



دانشگاه آزاد اسلامی

واحد تهران مرکزی

فرم پیشنهاد تحقیق دکتری

عنوان پایان نامه:

ارزیابی اثر تشدیدکنندگی سیلیمارین بر مرگ سلولی القا شده توسط پرتو ایکس مگا ولتاژ در رده سلولی کبدی 2HepG در محیط کشت سه بعدی

نام و نام خانوادگی:	شماره دانشجویی:
رشته و گرایش: مهندسی هسته ای گرایش پرتو پزشکی	دانشکده: فنی مهندسی
آدرس، تلفن ثابت و همراه:	
استاد راهنما: دکتر مهدی صالحی باروق دکتر جمیل زرگان	استاد مشاور:

انتخاب استاد راهنما و استاد مشاور بر اساس بخشنامه 73/28996 مورخ 93/2/15 توسط دانشجو آقای
نبی الله بخشنده بلامانع می باشد.

نام و نام خانوادگی مدیر گروه

تاریخ و امضاء

اینجانب نبی الله بخشنده با توجه به آگاهی از تکمیل ظرفیت استاد راهنما/استاد مشاور تعهد می نمایم که
عواقب ناشی از تاخیر در صدور کد شناسایی پایان نامه را پذیرفته و حق هر گونه اعتراض را از خود سلب
می نمایم.

نام و نام خانوادگی دانشجو

تاریخ و امضاء

این قسمت توسط گروه آموزشی و پژوهش دانشکده تکمیل خواهد شد

	تاریخ تحویل پروپزال به گروه
	تاریخ تصویب پروپزال در شورای تخصصی گروه
	شماره و تاریخ تصویب پروپزال در شورای پژوهشی دانشکده
	تاریخ اخذ کد
	کد پایان نامه

1- اطلاعات استاد راهنما و مشاور:

مسئولیت	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	پایه	نام پدر	ش ش	محل تولد	سال تولد
راهنما	مهدی صالحی باروق						
راهنما	جمیل زرگان						
مشاور							
مشاور							

2- اطلاعات مربوط به پروپزال:

الف- عنوان تحقیق

1- عنوان به زبان فارسی:

ارزیابی اثر تشدیدکنندگی سیلیمارین بر مرگ سلولی القاشده توسط پرتو ایکس مگاولتاژ در رده سلولی کبدی 2HepG در محیط کشت سه بعدی

عنوان به انگلیسی:

Evaluation of the Potentiating Effect of the Silymarin on Megavoltage X-Ray Induced Cell Death in the Liver Cell Line HepG2 in three-dimensional Culture Medium

ب - تعداد واحد پایاننامه: 18 واحد

ج- بیان مسأله اساسی تحقیق به طور کلی (شامل تشریح مسأله و معرفی آن، بیان جنبه‌های مجهول و مبهم، بیان متغیرهای مربوطه و منظور از تحقیق):

سیروز کبدی آخرین مرحله امراض کبدی همراه با نکروز هپاتوسیت ها و فیبروز می باشد. این بیماری یکی از نگرانی های سازمان بهداشت جهانی است که میزان مرگ و میر بالایی دارد (1). کارسینوم هپاتو سلولار (HCC)، از لحاظ شیوع، هفتمین سرطان دنیاست و یکی از پرتکرارترین و مقاومترین تومورهای بدخیم است و جزء سومین عامل مرگ و میر ناشی از آن در جهان می باشد (2). توده های کبدی توسط روش های تشخیصی مختلفی از قبیل روش های بالینی، رادیولوژیک و آسیب شناسی تشخیص داده می شوند. طیف گسترده ای از ضایعات در تشخیص های افتراقی مطرح می شوند، اما در مجموع می توان این ضایعات را در دو دسته کلی ضایعات خوش خیم و بد خیم طبقه بندی کرد (2). بیماریهای مزمن کبدی و سیروز کبدی از جمله فاکتورهای خطر برای توسعه این سرطان محسوب می شوند (3). از آن جایی که هنوز مکانیسم های مولکولی اساسی که منجر به HCC می شوند. کاملاً مشخص نشده است، بنابراین شناسایی مسیرهای مولکولی مرتبط با HCC که ممکن است به یافتن استراتژی های مناسب جهت پیشگیری و درمان HCC کمک کند، از اهمیت بالایی برخوردار است (4). در حال حاضر موثرترین درمان برای HCC، هپاتکتومی است (4). با این حال، میزان عود تومور بعد از برداشتن آن تقریباً 70 درصد می باشد (4). سلول های HepG2 نسبت به تابش مقاومت نسبی دارند و نیازمند دوز بالای تابش برای القای اثر کشنده هستند (5،6،7). دوز بالای تابش می تواند بافت های سالم اطراف را آسیب بزند و عوارض جانبی ایجاد کند (8). گیاهان دارویی از قدیم الایام در درمان انواع بیماری به کار می رود. عصاره ی خام میوه های (دانه های رسیده ی) خار مریم (*Silybum marianum*) قرن ها برای درمان ناراحتی های دستگاه گوارش فوقانی، بیماری های کبدی، مجاری صفراوی و همچنین برای اختلالات قاعدگی و رگ های واریسی مورد استفاده قرار گرفته است (9). سیلیمارین، یک فلاونوئید طبیعی از گیاه خار مریم است که از چهار فلاونوئید ایزومریک شامل سیلی کریستین، ایزوسیلیبین، سیلی دیانین و سیلیبین تشکیل شده است و می تواند حساسیت سلول ها به تابش را افزایش دهد (10،11،12). فرمول شیمیایی بیشترین ماده موثره در ترکیب سیلیمارین شامل $C_{25}H_{22}O_{10}$ می باشد. این گیاه در رده بندی گیاهی در خانواده Asteraceae قرار می گیرد و بومی اروپا می باشد اما در سایر نقاط جهان نیز یافت می شود (13). شواهد بالینی مختلف قابلیت ضد سرطانی سیلیمارین را برای سرطان های پروستات، سینه، اکتوسرویکال، تخمدان، پستان، سرطان دهانه ی رحم انسان، ریه، کبد، کولون، روده ی بزرگ و ... نشان داده اند. سیلیمارین با چند مکانیسم مختلف از جمله: مهار رگزایی، مهار تهاجم و متاستاز، القای آپوپتوز، مهار رشد چرخه ی سلولی و فعالیت ضد التهابی به مهار سلول های سرطانی کمک می کند. سیلیمارین از طریق مهار فسفریلاسیون و تخریب I-Kb فعالیت NF-Kb که $TNF\alpha$ را تولید می کند را متوقف می سازد (14). و موجب مهار MAPK و JNK که توسط $TNF\alpha$ تولید می شود می گردد و سمیت سلولی و فعال سازی کاسپاز ناشی از TNF را متوقف می سازد (15).

