

Study of MDR1 Gene Expression in Colorectal Cancer Using Nanobiosensor

Farrokh Karimi^{1*}

1. Assistant Professor of Genetics, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Maragheh, Maragheh, Iran

Received: 4 Feb 2017, Accepted: 25 Sep 2017

Abstract

Background: Nowadays, drug resistances are the main problems in no response of cancer patients to drug. Identification of molecular mechanisms and causative agents of drug resistance can be important to determine the treatment method in different stages of disease. In this study, for the first time, expression of multidrug resistance (MDR1) gene was studied in colorectal cancer by Carbon Nanotubes (CNTs)-based nanobiosensor method.

Materials and Methods: At first, a nanobiosensor was designed based on carbon nanotubes (CNTs). After optimizing reaction condition to identify target DNA sequence, colorectal cancer patient's cDNA samples were evaluated by nanobiosensor.

Results: After immobilizing the probe on CNTs, Fluorescence immersion was quenched but by adding complementary DNA, fluorescence again was observed. In hybridization reaction of cDNA with nanobiosensor high significant levels of fluorescence emission was observed in colorectal cancer tumor samples compared normal tissue indicating high level expression of MDR1 gene in tumor tissue.

Conclusion: Finally, the evaluation of the expression of MDR1 gene by nanobiosensor indicated that in colorectal cancer tissue MDR1, mRNA level was higher than normal tissue. In addition, the results of this study indicated that carbon nanotubes-based nanobiosensor beside PCR-based method can be used as a very powerful tool for expression studies in human cancers at mRNA levels.

Keywords: Carbon nanotubes, Colorectal cancer, MDR1, Nanosensor

*Corresponding Author:

Address: Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Maragheh, Maragheh, Iran
Email: karimifm@maragheh.ac.ir

مطالعه بیان ژن MDR1 در سرطان کلورکتال با استفاده از روش نانو حس گر زیستی

فرخ کریمی^{۱*}

۱. استادیار ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱۶، تاریخ پذیرش: ۹۶/۷/۳

چکیده

زمینه و هدف: امروزه مقاومت‌های دارویی از عوامل اصلی در عدم پاسخ بیماران سرطانی به دارو می‌باشد. شناسایی مکانیسم‌های مولکولی و عوامل ایجاد کننده مقاومت دارویی می‌تواند نقش حائز اهمیتی در تعیین روش درمان در مراحل مختلف بیماری داشته باشد. در این مطالعه، بیان ژن MDR1 که از ژن‌های مهم در مقاومت دارویی بیماران سرطان کلورکتال است، برای اولین بار با استفاده از روش نانوحس‌گریزیستی بر پایه نانولوله‌های کربنی در نمونه بافت سرطان کلورکتال مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: ابتدا یک نانوحس‌گریزیستی بر پایه نانولوله‌های کربنی طراحی گردید. بعد از بهینه‌سازی شرایط نانوحس‌گر در شناسایی توالی DNA هدف، نمونه cDNA مربوط به بیماران سرطان کلورکتال مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج مربوط به بهینه‌سازی طراحی نانوحس‌گر نشان داد که تثبیت کاوش گر ژن MDR1 در سطح نانولوله‌های کربنی باعث خاموشی نشر فلورسانس نوری می‌شود، ولی با اضافه کردن توالی مکمل دوباره نشر فلورسانس ظاهر گردید. در واکنش هیبریداسیون نانوحس‌گر با cDNA مربوط به نمونه‌های بافت توموری و سالم کلورکتال، نشر فلورسانس در نمونه‌های توموری به طور معنی‌دار بیشتر بود که نشان دهنده سطح بیان بالای این ژن در بافت توموری می‌باشد.

نتیجه‌گیری: در نهایت، نتایج بررسی بیان ژن MDR1 با استفاده از روش حس‌گریزیستی نشان داد که بیان این ژن در نمونه بافت توموری سرطان کلورکتال نسبت به نمونه سالم افزایش می‌یابد. علاوه بر این، نتایج این تحقیق نشان داد که نانو حس‌گرهای زیستی بر پایه نانولوله‌های کربنی می‌تواند به عنوان ابزار قدرت‌مندی در کنار روش‌های PCR برای مطالعات بیان ژن در سطح mRNA در سرطان‌های انسانی مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: نانوحس‌گر، نانولوله کربنی، سرطان کلورکتال، MDR1

*نویسنده مسئول: ایران، مراغه، دانشگاه مراغه، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

Email: karimifm@maragheh.ac.ir

مقدمه

سرطان کلورکتال که به نام‌های سرطان کلون یا روده نیز خوانده می‌شود در پی رشد سلول‌های سرطانی در کولون و رکتوم ایجاد می‌شود (۲،۱). این بیمار سومین علت عمده مرگ و میر ناشی از سرطان، در مردان و زنان است (۳). مقاومت‌های دارویی یکی از مشکلات اساسی در عدم موفقیت در درمان بیماران سرطانی بخصوص در سرطان کلورکتال محسوب می‌گردد (۴). در مراحل پیشرفت بیماری سلول‌های سرطانی با ایجاد مکانیسم‌های مختلف به دارو پاسخ نمی‌دهند این مکانیسم‌ها شامل پمپ شدن دارو به خارج سلول، مقاومت در جذب دارو، فعال شدن مکانیسم تغییر ساختار دارو و مقاومت سلول در مقابل آپوپتوز القائی دارو می‌باشد (۵). امروزه روش شیمی درمانی که موثرترین روش برای مقابله با سلول‌های سرطانی در مراحل پیشرفته و متاستاتیک می‌باشد، مقاومت دارویی باعث می‌شود که تومورها به عوامل درمانی پاسخ ندهند و درمان موثر واقع نشود (۶،۷).

