



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین

دانشکده ی پیراپزشکی

گروه بیوتکنولوژی پزشکی

پایان نامه جهت اخذ کارشناسی ارشد رشته ی بیوتکنولوژی پزشکی

عنوان:

بررسی اثر پاراکوماریک اسید محصور شده در لیپوزوم بر بقای سلولی ،
خواص مکانیکی و بیان ژن های caspase-3 و p-53 در محیط های in
vitro روی رده ی سلولی A-375 سرطان ملانوما

استاد راهنما:

جناب آقای دکتر نعمت الله غیبی

استاد مشاور:

جناب آقای دکتر علیرضا فراست

نگارنده ی پایان نامه:

فرناز پورفرزاد

شهریور ۱۴۰۱

چکیده

پیش زمینه. پاراکوماریک اسید یک ترکیب پلی فنولی فراوان در طبیعت و دارای خواص بیولوژیکی مطلوب می باشد. در این مطالعه، جهت افزایش دسترسی زیستی و حلالیت این ترکیب از نانوحامل های لیپوزومی استفاده شد و اثرات پاراکوماریک اسید آزاد و پاراکوماریک اسید محصور شده در لیپوزوم بر روی بقای سلولی، آپوپتوز، ویژگی های نانومکانیکال و بیان ژن های کاسپاز-۳ و p-53 بر روی رده ی سلولی A-375 مورد مقایسه گرفت.

مواد و روش ها. لیپوزوم های حاوی پاراکوماریک اسید با روش تبخیر فیلم نازک تهیه شدند. صحت بارگذاری با استفاده از FT-IR و ویژگی های ظاهری و فیزیکی-شیمیایی لیپوزوم ها با استفاده از SEM و DLS سنجیده شد. درصد رهایش با استفاده از تکنیک غشای دیالیزی در دو pH ۷/۴ و ۶/۸ محاسبه شد. از آزمون MTT جهت بررسی میزان سمیت پاراکوماریک اسید آزاد و محصور شده در لیپوزوم بر روی سلول های A-375 استفاده شد. درصد آپوپتوز و نکروز سلولی و تغییرات نانومکانیکال با استفاده از آزمون های فلوسایتومتری و میکروسکوپ نیروی اتمی ارزیابی شد. میزان بیان ژن های کاسپاز-۳ و p-53 با استفاده از ریل تایم پی سی آر بررسی شد.

نتایج. FT-IR، SEM و DLS بارگذاری مطلوب ترکیب با کارایی ۷۱/۲۵ درصد و تشکیل لیپوزوم ها با میانگین اندازه ۱۰۹/۶ نانومتر و پتانسیل زتای ۱۴/۳- میلی ولت را نشان دادند. رهایش پاراکوماریک اسید آهسته و به صورت کنترل شده و درصد آن در pH اسیدی ۶/۸ بیشتر از ۷/۴ بود. هر دو ترکیب باعث کاهش زنده مانگی و بقای سلول ها با القای نکروز و آپوپتوز ثانویه شدند. نتایج میکروسکوپ نیروی اتمی نتایج فلوسایتومتری را تایید کرد. نیروی چسبندگی و مدول الاستیک نیز در گروه های تیمار افزایش داشت. بیشترین افزایش بیان ژن ها ۳ در کمترین غلظت ها یعنی ۵ و ۱۵ میکرومولار مشاهده شد. میزان بیان ژن ها در گروه کنترل یک و بیشترین میزان بیان کاسپاز-۳ و p-53 در اثر تیمار ۸/۴۶ و ۷/۸۳ محاسبه شد. پاراکوماریک اسید لیپوزومه در القای نتایج فوق موفق تر بود.

نتیجه گیری. نتایج نشان دادند که لیپوزوم ها حامل های مناسبی برای پاراکوماریک اسید هستند و با القای رهایش مداوم، آهسته و کنترل شده ی ترکیب، در القای آپوپتوز و نکروز سلولی و افزایش بیان ژن های p-53 و کاسپاز-۳ موفق تر از نوع آزاد عمل می کنند و می توانند به عنوان یک عامل ضدسرطانی مکمل مورد بررسی قرار بگیرند.

کلمات کلیدی. پاراکوماریک اسید - ترکیبات پلی فنولی - نانوحامل - لیپوزوم - A-375 - کاسپاز-۳ - p-

Effects of liposomal para-coumaric acid on cell viability, apoptosis, mechanical properties and expression of caspase-3 and p-53 genes in A-375 melanoma cell line

Abstract:

Objective(s): para-coumaric acid (p-CA) is a polyphenolic compound with desirable biological benefits. In this study, we used liposome nanocarriers to increase its bio-availability and stability. We also compared the effects of free p-CA and p-CA loaded liposomes on cell viability, apoptosis, nanomechanical properties and caspase-3 and p-53 gene expression in melanoma A-375 cell line.

Material and method: liposome preparation was done through thin film hydration method. the accuracy of encapsulation, morphology and physio-chemical properties of liposomes were analyzed via FT-IR, SEM and DLS. The release percentage of liposomes were measured via dialysis technique in two pH of 7.4 and 6.8. cytotoxic effects of free and liposomal p-CA were evaluated via MTT and flowcytometry assays. nanomechanical changes of treated cells were investigated via AFM. qRT-PCR was carried out to analyze the caspase-3 and p-53 gene expression changes.

Results: p-CA was correctly loaded and prepared liposomes proper mean particle size and zeta-potential of 109.6nm and -14.3mv, based on FT-IR, SEM and DLS results. Their release pattern of was sustained, controlled and slow with higher percentage in acidic pH of 6.8. both compounds decreased the A-375 cell viability through induction of late apoptosis and necrosis based on MTT and flowcytometry results. AFM confirmed previous results as both compounds increased young's modules and adhesion force parameters. P-53 and caspase-3 genes had higher expression rate with more regular pattern in liposomal p-CA treated group compared to free p-CA treated group.

Conclusion: liposomes could act as suitable nanocarriers for p-CA, cause the sustained and controlled release of it and exert higher cytotoxic effects compared to free p-CA. p-CA encapsulated liposomes could be used as a complementary anti-cancer agent in future studies.

Keywords: para-coumaric acid – polyphenolic compounds – nanocarriers- liposome – melanoma A-375 – caspase-3 – p-53

In the name of God



Qazvin University of Medical Sciences

Faculty of Para-medical Sciences

Department of Medical Biotechnology

Thesis of receiving degree in medical biotechnology

Title:

Effects of liposomal para-coumaric acid on cell viability, apoptosis, mechanical properties and expression of caspase-3 and p-53 genes in A-375 melanoma cell line

Supervisor:

Dr. Nematollah Gheibi

Written by:

Farnaz Pourfarzad

September