درمان های استاندارد شامل جراحی، شیمی درمانی و پرتودرمانی هستند، اما مقاومت سلول ها به تابش باعث محدود شدن اثربخشی درمان پرتویی می شود (16). مطالعات نشان داده اند که سیلیمارین باعث افزایش ROS و آپوپتوز در سلول های سرطانی می شود و مسیرهای بقا را مهار می کند (17). سیلیمارین دارای اثرانتخابی ناشی از تفاوت های بنیادین بین سلول سالم و سلول سرطانی دارد (خاصیت محافظت کننده و خاصیت حساس کننده) که در سلول های سالم بدلیل پایین بودن سطح ROS و متعادل بودن سیستم آنتی اکسیدانی و اینکه در سلول سالم چرخه سلولی تنظیم شده است و ترمیم DNA کارآمد بوده و وابستگی به سیگنال های بقا کم می باشد برخلاف سلول های سرطانی دارای خاصیت محافظت کنندگی می باشد (31).

بررسی اثر هم افزایی سیلیمارین و تابش در مدل سه بعدی HepG2 تاکنون انجام نشده است. مشخص نیست چه میزان سیلیمارین می تواند دوز تابش لازم برای ایجاد اثر کشنده مشابه را کاهش دهد. با وجود مطالعات بالا به نظر می رسد هنوز اطلاعات کافی در خصوص نحوه دقیق عملکرد اثر هم افزایی سیلیمارین و تابش در مدل سه بعدی HepG2 در شرایط مختلف وجود ندارد، در

مطالعه حاضر، رده سلولی HepG2 (سرطان هپاتوسلولار انسانی) به عنوان مدل کارسینوم هپاتوسلولار انتخاب شد و تاثیر اثر هم افزایی آنتی اکسیدان سیلیمارین و تابش پرتو ایکس مگاولتاژ در محیط کشت سه بعدی و میزان زنده ماندن سلول ها در غلظت های مختلف بررسی خواهد شد. لذا مسئله اصلی این تحقیق این است آیا ترکیب سیلیمارین با پرتو ایکس مگاولتاژ می تواند موجب افزایش اثرات زیستی، افزایش مرگ سلولی، کاهش زنده ماندن و افزایش آسیب DNA در رده سلولی HepG2 در شرایط سه بعدی شود؟

د - اهمیت و ضرورت انجام تحقیق (شامل اختلاف نظرها و خلاءهای تحقیقاتی موجود، میزان نیاز به موضوع، فواید احتمالی نظری و عملی آن و همچنین مواد، روش و یا فرآیند تحقیقی احتمالاً جدیدی که در این تحقیق مورد استفاده قرار میگیرد):