در بررسی مکانیسم‌های مقاومت دارویی، مهم‌ترین مکانیسم پمپ شدن دارو به خارج سلول توسط خانواده بزرگی از ترانسپورترهای وابسته به ATP بنام ABC (Adenosine triphosphate Cassette) می‌باشد (۸). این ترانسپورترها باعث خارج شدن انواع داروها با ساختارهای مختلف از سلول می‌شوند. خانواده ی ناقلین ABC، یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های پروتئینی هستند و در تمام ارگانیزم‌های زنده، از میکروب‌ها تا انسان دیده می‌شوند (۹). عملکرد و ساختار حفاظت شده دارند، در نتیجه حاوی نقشی حیاتی هستند. ساختار اساسی آن‌ها ترکیبی است از دمین‌های اتصال به ATP (NBD=Nucleotide Binding Domain) و دمین‌های عرض غشایی (TMD) حفاظت شده می‌باشد. سه گروه عمده ی ناقلین ABC که در MDR نقش دارند شامل P-gp کلاسیک (MDR1, ABCB1)، پروتئین مرتبط با MDR (Multidrug Related Protein=MRP)

(MRPها در زیرخانواده ی ABCC) و پروتئین ABCG2 می‌باشند (۱۰،۱۱). پروتئین MDR1 به عنوان جزء اصلی از خانواده ترانسپورترهای ABC، یک گلیکوپروتئین بزرگ غشایی با وزن مولکولی ۱۷۰ کیلو دالتون می‌باشد (۱۱). ژن کد کننده این پروتئین در روی کروموزوم شماره ۷ قرار دارد که دارای ۲۸ اگزون می‌باشد. بیان این ژن و به طور گسترده-ای در رده‌های سلولی حساس و مقاوم به دارو، بافت‌های تازه و بافت‌های پارافینه تومورال و سالم با استفاده از روش‌های RT-PCR و Real time PCR مطالعه شده است (۱۴-۱۶، ۱۷). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که بیان ژن MDR1 در بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال افزایش می‌یابد (۲۰-۱۸). در سال‌های اخیر روش‌های رایجی که برای بررسی بیان ژن‌ها استفاده می‌گردد روش‌های ژنتیک مولکولی شامل RT-PCR و Real time PCR می‌باشد. این روش‌ها دارای مزایا و معایبی هستند که در منابع به آن‌ها اشاره شده است (۲۱، ۲۲). در طی سال‌های اخیر ظهور فناوری نانو و ورود آن در حوزه‌های پزشکی و زیست مولکولی باعث تحول در روش‌های درمانی و تشخیصی شده است. نانو حس‌گرهای زیستی ابزارهایی بر پایه نانو فناوری می‌باشند که می‌توانند با دقت بالا مولکولی‌های زیستی را در نمونه‌های مجهول شناسایی نمایند (۲۳). در طراحی این حس‌گرها از روابط اختصاصی مولکول‌های زیستی مثل رابطه مکملی اسید-های نوکلئیک، آنتی‌ژن آنتی‌بادی و آنزیم سوبسترا استفاده می‌گردد. نانو حس‌گرهای زیستی به انواع الکتروشیمیایی، مکانیکی، فلورسانسی تقسیم می‌شوند. در بین آن‌ها نانو حس-گرهای فلورسانسی به دلیل دقت و حساسیت بالا بیشتر مورد توجه می‌باشند (۲۳). در طراحی حس‌گرهای زیستی فلورسانسی از نانوذرات مختلفی مثل نانوذرات کربنی، طلا، نقره و نقاط کوانتومی استفاده شده است (۲۳). نانو ذرات کربنی مثل نانولوله‌ها به خاطر داشتن ویژگی‌های دمایی، اپتیکی، مساحت سطحی بسیار بالا و امکان کنترل تمام این ویژگی‌ها از طریق عامل دار کردن شیمیایی باعث شده است

Transmission electron و Microscope (SEM) Energy X microscopy (TEM) و آنالیز اشعه X Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDX) مورد تایید قرار گرفت.

طراحی کاوش گره‌های اختصاصی برای ژن

MDR1

به منظور بررسی بیان ژن MDR1 با استفاده از روش نانوحس گر زیستی در نمونه بافت سرطانی، توای ژن MDR1 از سایت NCBI استخراج شد و کاوش گر اختصاصی برای بخش کد دهنده این ژن با استفاده از برنامه OLIGO طراحی شد و اختصاصی بودن آن برای ژن MDR1 با استفاده از نرم افزار Blast ارزیابی شد. بعد از سنتز، کاوش گر با استفاده از رنگ فلورسنس زای FAM نشان دار گردید. تمامی توای‌ها از شرکت Bioneer کره جنوبی خریداری گردید (جدول ۱).

