دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین

دانشکده پیراپزشکی

پایان‌نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست فناوری پزشکی

عنوان:

بررسی اثر سمیت نانوذره پروپولیس بر روی تکثیر و بیان ژن‌های BAX و BCL-2 در رده سلولی A-375 ملانوما

دانشجو:

نسیم والی وند

اساتید راهنما:

دکتر نعمت الله غیبی

دکتر اعظم جنتی اصفهانی

استاد مشاور:

دکتر حسین احمدپور یزدی

زمستان ۱۴۰۱

چکیده

پیش زمینه: سرطان ملانوما امروزه مسئول ۸۰ درصد مرگ و میر های ناشی از سرطان پوست است. رایج ترین و موثرترین درمان های موجود برای این بیماری، جراحی ، شیمی درمانی و رادیو تراپی است که به علت محدودیت ها و عوارض جانبی ناشی از این درمان ها، محققان امروزه درمان با ترکیبات طبیعی را هدف قرار داده اند. مطالعات اخیر، پتانسیل ضدسرطانی پروپولیس را به عنوان مکملی جهت درمان انواع سرطان ها نشان داده است. این ترکیب با اثر بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی، مسیرهای مولکولی و پروتئین های چرخه ی سلولی منجر به مهار پیشرفت سرطان شده و همچنین با اثر بر پروتئین های مرتبط با چسبندگی و مهاجرت سلولی از متاستاز سلول‌های سرطانی نیز جلوگیری میکند. با این حال به دلیل حلالیت کم، جذب کم و همچنین رهاسازی غیر هدفمنو استفاده از آن با محدودیت هایی روبه رو است. هدف این مطالعه بررسی اثر سمیت نانوذره پروپولیس بر روی تکثیر و بیان ژن های BAX و BCL-2 برروی رده سلولی A-375 سرطان ملانوما است.

روش کار: پروپولیس قزوین بعد از عصاره گیری اتانولی، به فرم نانو به روش سونیکاسیون آماده شد. اندازه ذرات و بار سطحی آن ها با DLS و پتانسیل زتا تعیین شد. سنجش MTT برای مقایسه ی اثرات عصاره پروپولیس و نانوپروپولیس در غلظت های (۱۰تا ۱۰۰ میکروگرم برمیلی لیتر) جهت ارزیابی زنده مانی سلول های A-375 ملانوما و تعیین IC50 در ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شد.

ارزیابی اثر عصاره پروپولیس و نانوپروپولیس توسط تست های مختلفی شامل : بررسی میزان آپوپتوز (سنجش رنگ آمیزی دو گانهPI/V-Annexin در فلوسایتومتری)، بررسی متاستاز (سنجش ترمیم زخم (خراش))، ارزیابی تغییرات فیزیکوشیمیایی سلول‌های سرطانی (میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM))، بررسی میزان تکثیر سلول های (با بررسی چرخه سلولی)، بررسی بیان ژن های مرتبط با آپوپتوز(BAX, BCL-2وCaspase-3)، ارزیابی اثرحساسیت پرتویی و محافظت پرتویی (سنجش Comet ، در سلول های سرطانی A-375 و سلول‌های نرمال Vero) انجام شد. در نهایت برهمکنش پروتیین های بررسی شده در بیان ژن با استفاده از نرم افزار String تعیین شدند.

نتایج: نتایج DLS و پتانسیل زتا اندازه نانوذرات را بین ۱۰۰-۱ نانومتر تایید کرد و بارسطحی را با ۳۳- پایدار گزارش کرد. مقادیر تخمینی IC50 برای عصاره پروپولیس و نانوپروپولیس در بازه ۲۴ و ۴۸ ساعت نشان دهنده اثر سمیت ترکیبات بر روی سلول‌های A-375 بود که نانوپروپولیس در بازه ۴۸ ساعت بهترین عملکرد را نشان داد. این ترکیبات سمیت معناداری برروی سلول‌های نرمال نداشتند. نتایج نشان داد که نانوپروپولیس نسبت به عصاره پروپولیس در غلظت IC50 باعث آپوپتوز، تغییرات مورفولوژیکی، ضد متاستازی و همچنین مهار رشد و تکثیر بیشتری شد. نتایج بیان ژن نشان داد نانوپروپولیس باعث افزایش بیان ژن‌های BAX و Caspase-3 و کاهش بیان Bcl-2 شد. سنجش Comet، اثر حساسیت پرتویی ترکیبات را در سلول‌های سرطانی A-375 و اثر محافظت پرتویی آن‌ها را در سلول‌های نرمال Vero تایید کرد.