بایبشرفت دانش و فناوری هسته ای و بهره برداری رو به رشد آن در توسعه نیروگاه ها، راکتورها و مراکز پرتودرمانی، میزان پرتوگیری حاد در افراد به دلیل احتمال حوادث پرتوی افزایش می یابد. بنابراین توسعه و کاربرد روز افزون پرتوهای یون ساز و به تبع آن احتمال قرارگیری انسان در برابر تشعشعات، اهمیت توسعه تحقیقات در زمینه حفاظت در برابر این پرتوها به منظور جلوگیری از اثرات جانبی پرتوها بر کادر درمان و بیماران را بیش از پیش ضروری ساخته است. امروزه بررسی روش های بیولوژیکی جهت تعیین دوز دریافتی یا دوزیمتری افراد تابش دیده در حوادث پرتویی مذکور برای مداخله پزشکی سریعتر حائز اهمیت بوده و در دستور کار سازمان های ذی ربط قرار می گیرد (18). مهم ترین هدف دوزیمتری، کنترل منظم میزان پرتوگیری افراد تحت تابش است (19). سرطان کبد Hepatocellular carcinoma یکی از چالش برانگیزترین سرطان ها برای درمان پرتویی است، زیرا سلول های HepG2 نسبت به تابش مقاومت نسبی دارند (10، 2). این مقاومت، نیاز به دوز بالای تابش و در نتیجه افزایش آسیب به بافت های سالم را ایجاد می کند (2). استفاده از رادیوسنسیتایزرهای طبیعی مانند سیلیمارین می تواند: حساسیت سلول ها به تابش را افزایش دهد (10، 17، 6). میزان دوز مورد نیاز تابش برای رسیدن به اثر کشنده را کاهش دهد و عوارض جانبی را محدود کند (6). در ترکیب با مدل سه بعدی، داده های دقیق تر و قابل تعمیم به شرایط بالینی ارائه دهد (20). سرطان کبد در ایران رو به افزایش است. پژوهش در حوزه پرتو پزشکی کمتر روی مواد طبیعی و حساس کننده ها متمرکز بوده است و ترکیب پرتودرمانی با ترکیبات کم خطر مانند سیلیمارین می تواند به کاهش دوز مورد نیاز تابش کمک کند. بنابراین این پژوهش می تواند پایه ای برای طراحی درمان های ترکیبی با سیلیمارین و پرتودرمانی، بهینه سازی دوز و برنامه های درمانی در بیماران HCC فراهم کند و کاهش عوارض ناشی از تابش و افزایش اثربخشی درمان باشد و اطلاعات دقیق درباره اثرات پرتویی و زنده ماندن سلول ها ارائه دهد.

ه- مرور ادبیات و سوابق مربوطه (بیان مختصر پیشینه تحقیقات انجام شده در داخل و خارج کشور پیرامون موضوع تحقیق و نتایج آنها و مرور ادبیات و چارچوب نظری تحقیق)

□ حمیدی بگه جان و همکاران (1404) نقش سیلیمارین در مهار سلول های سرطانی را بررسی کردند. این پژوهش با استفاده از دوزهای $10,30,90 \mu\text{g}/\text{ml}$ سیلیمارین خاصیت سیتوتوکسیک آن را با استفاده از تست MTT بر روی لاین سلولی AGS مورد بررسی قرار داد. آنالیز داده های این تست نشان داد که زنده ماندن سلولی با افزایش دوز دارو کاهش یافته است. با استفاده از دوزهای متناسب و تا حدودی بالای سیلیمارین در کنار خاصیت محافظت بافتی آن مهار فعالیت سلول های سرطانی AGS را نیز داشته باشیم (21).

□ مطالعه رحیمی و همکاران (1404) اثرات ضد تکثیری و ضد تلومرازی سیلیمارین بر سلول های سرطان روده بزرگ و کبد انسان. نشان داد که، سیلیمارین به عنوان آنتی تلومراز و مهارکننده ی ترانس کریپتاز معکوس در سرطان کولورکتال انسان و کارسینومای کبدی عمل می کند (22).

□ ملک زاده و همکاران (1403) سیلیمارین گزینه های نوین در مدیریت بیماریهای کبدی و سرطان را بررسی کردند. یافته های این پژوهش نشان داد که، سیلیمارین عصاره ای از گیاه خار مریم به عنوان یک درمان طبیعی با خواص آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و ضد فیبروتیک، به ویژه در درمان اختلالات کبدی و سرطان مورد توجه قرار گرفته است. این ترکیب می تواند از تجمع چربی در کبد جلوگیری کرده و عملکرد کبدی بیماران مبتلا به الکلیسم را بهبود بخشد. همچنین، سیلیمارین به عنوان یک عامل حمایتی در درمان عفونت های HIV و عفونت های میکروبی با مهار باکتری ها و قارچ های مقاوم به آنتی بیوتیک بررسی شده است. با توجه به ایمنی و عدم وجود عوارض جانبی قابل توجه، سیلیمارین به عنوان گزینه ای امیدوار کننده در مدیریت بیماریهای کبدی و سرطان و همچنین به عنوان محصولی طبیعی با کاربردهای اقتصادی در صنایع داروسازی و کشاورزی مطرح می شود (23).

□ نجفی و همکاران (1398) پژوهشی با عنوان "تأثیر آنتی اکسیدانی و پرواکسیدانی آمینوگوانیدین بر رده سلولی سرطان کبد انسان (HEPTG2)" انجام دادند. این مطالعه به منظور بررسی تأثیر آمینوگوانیدین بر میزان تولید ROS و زنده ماندن در سلول های کبدی انجام شد. مواد و روش ها در این مطالعه تجربی، میزان زنده ماندن سلول های HepG-2 با روش MTT بررسی شد. میزان ROS با روش فلوریمتری و با استفاده از رنگ DCFDA اندازه گیری و با میکروسکوپ فلورسانس عکس برداری شد. یافته ها آزمون MTT تقریباً 50 درصد کاهش در فعالیت متابولیکی سلول ها را در غلظت 40 میلی مولار (2/5) $\pm$ 54/8 آمینوگوانیدین بعد از 24 ساعت نشان داد. نتایج آزمون ROS نشان داد که آمینوگوانیدین در دوزهای بالاتر از 40 میلی مولار با الگوی وابسته به غلظت، قادر به افزایش میزان تولید ROS در مقایسه با کنترل می باشد. استنتاج: با توجه به این که آمینوگوانیدین موجب افزایش میزان تولید ROS و کاهش درصد زنده ماندن سلول ها در غلظت 40 میلی مولار و بالاتر شد، لذا می تواند باعث القای مسیرهای دیگر سلولی شامل اکسیداتیو و نیتروزاتیو استرس، آپوپتوز و نکروز در سلول شود. از طرفی مشاهده شد که آمینوگوانیدین در غلظت های پایین تر از 40 میلی مولار می تواند به صورت آنتی اکسیدان نیز عمل کند که بررسی این رفتار جالب دوگانه نیاز به مطالعات بیش تری دارد (24).