که این نانوذرات در طراحی حس گرهای زیستی بیشتر مورد توجه قرار گیرند (۲۴، ۲۵). در این پروژه برای اولین بار یک نانو حس گر بر پایه نانولوله‌های کربنی برای سنجش بیان ژن MDR1 انسانی طراحی و ساخته شد و سپس عملکرد آن را در نمونه سرطانی کلورکتال مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت مرک آلمان خریداری شد. کاوش گره‌های DNA از شرکت Bioneer کره جنوبی تهیه گردید. ترايزول برای استخراج RNA و نانولوله کربنی چند دیواره کربوکسیله از شرکت Sima خریداری شدند. برای سنتز cDNA از کیت شرکت Fermentas آمریکا استفاده شد.

آنالیز میکروسکوپی نانولوله‌های کربنی

نانولوله کربنی بعد از تهیه با استفاده از روش های

آنالیز میکروسکوپ الکترونی Scanning Electron

جدول ۱. توای‌های اولیگونوکلوئیدی مربوط کاوش گر و رشته ماکمل

نوع توای	نام پرایمر	توای	دمای اتصال
کاوش گر	MDR1P	5'GAA GAG CAC AGT GGT CCA GC-3'	۶۴°C
توای مکمل کاوش گر	MDR1T	5-GCT GGA CCA CTG TGC TCT TC-3'	۶۴°C

در دمای آزمایشگاه قرار گرفت سپس طیف نشری در زمان-های مختلف خوانده شد. برای بهینه سازی غلظت نانولوله کربنی ۳۰ میکرولیتر از DNA پرب ۱۰۰ نانومولار با غلظت-های مختلف نانولوله کربنی مخلوط شد و مثل روش بالا با بافر تریس به حجم نهایی ۲ میلی لیتر رسانده شد سپس طیف نشری آن بعد از قرار گرفتن در روی شیکر لرزان مثل روش بالا به مدت ۲۰ دقیقه (زمان بهینه شده جذب DNA به نانولوله کربنی) با استفاده از دستگاه فلوریمتر خوانده شد.

هیبریداسیون و بهینه سازی نانوحس گر بر پایه

نانولوله کربنی برای شناسایی DNA هدف

تثبیت DNA کاوش گر MDR1 در سطح نانولوله

های کربنی

برای تثبیت DNA کاوش گر از روش غیر کووالان

استفاده شد. ابتدا برای بهینه سازی جذب DNA کاوش گر به

نانولوله کربنی از طریق پیوند های غیر کووالان $\pi-\pi$ فاکتور-

های زمان و غلظت نانولوله‌های کربنی بهینه سازی شد. مقدار ۳۰

میکرولیتر از DNA پرب ۱۰۰ نانومولار با ۱۵ میکرولیتر از

نانو نانولوله کربنی با غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر مخلوط

شده و با بافر تریس (200 mm NaCl, 5 mm KCl

and 5 mm MgCl₂. pH=8) به حجم نهایی ۲ میلی لیتر

رسانده شد. و در روی شیکر لرزان با دور ۱۶۰ دور در دقیقه

۱ میلی لیتر اتانول ۷۵ درصد شست و شو داده شد. در نهایت RNA حل شده در اتانول با سرعت ۷۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۸ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد سانترفیوژ گردید. بعد از سانترفیوژ فاز رویی را دور ریخته و رسوب حاصل خشک (رسوب RNA نباید کامل خشک گردد) شد. در نهایت رسوب خشک شده را در ۵۰ میکرولیتر آب عاری از Rnase حل گردید. بعد از استخراج RNA جهت اطمینان از عدم وجود DNA، RNA استخراج شده با Dnase نیز تیمار شد. محلول حاوی RNA در دمای ۲۰- و برای نگهداری طولانی مدت در دمای ۷۰- درجه قرار داده شد.

سنتز cDNA

بعد از استخراج RNA از نمونه‌های بافت سالم و توموری کلورکتال، غلظت RNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۶۰ نانومتر تعیین گردید. بعد از تعیین غلظت، مقدار ۲ میکروگرم از RNA هر نمونه برداشته به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد. سپس مقدار ۱/۲۵ میکرولیتر از ۱۰ میلی مول بر لیتر Dntp، ۵ میکرولیتر از بافر آنزیم رونوشت بردار معکوس و ۶۰ واحد آنزیم رونوشت بردار معکوس M-MuL شرکت فرمنتاز اضافه کرده به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد قرار داده شد. در نهایت نمونه های cDNA ساخته شده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه نگه داشته شد تا آنزیم غیر فعال شود. cDNA سنتز شده در دمای ۲۰- درجه نگهداری گردید.