نتیجه‌گیری: با توجه به مزایای نانوپروپولیس و نتایج مثبت حاصل شده این ترکیب می‌تواند یک کاندید مناسب به عنوان یک مکمل درمانی در کنار شیمی درمانی و رادیوتراپی در جهت درمان سرطان باشد که نیازمند مطالعات تکمیلی در این زمینه می‌باشد.

کلمات کلیدی: سرطان ملانوما، عصاره پروپولیس، نانوپروپولیس، A-375، BAX، Bcl-2، Caspase-3

Abstract

Background and aim: Nowadays melanoma cancer is responsible for 80% of skin cancer deaths. The most common and effective treatments are surgery, chemotherapy, and radiotherapy. Due to the limitations and side effects of these treatments, researchers have targeted treatment with natural compounds. Recent studies have shown the anticancer potential of propolis as an adjuvant for the treatment of various cancers. This compound affects the growth and proliferation of cancer cells, molecular pathways, and cell cycle proteins, and inhibiting cancer progression. It also prevents the metastasis of cancer cells by affecting the proteins related to cell adhesion and migration. However, its use faces limitations due to its low solubility, low absorption, and non-targeted release. The aim of this study is to investigate the effect of nano propolis toxicity on the proliferation and expression of BAX and BCL-2 genes in the A-375 melanoma cancer cell line.

Methodology: Qazvin Propolis was prepared in nano form after ethanolic extraction. DLS and Zeta Potential determined particle size and surface charge. MTT assay was performed to compare the effects of propolis extract and nano propolis in concentrations (10 to 100 µg/ml) to evaluate the cell viability and determine IC50 at 24 and 48 hours.

Evaluation of the effect of propolis extract and nano propolis by various tests including Apoptotic events were investigated through The Annexin-V/PI dual staining assay using flow cytometry, metastasis evaluation (wound healing assay (scratch)), evaluation of pHysicochemical changes of cancer cells (atomic force microscope) (AFM), the proliferation of cells (by checking the cell cycle), level the expression of apoptosis genes (BAX, BCL-2, and Caspase-3), evaluating the radiosensitizer and radioprotective effect (Comet assay, in A-375 cancer cells and Vero normal cells). Finally, the protein-protein interaction was determined using String software.

Results: DLS and zeta potential confirmed the size of nanoparticles between 1-100 nm and reported a stable surface charge of -33. Estimated IC50 values for propolis extract and nano propolis at 24 and 48 hours showed the toxic effect of the compounds on A-375 cells, and nano propolis showed the best performance at 48 hours. These compounds had no significant toxicity on normal cells. The results showed that nano propolis caused more apoptosis, morpHological changes, anti-metastasis, and growth and proliferation inhibition than propolis extract at IC50 concentration. The gene expression results showed that nano propolis increased the expression of BAX and Caspase-3 genes and decreased the expression of Bcl-2. Comet assay confirmed the

radiosensitizing effect of compounds in A-375 cancer cells and their radioprotective effect in normal Vero cells.

Conclusion: Considering the benefits of nanopropolis and the positive results obtained, this combination can be a suitable candidate as a therapeutic adjuvant along with chemotherapy and radiotherapy for cancer treatment, which requires additional studies in this field.

Keywords: melanoma cancer, propolis extract, nanopropolis, A-375, BAX, Bcl-2, Caspase-3

Qazvin University Medical of Sciences

Faculty of Paramedical Sciences

Presented for degree of master of sciences in Medical Biotechnology

Title:

Study of Propolis nanoparticles effect on proliferation and BAX and BCL-2 genes expression in A-375 melanoma cell line

Supervisor:

Dr. Nematollah Gheibi

Dr. Azam Janati Esfahani

Advisors:

Dr. Hossein Ahmadpour Yazdi

By:

Nassim Valivand

Winter-2023