□ وانگا¹ و همکاران (2023) پژوهشی با عنوان "سیلیمارین در درمان سرطان: مکانیسم های عمل، نقش های محافظتی در سمیت ناشی از شیمی درمانی و فرمولاسیون های نانو" انجام دادند. این مطالعه مروری بر پایه خلاصه سازی و تحلیل عملکردها و مکانیسم های ضدسرطانی سیلیمارین در هر دو شکل آزاد و نانوفورمولاسیون، و همچنین نقش های محافظتی آن در برابر عوارض جانبی شیمی درمانی است. یافته ها نشان داد که سیلیمارین علاوه بر داشتن خواص ضدالتهابی، تعدیل کننده سیستم ایمنی و آنتی اکسیدانی، دارای عملکرد ضدسرطانی نیز هست. سیلیمارین نقش های محافظتی مهمی را در برابر سمیت های ناشی از شیمی درمانی (مانند سمیت کلیوی، کبدی، قلبی و عصبی) ایفا می کند (25).

□ اردی² و همکاران (2023) حساسیت رادیویی نانوذرات نقره سنتز شده توسط گیاه خار مریم بر روی سلول های HEPG2 را مطالعه کردند. بررسی و اثبات اثر حساس کنندگی به پرتو (Radio-sensitizing effects) این نانو ذرات در ترکیب با پرتو ایکس (X-ray) بر روی سلول های HEPG2 انجام گرفت. جهت سنجش حساسیت به پرتو سلول های HEPG2 تیمار شده با نانو ذرات نقره (در غلظت IC50 معادل 42 میکروگرم بر میلی لیتر) به مدت 1، 2 و 4 ساعت، در معرض تابش تک دوز (Gy6) پرتو ایکس 6MV قرار دادند. ترکیب نانوذرات نقره با پرتو ایکس (6 گری) منجر به کاهش چشمگیر زیستایی سلول ها شد، که نشان دهنده اثر حساس کنندگی به پرتو قوی است (کمترین

1. Wang a

2. Erdi Bilgic , Nina Tuncel , and Timur Koca

زیستایی در 2 ساعت انکوباسیون با نانوذرات و سپس پرتو: 8.4(%) . همچنین عصاره خار مریم به تنهایی اثر محافظت در برابر پرتو ناچیز داشت(26).

□ جی یانگ و همکاران³ (2021) اتوفاژی و گلیکولیز به طور مستقل آپوپتوز ناشی از سیلیبینین را در سلول های هیپاتوسلولار کارسینوما (سرطان کبد) انسانی HEPG2 و HepB3 را بررسی کردند. سطوح آپوپتوز در سلول های HEPG2 و Hep3B در ارتباط با سطوح اتوفاژی و همچنین پروتئین های مرتبط با گلیکولیز از جمله انتقال دهنده گلوکز (1/4 Glut(4/1) و هگزوکیناز 2(HK II) مورد بررسی قرار گرفت. از روش هایی چون آزمایش MTT برای سنجش مهار رشد، رنگ آمیزی Hoechst 33258 برای مشاهده آسیب هسته ای، آزمایش تولید لاکتات و وسترن بلات برای بررسی سطوح پروتئین های مرتبط با آپوپتوز و اتوفاژی استفاده شد. نتایج: آپوپتوز ناشی از سیلیبینین برای مرگ سلولی HCC ناقص بود، به طوری که اتوفاژی افزایش یافته و/یا سطح گلیکولیز کاهش یافته، که توسط تیمار سیلیبینین القا می شوند، آپوپتوز ناشی از سیلیبینین را خنثی می کنند. مهار اتوفاژی با 3-متیل آدنن (MA3) یا مسدود کردن فعال سازی پروتئین کیناز فعال شده با AMP AMPK با ترکیب Compound ((C یا CC آپوپتوز ناشی از سیلیبینین را افزایش داد. نتایج تأیید می کند که AMPK دخیل در اتوفاژی و همچنین در گلیکولیز باقی مانده با سیلیبینین، مسئول تضعیف آپوپتوز ناشی از سیلیبینین است(27).

□ لای و کاپتا (2016) اثر بخشی حساس سازی به تابش توسط سیلیمارین در سلول های سرطان روده بزرگ را بررسی کردند. این مطالعه بر روی رده های سلولی سرطان روده بزرگ HCT-15 و RKO انجام شد. که درمان ترکیبی، سلول ها ۳۰ دقیقه قبل از قرارگیری در معرض تابش گاما (2Gy) یا (2.5Gy) با سیلیمارین تیمار شدند. یافته ها نشان داد که سیلیمارین سلول های سرطان روده بزرگ را نسبت به تابش حساس می کند درمان ترکیبی باعث کاهش قابل توجهی در بقای سلول ها، مهار تکثیر و افزایش مرگ سلولی شد(28).