بررسی بیان ژن MDR1 با استفاده از کاوش گر

اختصاصی تثبیت شده در سطح نانو حس گر

بعد از بهینه سازی عملکرد نانو حس گر با توالی مکمل سنتتیک، در واکنش هیبریداسیون به جای توالی مکمل از cDNA ساخته شده از نمونه بافت سالم و تومور کلورکتال استفاده گردید. ابتدا cDNA در دمای ۱۰۰ درجه به مدت ۵ دقیقه جوشانده شد سپس به دمای صفر درجه سانتی گراد انتقال داده شد. در واکنش هیبریداسیون مقدار ۳۰ میکرولیتر از DNA کاوش گر ژن MDR1 ۱۰۰ نانومولار با ۴۰

بعد از تثبیت کاوش گر مربوط به ژن MDR1 در سطح نانولوله کربنی، واکنش هیبریداسیون با استفاده از توالی مکمل کاوش گر انجام پذیرفت. در واکنش هیبریداسیون به منظور بهینه سازی زمان هیبریداسیون مقدار ۳۰ میکرولیتر از DNA کاوش گر ژن MDR1 ۱۰۰ نانومولار با ۱۵ میکرولیتر از نانولوله کربنی با غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر مخلوط شد و با بافر تریس (200 mm NaCl, mm (5KCl and 5 mm MgCl2. PH=8) به حجم نهایی ۲ میلی لیتر رسانده شد. بعد از ۲۰ دقیقه مقدار ۳۰ میکرولیتر از توالی مکمل کاوش گر با غلظت ۱۰۰ نانومولار اضافه شده و سپس طیف نشری آن در زمان‌های مختلف خوانده شد. بعد از بهینه سازی زمان هیبریداسیون، واکنش هیبریداسیون با غلظت های مختلف توالی مکمل کاوش گر ژن MDR1 نیز انجام پذیرفت و طیف نشری خوانده شد.

استخراج RNA

استخراج RNA کل از نمونه بافت سرطانی کلورکتال و سالم تهیه شده از بیمارستان شهریار تبریز با استفاده از روش ترايزول استخراج شد. برای استخراج RNA ابتدا ۵۰ میلی گرم از بافت سرطانی به هر میکروتیوب منتقل کرده به میزان ۱ میلی لیتر ترايزول اضافه گردید. پس از مخلوط کردن، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به مخلوط اضافه کرده و به مدت ۱۵ ثانیه با تکان ملایم (نه شدید) مخلوط گردید. در ادامه مخلوط به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری و سپس با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانترفیوژ شد. بعد از سانترفیوژ فاز رویی را به ویال های جدید استریل انتقال داده سپس به اندازه هم حجم فاز رویی ایزوپروپانول اضافه گردید. بعد از اضافه کردن ایزوپروپانول مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. سپس مخلوط حاصل با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانترفیوژ شد. بعد از سانترفیوژ فاز رویی را دور ریخته و رسوب مربوط به RNA با

استیوندنت در سطح احتمال $p < 0.05$ و $p < 0.01$ ارزیابی گردید.

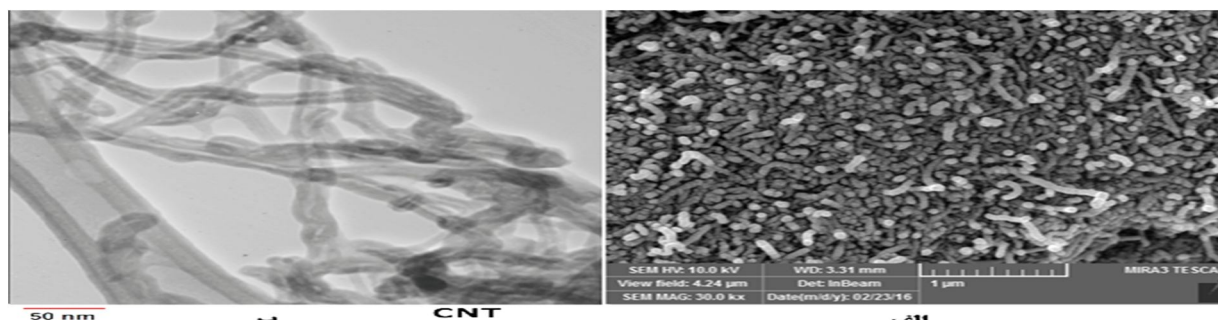
یافته‌ها

نانولوله های کربنی و آنالیز آن‌ها
نانو لوله های کربنی خریداری شده با استفاده
میکروسکوپ الکترونی TEM و SEM از نظر قطر و
مورفولوژی بررسی و تایید شد در نتایج SEM اندازه قطر
نانولوله ها تقریباً در ۲۰ تا ۳۰ نانومتر تخمین زده شد (شکل ۱).

میکروگرم از نانولوله کربنی با غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر
مخلوط شده و با بافر تریس به حجم نهایی ۲ میلی لیتر رسانده
شد. بعد از ۱۵ دقیقه مقدار ۳۰ میکرو لیتر از cDNA و اسرشت
شده بافت سالم و بافت توموری اضافه شد و بعد از ۱۵ دقیقه
طیف نشری خوانده شد.

