

بررسی اثر بربرین بر روی سلول های
سرطانی خون محیطی بیماران مبتلا به
لوسمی لنوئیدی مزمن در *In vitro*

دکتر آرش آقایی



سرشناسه	: آقاییگی، آرش، ۱۳۵۷-
عنوان و نام پدیدار	: بررسی اثر بربرین بر روی سلول‌های سرطانی خون محیطی بیماران مبتلا به لوسمی لنفوئیدی مزمن در <i>In vitro</i> / آرش آقاییگی.
مشخصات نشر	: مشهد، سخن گستر، ۱۳۹۸.
مشخصات ظاهری	: ۱۱۲ ص.
شابک	: ۹۷۸-۶۰۰-۲۴۷-۸۸۸-۷
فهرست نویسی	: فیپا.
موضوع	: لوسمی مزمن - - ایران - - نمونه پژوهشی
موضوع	: Chronic leukemia - - Iran - - Case studies
موضوع	: بربرین - - اثر فیزیولوژیکی. - - نمونه پژوهی
موضوع	: Case studies - - Phsiological effect - - Berberine
رده‌بندی کنگره	: RC۶۴۳
رده‌بندی ربی	: ۶۱۶/۹۹۴۱۹
شماره شابک ملی	: ۵۹۹۵۰۶۹

بررسی اثر بربرین بر روی سلول‌های سرطانی خون محیطی بیماران مبتلا به لوسمی لنفوئیدی مزمن
 در *In vitro*
 دکتر آرش آقاییگی

چاپ اول / ۱۳۹۸

جلد ۱۰۰۰

چاپ سیمتا

تومان ۲۰۰۰۰

شابک: ۹۷۸-۶۰۰-۲۴۷-۸۸۸-۷



ناشر: سخن گستر

مشهد- خیابان ابن سینا- بین ابن سینا ۱ و ۳- ساختمان اطبا /

تلفن: ۵۵ ۴۳ ۳۸ - ۵۱

فصل اول / معرفی پژوهش ۱۳

- ۱-۱ بیان مسئله و ضرورت اجرای تحقیق ۱۵
- ۲-۱ اهداف (کلی و جزئی) ۱۸
- ۳-۱ رالات پژوهشی: ۱۹
- ۴-۱ تعریف واژه‌ها: ۲۰

فصل دوم / کلیات پژوهش و مروری بر مطالعات گذشته ۲۳

- ۱-۲ کلیات پژوهش ۲۵
- ۱-۱-۲ لوسمی: وی مزمن، تیریف لوسمی لنفاوی مزمن ۲۵
- ۲-۱-۲ همه گیرشناسی و بروز ۲۵
- ۳-۱-۲ ویژگی تشخیصی و الیسی ۲۷
- ۴-۱-۲ عوامل پیش آگهی ۲۹
- ۱-۲-۴ سیستم مرحله بندی ۲۹
- ۲-۴-۱-۲ مارکرهای پیش آگهی بیولوژیکی ۳۱
- ۵-۱-۲ ریخت شناسی ۴۱
- ۱-۲-۵-۱ بررسی خون محیطی ۴۲
- ۲-۵-۱-۲ مغز استخوان ۴۳
- ۳-۵-۱-۲ گره های لنفاوی ۴۴
- ۴-۵-۱-۲ دیگر ارگان ها ۴۴
- ۶-۱-۲ منشأ سلول های CLL ۴۵
- ۷-۱-۲ ریز محیط CLL ۴۶
- ۸-۱-۲ لنفوسیت های T در ریز محیط های CLL ۴۶
- ۹-۱-۲ عدم تعادل در آپوپتوز سلول های CLL ۴۸
- ۱۰-۱-۲ درمان CLL ۴۸
- ۱-۱۰-۱-۲ فلودارابین ۴۹
- ۲-۱۰-۱-۲ ایمونوتراپی در CLL ۵۰