و – جنبه جدید بودن و نوآوری در تحقیق:

جنبه جدید بودن و نوآوری تحقیق به شرح ذیل می باشد:

1- تمرکز بر جنبه پرتویی:

اکثر مطالعات روی مدل های سلولی 2D یا مسیرهای مولکولی تمرکز داشته اند، اما این پژوهش اثرات تابش و پاسخ های پرتویی واقعی سلول ها را در مدل 3D بررسی می کند(29،20).

2- بررسی اثر هم افزایی عصاره هیدروآتانولی سیلیمارین:

اولین مطالعه ای است که سیلیمارین به عنوان رادیوسنسی تایزر طبیعی روی سلول های HepG2 در محیط سمی و در دوزهای 1 تا 6 گری بررسی می شود.

3- ارزیابی کاهش دوز تابش

4- مدل سه بعدی 3D spheroid:

امکان تعیین اینکه چه میزان سیلیمارین می تواند دوز تابش لازم برای اثر کشنده مشابه را کاهش دهد، که اهمیت بالینی و پیش بالینی دارد.

5- استفاده از شبیه سازی و بررسی تاثیر هایپوکسی مرکزی بر پاسخ پرتو دهی

استفاده از مدل D3 واکنش سلولی واقعی تر به تابش و توزیع بهتر اکسیژن و دارو را شبیه سازی می کند، که مزیت نسبت به مدل D2 دارد(30).

ز- اهداف مشخص تحقیق (شامل اهداف آرمانی، کلی، اهداف ویژه و کاربردی):

اهداف اصلی :

- 1- بررسی میرایی سلول های سرطانی کبدی HepG2 در شرایط کشت سه بعدی پس از تابش دوزهای مختلف ایکس مگاولتاژ در مقایسه با سلول های کنترل
- 2- بررسی میرایی سلول های سرطانی کبد پس از اضافه کردن عصاره سیلیمارین و تابش ایکس مگاولتاژ

اهداف فرعی :

- 1- تعیین IC50 سیلیمارین
- 2- یافتن بهترین دوز تابشی

ح - در صورت داشتن هدف کاربردی، نام بهره‌وران (سازمانها، صنایع و یا گروه ذینفعان) ذکر شود (به عبارت دیگر محل اجرای مطالعه موردی):

بیمارستان ها، مطب ها، رادیولوژی ها، مراکز بهداشتی درمانی و مراکز تحقیقات پرتوی. همچنین دانشجویان، اساتید رشته پرتو پزشکی و علاقمندان به طرح پژوهشی از نتایج این پژوهش بهره مند خواهند شد. این پروژه می‌تواند پایه‌گذار چند مسیر پژوهشی جدید در حوزه پرتوپزشکی کشور باشد.

ط- سوالات تحقیق:

- ❖ آیا تابش X در دوزهای 2، 4 و 6 گری باعث کاهش زنده‌مانی سلول های HepG2 به صورت وابسته به دوز می‌شود؟
- ❖ آیا سیلیمارین به تنهایی اثر محدود بر زنده‌مانی سلول‌ها دارد ولی در ترکیب با تابش باعث افزایش آپوپتوز و آسیب DNA می‌شود؟
- ❖ آیا ترکیب سیلیمارین و تابش منجر به افزایش تولید ROS و آسیب DNA نسبت به تابش تنها می‌شود؟
- ❖ چه میزان اثر تشدیدکنندگی سیلیمارین و تابش باعث کاهش دوز تابش مورد نیاز برای رسیدن به اثر کشنده مشابه می‌شود؟

ی- فرضیه‌های تحقیق:

- ❖ تابش X در دوزهای 2، 4 و 6 گری باعث کاهش زنده‌مانی سلول های HepG2 به صورت وابسته به دوز می‌شود.
- ❖ سیلیمارین به تنهایی اثر محدود بر زنده‌مانی سلول‌ها دارد ولی در ترکیب با تابش باعث افزایش آپوپتوز و آسیب DNA می‌شود.
- ❖ ترکیب سیلیمارین و تابش منجر به افزایش تولید ROS و آسیب DNA نسبت به تابش تنها می‌شود.
- ❖ اثر هم‌افزایی سیلیمارین و تابش باعث کاهش دوز تابش مورد نیاز برای رسیدن به اثر کشنده مشابه می‌شود.
- ❖ استفاده از مدل 3D پاسخ‌های پرتویی واقعی‌تر و قابل تعمیم به شرایط بالینی را ارائه می‌دهد.