تحلیل آماری

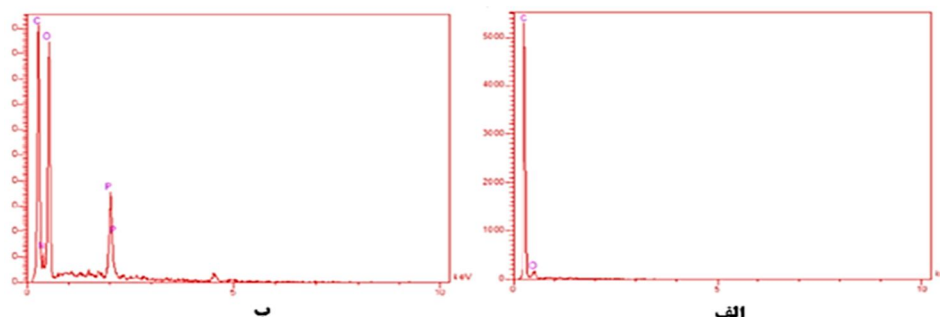
تمامی آزمایشات حداقل در سه تکرار انجام شد و
برای تحلیل آن‌ها از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ استفاده
گردید. تفاوت‌های آماری میانگین بیان سطح mRNA ژن
MDR1 در بافت سالم و سرطانی با استفاده از آزمون تی



شکل ۱. آنالیز (SEM) Scanning Electron Microscope و (TEM) Transmission Electron Microscopy مربوط به نانو لوله های کربنی

MDR1 تایید کننده اتصال DNA کاوش گر به نانولوله کربنی می باشد (شکل ۲).

آنالیز EDX تثبیت کاوش گرهای ژن MDR1 در
سطح نانولوله های کربنی را تایید نمود. در نتایج EDX،
وجود عناصر N و P در ترکیب نانولوله کربنی- کاوش گر ژن

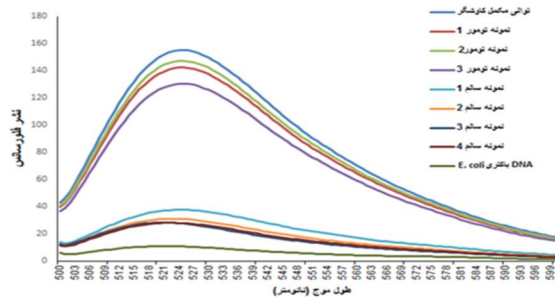


شکل ۲. آنالیز (Energy dispersive X-Ray Analysis (EDX) جهت تایید تثبیت DNA در سطح نانولوله کربنی. الف) EDX مربوط به نانولوله کربنی، ب) EDX مربوط به DNA کاوش گر بعد از تثبیت در سطح نانولوله کربنی

هدف نشر نوری افزایش یافت تا اینکه به بیشتر مقدار خود (قبل از تثبیت) رسید.

بررسی بیان ژن MDR1 در cDNA بیماران سرطان کولورکتال

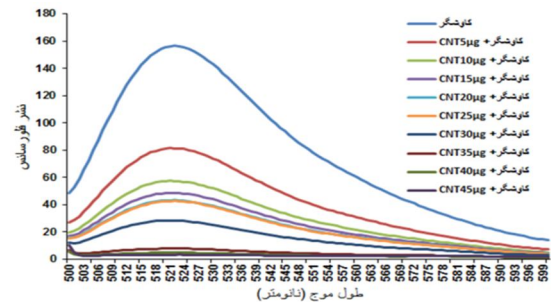
نمونه cDNA سنتز شده از بافت توموری و سالم ۴ بیمار سرطان کولورکتال برای بررسی بیان ژن MDR1 با استفاده از نانو حسگر زیستی ساخته شده مورد استفاده قرار گرفت. نتایج مربوط به بررسی نشر فلورسانس بعد از واکنش هیبریداسیون نشان داد که به محض اضافه کردن cDNA بافت توموری و سالم، میزان نشر فلورسانس در طول موج ۵۲۲ نانومتر افزایش یافت (شکل ۴).



شکل ۴. واکنش هیبریداسیون نانو حسگر با cDNA بافت تومورال بیماران سرطان کولورکتال. در اثر هیبرید شدن رشته مکمل کاوش گر میزان نشر افزایش می یابد. در نمونه cDNA افراد سالم و مریض بر اساس سطح بیان ژن MDR1 میزان ظاهر شده نشر فلورسانس متفاوت می باشد.

مقایسه میانگین نشر فلورسانس مربوط به نمونه های cDNA بافت توموری و سالم نشان داد که میزان نشر فلورسانس در طول موج ۵۲۲ نانومتر در نمونه های بافت توموری به طور معنی دار بیشتر از نمونه های سالم بالا می باشد ($p < 0.01$) (شکل ۵). این پدیده نشان دهنده بیان بالای ژن MDR1 در نمونه بافت توموری نسبت به بافت سالم می باشد. در این آزمایش توالی سنتتیک مکمل کاوش گر به عنوان کنترل مثبت و DNA ژنومی باکتری اشرشیاکلی به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

آماده سازی نانو حسگر ژن MRP1 بر پایه نانولوله کربنی
برای آماده سازی نانو حسگر ژن MDR1، کاوش گر ژن MDR1 در سطح نانولوله های کربنی تثبیت گردید. نتایج بهینه سازی فاکتورهای زمان و غلظت نانولوله کربنی نشان داد که بعد از ۲۰ دقیقه و غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر، تمام مولکول های DNA کاوش گر در سطح نانولوله کربنی جذب شدند و نشر فلورسانسی کاوش گر نشان دار شده با FAM در طول موج ۵۲۲ نانومتر خاموش گردید (شکل ۳).

