاح

استاد مشاور: دکتر نورالدین نعمت اللهی ماهانی

دانشگاه علوم پزشکی کرمان
مرکز تحقیقات توسعه آموزش پزشکی
کتابخانه مرکزی

سال تحصیلی: ۱۳۹۶-۱۳۹۷

Kerman University Of Medical Sciences

Facualy of Medicine

In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree

(MSC)

Title:

Relationship between IRAK1, BCRP and P-gp gene expression and drug sensitivity to Methotrexate and Topotecan in four breast cancer cell lines (in vitro assay)

By

Samaneh Rahemi

Supervisor:

Dr. Hossein Fallah

Advisor:

Dr. Noralddin Nematollahi

دانشگاه علوم پزشکی کرمان
سپاسگزاری تا کوردانش پژوهی
کتابخانه مرکزی

Year:

2017

چکیده فارسی

مقدمه: سرطان پستان شایعترین نوع سرطان در بین زنان است. شیمی درمانی یکی از راه‌های اصلی درمان سرطان پستان است، اما استفاده از این روش بطور فزاینده ای بدلیل مقاومت دارویی و فقدان فاکتورهای پیش بینی کننده مقاومت تحت تأثیر قرار می گیرد. یکی از مهمترین مکانیسمهای مقاومت دارویی در سرطان فعال شدن سیستم انتقال دهنده های وابسته به کاست (ABC) ATP است. همچنین به تازگی مشخص شده است که کینازهای وابسته به رسپتور اینترلوکین ۱ (IRAKs [1]) با مقاومت دارویی در سلولهای سرطانی مرتبط می باشند. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط بین میزان بیان IRAK1 و BCRP، P-gp و میزان حساسیت به داروهای متوتروکسات و توپوتکان است.

مواد و روش ها: در غلظت های مختلف توپوتکان و متوتوکسات،غلظت ثابت (µg/µl) مهارکننده IRAK1/4، ترکیب غلظت های مختلف توپوتکان و غلظت ثابت (µg/µl) مهارکننده IRAK1/4، ترکیب غلظت های مختلف متوتروکسات و غلظت ثابت (µg/µl) مهارکننده IRAK1/4 بر روی رده های سلولی MCF-7، BT-20، BT-549، MB-468 زنده مانی سلولی با آزمون دفع رنگ تریپان بلو، فعالیت متابولیکی با استفاده از روش رنگ سنجی WST-1 و اپاپتوز سلولی با رنگ آمیزی این سلولها با آنکسین-V /7AAD مورد بررسی قرار گرفت. همچنین بیان ژن های IRAK1، BCRP، P-gp با روش Real-Time PCR بررسی شد.

یافته ها: مهارکننده IRAK1 باعث کاهش IC_{50} در هر چهار رده سلولی می گردد.کمترین اثر مهارکننده بر افزایش حساسیت دارویی متوتروکسات و توپوتکان به ترتیب در رده های سلولی MCF-7 وBT-549 و بیش ترین تاثیر مهارکننده در کاهش IC_{50} در رده سلولی MB-468 مشاهده گردید. انکوباسیون ۷۲ ساعته رده های سلولی با مهارکننده IRAK و داروهای توپوتکان و متوتروکسات به طور مشخص باعث افزایش سلول های مثبت از نظر آنکسین-V و آنکسین- 7AAD گردید؛ که نشان دهنده ی تأثیر اپاپتوتیک IRAK روی رده های سلولی های BT-20 و BT-549 و MB-468 و MCF-7 سرطان پستان می باشد. نتایج آزمون RT-qPCR نشان داد مهارکننده IRAK بیان ژنهای ABCB1 و IRAK را در چهار رده سلولی سرطان پستان در زمانهای ۱۲، ۲۴ و ۷۲ کاهش می دهد ولی بر بیان ABCG2 در هیچ یک از زمانها مؤثر واقع نمی شود.

نتیجه گیری: بیش تر داروهای شیمی درمانی کارایی درمانی کمی دارند و به ندرت بین سلول های نرمال و سلول های تومور تمایز قائل می شوند. با توجه به طیف وسیع داروهای شیمی درمانی که سوبسترای P-gp هستند، به نظر می

[1] Interleukin Receptor Associated Kinase

رسد که هدف دارویی قرار دادن IRAK-1 می تواند یک انتخاب دارویی موثر با خاصیت گزینش پذیری سلول های سرطانی برای کاهش مقاومت دارویی نسبت به عوامل شیمی درمانی باشد.که در این صورت می توان از مهارکننده های اختصاصی IRAK1 بصورت درمان ترکیبی با داروهای رایج شیمی درمانی جهت افزایش حساسیت دارویی و کاهش خطر بازگشت تومور استفاده کرد.