ک- تعریف واژه‌ها و اصطلاحات فنی و تخصصی (به صورت مفهومی و عملیاتی):

- **دوز جذبی (Absorbed dose):** کمیتی در فیزیک پزشکی است. بر طبق تعریف، انرژی جذب شده از پرتو را بر واحد جرم ماده جذب کننده دز جذبی گویند.
- **پرتو ایکس مگاولتاژ:** پرتو ایکس مگا ولتاژ، اشعه ایکس با انرژی بسیار بالا است که برای نفوذ عمیق در بافت و درمان تومورها در پرتودرمانی استفاده می‌شود.
- **سیلیمارین:** سیلیمارین، ترکیبی طبیعی از گیاه خار مریم، می‌تواند حساسیت سلول‌ها به تابش را افزایش دهد و باعث افزایش ROS و آپوپتوز در سلول های سرطانی می‌شود و مسیرهای بقا را مهار می‌کند.
- **پرتو درمانی:** استفاده از پرتوهای یونساز برای از بین بردن یا کوچک کردن بافت‌های سرطانی است. در این روش در اثر آسیب DNA، سلول های ناحیه درمان (بافت هدف) تخریب و ادامه رشد و تقسیم غیرممکن می‌شود. هدف از پرتو درمانی از بین بردن حداکثر سلول های سرطانی با حداقل آسیب به بافت‌های سالم است.
- **حساس کننده‌های پرتویی:** مواد شیمیایی هستند که پاسخ سلول به تشعشع را تغییر می‌دهند. حساس‌کننده‌های پرتویی (Radiosensitizers) داروهایی هستند که سلول های سرطانی را نسبت به تشعشع حساس تر می‌کنند.

3-روش شناسی تحقیق (روش پیشنهادی):

الف- شرح کامل روش تحقیق بر حسب هدف، نوع داده ها و نحوه اجراء (شامل مواد، تجهیزات و استانداردهای مورد استفاده در قالب مراحل اجرایی تحقیق به تفکیک):

تذکر: درخصوص تفکیک مراحل اجرایی تحقیق و توضیح آن، از به کار بردن عناوین کلی نظیر، «گردآوری اطلاعات اولیه»، «تهیه نمونه‌های آزمون»، «انجام آزمایشها» و غیره خودداری شده و لازم است در هر مورد توضیحات کامل در رابطه با منابع و مراکز تهیه داده‌ها و ملزومات، نوع فعالیت، مواد، روشها، استانداردها، تجهیزات و مشخصات هر يك ارائه گردد.

روش کلی:

هدف از این پژوهش، بررسی اثر تشدید کنندگی آنتی اکسیدان سیلیمارین و تابش پرتو ایکس مگاولتاژ بر رده سلولی HepG2 کبدی در محیط کشت سه بعدی خواهد بود. این مطالعه آزمایشگاهی (in vitro) تجربی روی سلول های HepG2 در مدل 3D spheroid انجام خواهد شد تا اثر تابش X و سیلیمارین بررسی شود. تمرکز اصلی روی پاسخ‌های پرتویی سلول‌ها شامل زنده‌مانی، ROS آپوپتوز و آسیب DNA خواهد بود. روش به شرح ذیل خواهد بود:

- 1) کشت سه بعدی سلول های تومورال کبدی (HepG2) از نوع اسفروئید
- 2) تهیه و خرید آنتی اکسیدان سیلیمارین بصورت تجاری با بالاترین درجه خلوص بصورت پودر یا هیدروآتانولی
- 3) ایجاد 5 گروه مستقل شامل گروه اول: کنترل منفی (بدون سیلیمارین و بدون تابش پرتو)، گروه دوم: کنترل مثبت (استفاده از سیس پلاتین عامل شناخته شده پرتویی جهت مقایسه اثر حساس کنندگی پرتویی

سیلیمارین) ،گروه تیمار با سیلیمارین، گروه سوم: تابش به تنهایی با پرتو، گروه چهارم : ترکیب تابش و سیلیمارین که در حالت ترکیبی نیز از دو زیر گروه تیمار با سیلیمارین در زمان مشخص + تابش و نیز زیرگروه ترکیب بلافاصله سیلیمارین + تابش استفاده خواهد شد. جهت مقایسه و صحت آزمایش در سه گروه آخر بصورت 3 بار تکرار آزمایش نتایج بررسی می شود.

4) قرار دادن سلول سرطانی در معرض غلظتهای متفاوت سیلیمارین در زمان های مختلف و بررسی میزان زنده ماندن سلول های سرطانی در مقایسه با کنترل منفی جهت بررسی سمیت ذاتی و بدست آوردن میزان غلظت IC50 (بعنوان مرجع برای انتخاب غلظتهای پایین تر) و سپس بدست آوردن غلظت مناسب و غیر سمی سیلیمارین پایین تر از IC50 جهت ایجاد خاصیت حساس کنندگی سلول های سرطانی که این غلظت در حقیقت به تنهایی سمیت قابل توجهی برای سلول های سرطانی ندارد. در ضمن جهت بررسی بیشتر، یک یا دو غلظت بدست آمده را با سلول های سالم تیمار نموده تا اثرات این ماده را با سلولهای سالم هم مقایسه نماییم.