۵۰	۱-۲-۱۰-۳ مونوکلونال آنتی‌بادی‌های درمانی
۵۱	۱-۲-۱۱ طب چینی به عنوان یک درمان جایگزین
۵۱	۱-۲-۱۱-۱ کاپتیس ریزوما
۵۱	۱-۲-۱۱-۲ بربرین
۵۶	۲-۲ بررسی متون
۶۱	فصل سوم / روش پژوهش
۶۳	۱-۳ نوع مطالعه
۶۳	۲-۳ جامعه پژوهش
۶۳	۳-۳ نمونه پژوهش
۶۳	۳-۳-۱ روش نمونه‌گیری
۶۶	۳-۳-۲ حجم نمونه
۶۷	۴-۳ محیط پژوهش
۶۷	۵-۳ ابزار گردآوری داده‌ها
۶۸	۳-۵-۱ مواد و روش‌های لازم جهت جمع‌آوری داده‌ها
۶۹	۳-۶-۱ روش کار
۶۹	۳-۶-۱-۱ روش جداسازی با استفاده از فایکرن
۷۰	۳-۶-۲ شمارش سلول
۷۰	۳-۶-۲-۱ تعیین درصد زنده‌بودن سلول‌ها (Viability test)
۷۱	۳-۶-۲-۲ روش جداسازی لنفوسیت‌های B با استفاده تکنیک $Immunomagnetic separation$ و سنجش خلوص
۷۲	۳-۶-۲-۳ کشت سلول‌ها و مجاورت با بربرین برای بررسی آپوپتوز و بررسی بقای سلولی
۷۳	۳-۶-۲-۴ تست آپوپتوز Annexin V/7AAD
۷۵	۳-۶-۲-۵ تست بقا (Viability) (MTT Assay)
۷۵	۳-۶-۲-۶ نحوه آماده‌سازی محیط و مواد
۷۵	۳-۶-۲-۷ تهیه محیط کشت
۷۵	۳-۶-۲-۸ تهیه محلول بافر فسفات سالین (PBS)
۷۶	۳-۶-۲-۹ آماده‌سازی بربرین
۷۶	۳-۶-۲-۱۰ تهیه رنگ تریپان بلو
۷۶	۳-۷-۱ اعتماد و اعتبار علمی ابزار گردآوری داده‌ها
۷۶	۳-۸-۱ شرایط ورود به مطالعه
۷۷	۳-۹-۱ شرایط خروج از مطالعه
۷۷	۳-۱۰-۱ روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

۱۱-۳ محدودیت‌های پژوهش: ۷۷

۱۲-۳ ملاحظات اخلاقی: ۷۷

فصل چهارم / نتایج پژوهش ۷۹

۴- نتایج ۸۱

۴-۱ تست پایلوت اول برای بررسی و به دست آوردن دز مناسب داروی بربرین در بیمار CLL ۸۱

۴-۲ تست پایلوت دوم برای بررسی دز مناسب داروی بربرین در زمان ۲۴ ساعت در بیمار CLL ۸۱