کلید واژه: مقاومت دارویی، سرطان پستان، متوتروکسات، توپوتکان

Abstract

Background and objectives: Breast cancer is the most common type of cancer among women. Chemotherapy is one of the main methods of breast cancer treatment, but this method is increasingly affected due to drug resistance and the lack of resistance predictive factors. One of the most important mechanisms of drug resistance in cancer is the activation of ATP-binding cassette transporters (ABC). One of the newly discovered factors associated with drug resistance in cancer cells is Interleukin Receptor Associated Kinase 1 (IRAKs). The aim of this study was to investigate the relationship between IRAK1 expression amount, BCRP, P-gp and sensitivity to the methotrexate and topotecan drugs.

Materials and methods: At various concentrations of topotecan and methotrexate, constant concentration (1µg/µl) of IRAK1/4 inhibitor, mixed various concentrations of topotecan and constant concentration (1µg/µl) of IRAK1/4 inhibitor, mixed various concentrations of methotrexate and constant concentration (1µg/µl) of IRAK1/4 inhibitors on MCF-7, BT-20, BT-549, MB-468 cell lines, the cell viability was examined by the trypan blue exclusion test, metabolic activity using colorimetric assay WST-1, and cell apoptosis by staining them with Annexin-V/7AAD. The expression of IRAK1, BCRP, P-GP genes was also assessed by Real-Time PCR method.

Results: IRAK1 inhibitor decreased $\mathbf{IC_{50}}$ is the four cell lines. The least inhibitory effect on increased drug sensitivity of methotrexate and topotecan was observed in the MCF-7 and BT-549 cell lines, respectively; and the most inhibitory effect in reducing the IC50 was observed in the MB-468 cell line. The 72-hour incubation of cell lines with IRAK inhibitors and topotecan and methotrexate drugs significantly increased the annexin-V and annexin-V/7AAD positive cells, suggesting an apoptotic effect of IRAK on the BT-20, BT-549, MB-468 and MCF-7 cell lines of breast cancer. RT-qPCR test results indicated that IRAK inhibitor reduced the gene expression of ABCB1 and IRAK in four breast cancer cell lines at 12, 24 and 72 h time intervals, but had no effect on the expression of ABCG2 at any time.

Conclusion: Most chemotherapy drugs have a low therapeutic efficacy and rarely distinguish between normal and malignant cells, a problem often reinforced by the onset of inevitable resistance and relapse of the disease. Given the wide range of chemotherapy drugs that have a P-gp substrate, it appears that selecting IRAK-1 as a therapeutic target can be an effective drug selection with cancer cell selection properties to reduce drug resistance to chemotherapy agents. In this case, specific IRAK inhibitors can be used in combination with common chemotherapy drugs to increase drug sensitivity and reduce the risk of tumor recurrence.

Keywords: Drug Resistance, Breast Cancer, Methotrexate, Topotecan

بسمه تعالی

تاریخ.....

صورتجلسه دفاع از پایان نامه

شماره.....

پیوست.....

دانشگاه علوم پزشکی کرمان

تحصیلات تکمیلی دانشگاه

جلسه دفاعیه پایان نامه تحصیلی **خانم سمانه راحمی** دانشجوی رشته **بیوشیمی بالینی** تحت عنوان " **بررسی ارتباط بین میزان بیان BCRP،IRAK1، گلیکوپروتئین P و میزان حساسیت به داروهای متوتروکسات و توپوتکان در پنج رده سلولی سرطان پستان بصورت in vitro**"در ساعت ۱۱/۳۰ روز **دوشنبه** مورخ ۹۷/۲/۳ با حضور اعضای محترم هیات داوران متشکل از:

سمت	نام و نام خانوادگی	امضا
الف:استاد راهنما (اول)	**جناب آقای دکتر حسین فلاح**	
ب: استاد راهنما(دوم)	.....	
ج: استاد مشاور	**جناب آقای دکتر سید نورالدین نعمت اللهی**	
د :عضو هیات داوران (داخلی)	**جناب آقای دکتر غلامرضا اسدی کرم**	
ذ: عضو هیات داوران (خارجی)	**سرکار خانم دکتر لادن لنگرودی**	
ر: عضو هیات داوران (خارجی)	.....	
نماینده تحصیلات تکمیلی	**سرکار خانم دکتر آسیه صادقی**	

تشکیل گردید و ضمن ارزیابی به شرح پیوست با درجه ...بسیار خوب..... و نمره .....۱۷/۶۶..... مورد تأیید قرار گرفت.

مهر و امضاء معاون آموزشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دانشکده پزشکی افضلی پور