5) شبیه سازی: در این پروژه چشمه ایکس مگاولتاژ از دستگاه شتاب دهنده خطی (LINAC) برای ایجاد باریکه مناسب ایکس مگاولتاژ در انجام آزمایشات و با استفاده از کد MCNP انجام می شود. در این شبیه سازی، هندسه چشمه ایکس مگاولتاژ و هدف که همان سلول های سرطانی است و ماده شیمیایی سیلیمارین، با دقت مدل سازی خواهد شد. نتایج حاصل از این شبیه سازی می تواند به عنوان نوعی ارزیابی بر صحت دوز دریافتی سلول های تومورال کبدی (HepG2) در فواصل مشخص از چشمه، مورد توجه قرار گیرد. چشمه ایکس مگاولتاژ مذکور دارای فعالیت پرتوی 2 تا 6 گری دوز می باشد. ایکس مگا ولتاژهای حاصل از این چشمه دارای طیف انرژی بین 6 تا 8 مگا ولت می باشند. لذا اهداف نهایی و اختصاصی شبیه سازی شامل :

- مدل سازی چشمه پرتو و هندسه پرتو دهی در شرایط آزمایشگاهی
- محاسبه دوز جذب شده واقعی در لایه سلولی HepG2
- بررسی توزیع دوز در محیط کشت سلولی
- ارزیابی اثر حضور سیلیمارین بر دوز جذب شده
- همبستگی بین دوز فیزیکی شبیه سازی شده و پاسخ زیستی سلولها

بنابراین شبیه سازی امکان تفکیک سهم فیزیکی دوز از اثرات زیستی سیلیمارین را فراهم می کند. لذا در صورتی که در شبیه سازی نشان داده شد که نمونه ها کمتر از میزان دوز فیزیکی و تنظیم شده تابش دریافت نموده اند در محاسبات دوز شبیه سازی شده ملاک محاسبه قرار خواهد گرفت.

6) قرار دادن سلول در معرض تابش ایکس مگا ولتاژ به وسیله دستگاه شتاب دهنده خطی، طی دوزهای مختلف ایکس مگا ولتاژ و بررسی میزان زنده ماندن سلول های سرطانی و یافتن IC50 به منظور تعیین منحنی دوز-پاسخ پرتو دهی و دانستن نقطه مرجع برای مقایسه اینکه وقتی از سیلیمارین استفاده می نماییم برای رسیدن به نقطه 50 درصد بقا چه میزان دوز پرتو کاهش یافته و در صورت امکان محاسبه شاخص حساس کنندگی مثل SER (Sensitizer Enhancement Ratio) و MDF (Dose Modifying Factor). در ضمن به سلولها در دوزهای مختلف پرتو شامل دوزهای زیر، نزدیک و بالاتر از IC50 پرتو دهی انجام خواهد شد تا امکان ارزیابی دقیق اثر حساس کنندگی سیلیمارین فراهم شود و منحنی بقای مربوطه را رسم نمود لذا از 7 زیر گروه و دوزهای 0-1-2-3-4-5-6 گری استفاده می شود که دوز صفر یا بدون تابش در حقیقت زیرگروه کنترل منفی جهت تعیین IC50 و رسم منحنی دوز- پاسخ می باشد. دوزهای پرتوی تابش شده از اتاقک یونش دستگاه شتاب دهنده قرائت و در نظر

گرفته می شود و با نتایج شبیه سازی که از قبل انجام شده مورد بررسی قرار خواهد گرفت. دوز اسمی روی شتاب دهنده خطی در شرایط مرجع اندازه گیری می شود.

(7) قرار دادن سلول در گروه ترکیبی در معرض تابش ایکس مگا ولتاژ (دوز های مختلف ایکس مگا ولتاژ) و سیلیمارین به عنوان ماده حساس کننده پرتویی (در یک یا دو غلظت موثر بدست آمده از بند 3 روش کار) که بیشترین اثر حساس کنندگی را دارند و بررسی میزان زنده مانی سلول های سرطانی در دو حالت جهت بررسی اثبات اثر سیلیمارین و مقایسه با گروه کنترل منفی و گروه کنترل مثبت جهت مقایسه کیفی اثر و مرجع عملکرد سیستم و نرمال سازی داده ها انجام خواهد شد. در ضمن در این قسمت از دو حالت تیمار با سیلیمارین در بازه زمانی مشخص (سلول فرصت دارد مسیرهای زیستی حساس کنندگی را فعال یا مهار نماید و قاعدتا پاسخ قوی تر دیده خواهد شد) در ترکیب با تابش پرتو و حالت استفاده در لحظه سیلیمارین (جهت بررسی اثر لحظه ای یا مستقیم دارو روی پاسخ پرتویی و تفکیک مکانیزم های حساس کنندگی) در ترکیب با تابش پرتو ولی برخلاف حالت قبلی بدون مقایسه با کنترل مثبت استفاده خواهیم کرد.

(8) بررسی میزان زنده مانی سلول و مکانیسم اثر:

(1) مطالعه میکروسکوپی جهت بررسی میزان اثر دوز بیولوژیکی پرتوهای ایکس مگا ولتاژ و سیلیمارین بر مورفولوژی سلول های سرطانی و نرمال

(2) بررسی میرایی سلولی و مکانیسم اثر القای آپوپتوز و نکروز و اثرات آنتی اکسیدانی توسط پرتوهای ایکس مگا ولتاژ و سیلیمارین در سلول های سرطانی با استفاده از آزمایشات زیر:

الف- مطالعات مرگ و میر سلولی با استفاده از روش های MTT assay و Neutral red assay
ب- مطالعه اثر آپوپتوزیس، نکروزیس و همچنین اثرات آنتی اکسیدانی با بهره مندی از روش های

1- Caspase-3 Assay

2- Comet assay و DNA fragmentation estimation

3- Reactive nitrogen species (RNS) assay

4- Catalase activity

5- Reduced glutathione (GSH)

(9) در پایان با توجه به نتایج اطلاعات تجربی و آزمایشگاهی بدست آمده اقدام به تجزیه و تحلیل اطلاعات و آمار بدست آمده و تحلیل اثرات بیولوژیکی پرتو انجام خواهد شد.