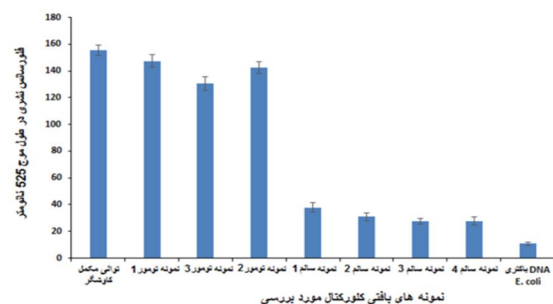


شکل ۳. خاموش شدن نشر فلورسانس کاوش گر ژن MDR1 در اثر اتصال به نانولوله کربنی. با افزایش غلظت نانولوله میزان نشر فلورسانس کاهش می یابد و نهایتاً در غلظت ۴۰ میکروگرم کاملاً خاموش می گردد.

هیبریداسیون DNA هدف با نانو حسگر ژن MDR1 بر پایه نانولوله کربنی

بعد از بهینه سازی تثبیت کاوش گر ژن MDR1 در سطح نانولوله کربنی، عملکرد آن برای شناسایی توالی هدف سنتتیک مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور فاکتور زمان هیبریداسیون و غلظت توالی هدف سنتتیک در واکنش هیبریداسیون بررسی شد. در واکنش هیبریداسیون در اثر هیبرید شدن کاوش گر ژن MDR1 با توالی مکمل، دوباره نشر فلورسانس ظاهر شد. نتایج بهینه سازی زمان هیبریداسیون، بهینه زمان هیبرید شدن کاوش گر با توالی هدف را ۱۴ دقیقه تعیین نمود. در واکنش هیبریداسیون با افزایش غلظت توالی

طریق پیوند های غیر کوآلان $\pi-\pi$ به سطح نانولوله های کربنی جذب می شوند. این پدیده باعث نزدیکی ترکیب رنگی فلورسنس زا به سطح نانولوله و خاموش شدن نشر فلورسانس آن می گردد. DNA تک رشته جذب شده در سطح نانولوله در اثر هیبرید شده با توالی مکمل خود، به صورت DNA دو رشته ای درآمده و از سطح نانولوله جدا می گردد. این پدیده باعث ظاهر شدن دوباره نشر فلورسنس آن می شود (۲۷). در این مطالعه کاوش گر طراحی شده برای ژن MDR1 با استفاده از رنگ فلورسنت زای FAM نشان دار گردید. برای ساخت نانوحس گر، کاوش گر نشان دار شده ژن MDR1 در سطح نانوکربنی تثبیت شد. تثبیت کاوش گر در سطح نانولوله باعث خاموشی نشر فلورسنس FAM در طول موج ۵۲۵ نانومتر گردید (شکل ۳). علت این پدیده مربوط به قدرت خاموش کنندگی نانولوله کربنی می باشد که با جذب مولکول DNA تک رشته نشان دار از طریق پیوند های $\pi-\pi$ به سطح خود باعث خاموشی نشر فلورسنس آنها می گردند. (۲۵). در بررسی سینتیک واکنش اتصال کاوش گر به سطح نانولوله کربنی فاکتور های مدت زمان تثبیت و غلظت نانولوله کربنی بهینه سازی شد. در نتایج، زمان ۲۰ دقیقه به عنوان بهینه زمان و غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر به عنوان بهینه غلظت برای تثبیت کاوش گر انتخاب گردید. در طی این شرایط کلیه مولکول های کاوش گر به سطح نانولوله کربنی متصل شدند و نشر فلورسانس FAM در طول موج ۵۲۵ نانومتر کاملاً خاموش گردید. در واکنش هیبریداسیون به محض اضافه شدن رشته مکمل و cDNA هدف کاوش گر، دوباره نشر فلورسانس در طول موج ۵۲۵ ظاهر گردید و با افزایش غلظت cDNA میزان نشر فلورسانس بیشتر شد. دلیل این پدیده می تواند به جدا شدن DNA کاوش گر از سطح نانولوله در اثر دو رشته شدن آن باشد (۲۸). در منابع گزارش شده است که در اثر اضافه شدن رشته مکمل پرب اتصالات $\pi-\pi$ کاوش گر به نانولوله کربنی از بین می رود و کاوش گر از نانولوله کربنی جدا شده و با از بین رفتن اثر خاموش کنندگی نانولوله کربنی،



شکل ۵. مقایسه بیان ژن MDR1 در نمونه های تومری و سالم بیماران سرطان کولورکتال بر اساس نشر فلورسانس. میزان نشر فلورسانس به طور معنی دار بیشتر از نمونه بافت سالم می باشد که نشان دهنده بیان بالای این ژن می باشد.