۴-۳ بررسی اثر بربرین بر روی بقای PBMC بیماران CLL ۸۲

۴-۴ بررسی اثر بربرین بر میزان بقای لنفوسیت‌های B بیماران CLL ۸۳

۴-۵ بررسی اثر بربرین بر بقای سلول‌های PBMC افراد سالم ۸۴

۴-۶ بررسی اثر بربرین بر میزان آپوپتوز سلول‌های PBMC بیماران CLL ۸۴

۴-۷ بررسی اثر بربرین بر میزان آپوپتوز لنفوسیت‌های B بیماران CLL ۸۵

۴-۸ بررسی اثر بربرین بر میزان آپوپتوز سلول‌های PBMC افراد سالم ۸۶

فصل پنجم / بحث، نتیجه‌گیری ۸۷

۵-۱ بحث: ۸۹

۵-۲ نتیجه‌گیری: ۹۶

۵-۳ پیشنهادات: ۹۷

فهرست منابع: ۹۹

لوسمی لنفوئیدی مزمن یکی از شایع ترین بدخیمی‌های لنفوئیدی در کشورهای غربی و به نسبت کمتر در خاورمیانه و ممالک خاور دور است که به طور عموم افراد مسن را درگیر می‌کند. CLL با تجمع و تکثیر لنفوسیت‌های B دارای مارکرهای $CD19^+$, $CD20^+$, $CD5^+$ و $CD23^+$ مشخص می‌گردد. بربرین از جمله ترکیبات طبیعی با ساختار ایزو کوئینولون آلکالوئید است که دارای توانایی بالقوه ضد سرطانی می‌باشد. در شرایط آزمایشگاهی بربرین در رده‌های سلول‌های سرطانی باعث کاهش بقا و افزایش میزان آپوپتوز می‌شود. در این مطالعه به بررسی اثر بربرین بر میزان بقا و آپوپتوز در سلول‌های $PBMC^1$ و B-cell بیماران مبتلا به CLL در حضور یا عدم حضور بربرین و مقایسه با میزان بقا و آپوپتوز آن‌ها با سلول‌های $PBMC$ افراد نرمال و همچنین مقایسه با داروی فلودارابین در هر دو گروه پرداختیم.

روش کار

سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی ۱۲ بیمار CLL و ۴ فرد سالم را با استفاده از تکنیک فایکول جدا کرده و از این تعداد بیمار سلول‌های ۸ نفر از این بیماران را با استفاده از تکنیک $MACS^2$ برای خالص‌سازی لنفوسیت‌های B جدا کرده و میزان خلوص این سلول‌ها را با استفاده از $CD20$ آنتی‌بادی و آنتی‌بادی $CD5$ مورد استفاده قرار دادیم. سلول‌های $PBMC$ و B-cell در محیط کشت RPMI1640+AB¹serum به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با دزهای ۵ تا ۲۰۰ میکرومولار بربرین کشت داده شدند. همچنین به عنوان کنترل در هر زمان سلول‌های بیمار که با بربرین مجاور نشده بودند (کنترل منفی) و سلول‌هایی که با داروی فلودارابین (میکرو مولار (کنترل مثبت) مجاور شده بودند، قرار داشتند. میزان بقای این سلول‌ها را با استفاده از تکنیک MTT و همچنین میزان آپوپتوز را با استفاده از Annexin V/7AAD و فلوسایتومتری مورد استفاده قرار دادیم.

یافته‌ها

نتایج بررسی ما کاهش میزان بقا در $PBMC$ و B-cell های خالص‌شده بیماران CLL مجاور شده با بربرین را نسبت به سلول‌های بیمارانی که با این دارو مجاور نشده بودند نشان داد ($P < 0.05$). مقایسه میزان بقا $PBMC$ و B-cell مجاور شده با بربرین نسبت به سلول‌های مجاور شده با فلودارابین نتیجه معناداری را نشان نداد و این دو گروه در یک رنج بودند ($P > 0.05$). میزان آپوپتوز در

1-Peripheral Blood Mononuclear Cell

2- Magnetic-activated cell sorting

PBMC و B-cell بیماران مجاور شده با بربرین نسبت به سلول‌های بیماران مجاور نشده با بربرین افزایش داشته ($p < 0/05$) و در مقایسه با میزان آپوپتوز PBMC و B-cell مجاور شده با فلوئیدارابین اختلاف معناداری وجود نداشت ($P > 0/05$). آزمایش تاثیر بربرین بر روی سلول‌های PBMC افراد سالم که در معرض این دارو بودند در مقایسه با PBMC همین افراد که در معرض این دارو قرار نداشتند مشخص کرد که داروی بربرین باعث افزایش آپوپتوز و کاهش بقا در سلول‌های PBMC افراد سالم نمی‌شود.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد که داروی بربرین با اثر بر روی PBMC بیماران CLL باعث کاهش بقای این سلول‌ها شده که این منجر به کاهش در PBMC افراد سالم مشاهده نمی‌شود. همچنین افزایش میزان آپوپتوز سلول‌های PBMC افراد بیمار نسبت به افراد سالم می‌تواند مسیر و روش کاهش بقای این سلول‌ها را نشان دهد. از طرف دیگر با خاص سازی لنفوسیت‌های B و حذف سلول‌های دیگر نظیر لنفوسیت‌های T، لنفوسیت B میزان های کمتر و آپوپتوز بیشتر نسبت به PBMC بیماران نشان می‌دهند که می‌تواند اختصاصی‌تر عمل کند و این را نشان دهد.