بحث

مقاومت های دارویی یکی از علل رایج در عدم موفقیت در درمان می باشد. در بررسی مکانیسم های مولکولی تغییر در بیان برخی از پروتئین های خانواده Adenosine triphosphate Cassette (ABC) (Transporter) باعث تغییر در عملکرد آنها و پمپ شدن دارو با فرم های مختلف از سلول می گردد (۱۰، ۱۱، ۲۶). در این پروژه یک نانو حس گر فلورسانسی بر پایه نانولوله کربنی برای سنجش بیان MDR1 به عنوان یکی از کلیدی ترین پروتئین های این خانواده طراحی گردید. با توجه به مطالعات قبلی در سرطان کولورکتال بیان پروتئین MDR1 در اکثر موارد افزایش می یابد (۱۴، ۱۵). افزایش بیان این پروتئین باعث تغییر پروتئین های غشایی شده و ب عدم پاسخ بیمار به شیمی درمانی می شود (۱۶، ۱۷). بنابراین سنجش میزان بیان پروتئین MDR1، در تعیین نوع روش درمان برای این بیماری بسیار حائز اهمیت می باشد. در واقع پزشک معالج می تواند به جای صرف وقت بیمار جهت شیمی درمانی، از روش دیگری برای سرکوب تومور استفاده کند. اساس در طراحی این حس گر استفاده خواص منحصر فرد نانولوله های کربنی در خاموش کردن نشر فلورسانس رنگ های فلورسنس زا در طی فرآیند FRET (fluorescence resonance energy transfer) می باشد. مولکول های DNA تک رشته ای از

روش های PCR برای مطالعات بیان ژن در سطح mRNA در سرطان های انسانی مورد استفاده قرار بگیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مدیریت محترم بیمارستان شهریار تبریز که همکاری های لازم را در تهیه نمونه و به ثمر رسیدن این تحقیق داشتند تشکر و قدردانی می شود.

منابع

1. Jeffrey A. Meyerhardt M.D, Robert J. Mayer, M.D. Systemic Therapy for Colorectal Cancer. New England journal of medicine. 2005; 352:476-87.
2. Wang WS, Chen PM, Su Y. Colorectal carcinoma: from tumorigenesis to treatment. Cell Mol Life Sci. 2006; 63:663-71.
3. Decosse J.J, Tsioulis G.J and Jacobson J.S. Colorectal cancer: detection, treatment and rehabilitation. 1994; 44: 27-42.
4. Hammond WA, Swaika A and Mody K. Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. Therapeutic Advances in Medical Oncology. 2016; 8: 47-84.
5. Housman BS, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N and Sarkar S. Drug Resistance in Cancer: An Overview. Cancers 2014; 6:1769-1792.
6. Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. J Pathol 2005; 205(2): 275-292.
7. Liscovitch M, Lavie Y. Cancer multidrug resistance: A review of recent drug discovery research. IDrugs 2002; 5(4): 349-355.
8. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. Nat. Rev. Cancer 2002; 2:48-58.
9. Borst P, Elferink O. Mammalian ABC transporters in health and disease. Annu. Rev. Biochem. 2002; 71: 537-592.
10. Leonard GD, Fojo T, Bates SE. The role of ABC transporters in clinical practice. Oncologist. 2003;8:411-24

دوباره نشر فلورسنس FAM ظاهر می گردد (۲۸). بعد از آماده سازی نانوحس گر و بهینه سازی عملکرد آن با توالی مکمل سنتتیک، نمونه cDNA مربوط به بافت تومور و سالم بیماران سرطان کولورکتال برای سنجش بیان ژن MDR1 مورد بررسی قرار گرفت. در تمام نمونه های سالم و بیمار به محض اضافه شدن cDNA نشر فلورسنس ظاهر گردید. این پدیده نشان دهنده اتصال اختصاصی cDNA مربوط به ژن MDR1 به توالی کاوش گر در سطح نانو حس گر می باشد (۲۹). در حالی که در نمونه کنترل منفی DNA باکتری هیچ نشر فلورسانسی بعد از هیبریداسیون مشاهده نگردید. همان طور که در شکل های ۴ و ۵ مشاهده می شود میزان نشر فلورسنس در نمونه سالم و تومور متغیر مشاهده می شود در نمونه های تومور به طور معنی داری بیشتر از نمونه سالم می باشد این پدیده بیان گر بالا بودن سطح بیان MDR1 در نمونه فوق-الذکر می باشد. نتایج به دست آمده در این تحقیق با نتایج گزارشات قبلی بررسی بیان MDR1 با استفاده از RT-PCR و Real Time PCR در بافت های توموری کولورکتال همخوانی دارد (۳۰-۳۲). در اکثر منابع افزایش بیان MDR1 در سرطان کولورکتال گزارش شده است (۳۲، ۳۳).

نتیجه گیری

در این تحقیق اولین بار یک نانوحس گر زیستی بر پایه نانو لوله های کربنی طراحی گردید. پس از بهینه سازی آن با توالی مکمل سنتتیک، عملکرد آن سنجش بیان ژن MDR1 در نمونه بافت توموری سرطان کولورکتال بررسی شد. در نتایج، با توجه به سطح فلورسانس معنی دار نمونه سرطانی نسبت به شاهد افزایش بیان ژن MDR1 مشاهده گردید. در نهایت نتایج بررسی بیان ژن MDR1 با استفاده از روش حس گرزیستی نشان داد که بیان این در نمونه بافت توموری سرطان کولورکتال نسبت به نمونه سالم افزایش می یابد. علاوه بر این، نتایج این تحقیق نشان داد که حس گر زیستی بر پایه نانولوله کربنی می تواند به عنوان ابزار قدرت مندی در کنار

11. Leonard GD, Fojo T, Bates SE. The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist*. 2003; 8:411–24
12. Baguley BC. Multiple drug resistance mechanisms in cancer. *Mol Biotechnol*. 2010; 46:308–16.
13. Liscovitch M, Lavie Y. Cancer multidrug resistance: A review of recent drug discovery research. *IDrugs* 2002; 5(4): 349-355.
14. Abolhoda A, Wilson A, Ross H, Danenberg PV, Burt M, Scotto KW. Rapid activation of MDR1 gene expression in human metastatic sarcoma after in vivo exposure to doxorubicin. *Clin. Cancer Res*. 1999; 5: 3352–3356.
15. Wang S, Cao YF, Yang ZQ, Jiang ZY, Cai B, Guo J, Zhang S, Zhang XL and Gao F. MicroRNA-93-5p increases multidrug resistance in human colorectal carcinoma cells by downregulating cyclin dependent kinase inhibitor 1A gene expression. *Oncology Letters*. 2017; 13: 722-730.
16. Goldstein LJ, Galski H, Fojo A, Willingham M, Lai SL, Gazdar A, et al. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J Natl Cancer Inst*. 1989; 81 (2):116–124.
17. Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, et al. Expression of a multidrug resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84(1): 265- 269.
18. Meijer GA, Schroeijers AB, Flens MJ, Meuwissen SG, van der Valk P, Baak JP, et al. Increased expression of multidrug resistance related proteins Pgp, MRP1, and LRP/MVP occurs early in colorectal carcinogenesis. *J Clin Pathol*. 1999; 52:450–4.
19. Samanian S, Mahjoubi B, Mahjoubi F, Mirzaee R and Azizi R. Investigation of the genes MDR1/MRP1 and their relationship with clinical and para-clinical characteristics of colorectal cancer. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences* 2013; 15: 31-34.
20. Hinoshita E, Uchiumi T, Taguchi K, Kinukawa N, Tsuneyoshi M, Maehara Y, et al. Increased expression of an ATP-binding cassette superfamily transporter, multidrug resistance protein 2, in human colorectal carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2000; 6:2401–7.
21. Bustin SA, Benes V, Nolan T and Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2005; 34:597–601.
22. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2002; 29:23–39.
23. Razavi H, Janfaza S. Medical nanobiosensors: A tutorial review. *Nanomedicine Journal*. 2015; 2:74-87.
24. Wen J, Xu Y, Li H, Lu A and Sun S. Recent applications of carbon nanomaterials in fluorescence biosensing and bioimaging. 2015; 51: 11346-11358.
25. Pérez-López B and Merkoçi A. Carbon nanotubes and graphene in analytical sciences. *Microchim Acta*. 2012; 179:1-16.
26. Cinci L, Luceri C, Bigagli E, Carboni I, Paccosi S, Parenti A, Guasti D and Coronello M. Development and characterization of an in vitro model of colorectal adenocarcinoma with MDR phenotype. *Cancer Medicine*. 2016; 5(6): 1279-1291.
27. Kumar S, Rani R, Dilbaghi N, Tankeshwar K, Kim K-H. Carbon nanotubes: a novel material for multifaceted applications in human healthcare. *Chemical Society Reviews*. 2017; 46(1):158-196.
28. Li H, Tian J, Wang L, Zhang Y, Sun X, Multi-walled carbon nanotubes as an effective fluorescent sensing platform for nucleic acid detection. *J. Mater. Chem*. 2011; 21, 824- 828
29. Zhang J, Kruss S, Hilmer AJ, Shimizu S, et al. A rapid, direct, quantitative, and label-free detector of cardiac biomarker troponin T using near-infrared fluorescent single-walled carbon nanotube sensors. *Adv. Healthcare Mater*. 2014; 3, 412–423
30. Tokunaga Y, Hosogi H, Hoppou T, et al. Effects of MDR1/P-glycoprotein expression on prognosis in advanced colorectal cancer after surgery. *Oncol Rep* 2001; 8(4): 815-819.
31. Reymann A, Woermann C, Froschle G, et al. Sensitive assessment of cytostatic drug resistance

mediating factors MDR1 and MRP in tumors of the gastrointestinal tract by RT-PCR. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1998; 36(1): 55-57.

32. Pirker R, Wallner J, Gsur A, et al. MDR1 gene expression in primary colorectal carcinomas. *Br J Cancer* 1993; 68(4): 691-694.

33. Tokunaga Y, Hosogi H, Hoppou T, Nakagami M, Tokuka A, Ohsumi K. Effects of MDR1/P glycoprotein expression on prognosis in advanced colorectal cancer after surgery. *Oncol Rep*. 2001; 8:815-9.