در این پروپوزال چون که سیلیمارین به عنوان یک رادیو سنسیتایزر مورد بررسی قرار می گیرد به دلایل ذیل استفاده از کنترل مثبت ضروری می باشد:

1- اعتبار سنجی سیستم آزمایشگاهی: اطمینان از این که سیستم آزمایشگاهی شامل مدل سلولی و روش تابش دهی و روش های سنجش به درستی کار می کند.

2- ارائه معیار مقایسه ای: قدرت اثر سیلیمارین را در مقایسه با یک رادیو سنسیتایزر شناخته شده می سنجد.

3- تفکیک اثر اختصاصی از غیر اختصاصی: ایجاد تمایز بین اثر رادیو سنسیتایزری واقعی و سمیت سلولی عمومی

در ادامه خلاصه ای از جدول تقسیم بندی گروه ها ترسیم خواهد شد.

گروه	توضیح	دوز / غلظت	زیر گروه ها	تعداد تکرار	مقایسه / هدف
کنترل منفی	سلول ها بدون دارو و بدون پرتو	-----	-----	۳ تکرار مستقل	مرجع: ۱۰۰٪ بقا و نورمال سازی داده ها
سیلیمارین تنها	بررسی سمیت فانی سیلیمارین	غلظتهای غیر سمی و حساس کننده و زیر IC50	-----	۳ تکرار مستقل	بررسی سمیت فانی نسبت به کنترل منفی
پرتو تنها	بررسی پاسخ سلول ها به پرتو	۱۰، ۱، ۲، ۴، ۵، ۶ گری	-----	۳ تکرار مستقل	تعیین IC50 پرتو و رسم منحنی دوز-پاسخ نسبت به کنترل منفی
ترکیبی سیلیمارین + پرتو	بررسی حساس کنندگی پرتویی	سیلیمارین: همان غلظت های منتخب، پرتو: همان دوز ها	۱- ترکیب تیمار قبل از پرتو دهی ۲- بلافاصله استفاده سیلیمارین و یا پرتو	۳ تکرار مستقل برای هر زیر گروه	مقایسه با پرتو تنها: بررسی حساس کنندگی و اثر زمان بندی
کنترل مثبت (Cisplatin + پرتو)	اعتبار سنجی مدل حساس کنندگی پرتویی	تیمار ۲۴ ساعته با Cisplatin که زیر IC50 است + همان دوز های پرتویی	-----	۳ تکرار مستقل	مقایسه با پرتو تنها: اثبات قابلیت سیستم در نشان دادن حساس کنندگی

جدول نهایی گروه ها، مقایسه ها و تکرار ها

نکات کلیدی طراحی

۱. هر گروه مستقل = حداقل ۳ تکرار آزمایش جهت تضمین تحلیل آماری قابل اعتماد
۲. کنترل منفی برای دو گروه تنها به عنوان مرجع داده ها استفاده می شود.
۳. کنترل مثبت فقط برای ترکیبی استفاده می شود، هدفش اعتبار سنجی مدل است.
۴. سیلیمارین تنها فقط برای بررسی سمیت فانی و انتخاب غلظت غیر سمی
۵. گروه ترکیبی شامل دو زیر گروه Pre-treatment و Co-treatment جهت بررسی اثر زمان بندی و مکانیزم حساس کنندگی

ب- متغیرهای مورد بررسی در قالب یک مدل مفهومی و شرح چگونگی بررسی و اندازه گیری متغیرها:

- میزان دوز پرتو X که سبب میرایی در سلول های سرطان کبد شود.
- میزان غلظت سلیمارین که سبب میرایی در سلول های سرطان کبد شود.
- میزان دوز پرتو x و میزان غلظت سلیمارین که سبب حداکثر میرایی در سلول های سرطان و حداقل مهار رشد در سلول های نرمال می گردد.
- میزان زمان قرار گیری سلول در معرض پرتو x و سلیمارین

ج - شرح کامل روش (میدانی، کتابخانه‌ای) و ابزار (مشاهده و آزمون، پرسشنامه، مصاحبه، فیشبرداری و غیره) گردآوری داده‌ها:

در بخش های اول رساله (مرور مطالب) و همچنین بخش دوم (مواد و روش ها) اطلاعات مرتبط و روش انجام آزمایشات از مطالعه اسناد مکتوب منتشر شده شامل مقالات معتبر، کتب و پایان نامه/ رساله ها جمع آوری شده و مورد بهره برداری قرار می گیرد. اطلاعات این پژوهش پس از آماده سازی سلول ها و در 5 گروه مجزا شامل گروه کنترل منفی بدون تابش و تیمار با سلیمارین، گروه کنترل مثبت شامل تیمار با سیسپلاتین cisplatin، گروه تیمار در حضور آنتی اکسیدان سلیمارین، گروه تابش با پرتو و گروه تابش در حضور پرتو و آنتی اکسیدان بدست آمده و سپس توسط نرم افزارهای آماری مورد تجزیه و تحلیل قرار می گیرد در پایان میزان دوز مورد نیاز جهت القا میرایی سلول های مورد نظر بدست خواهد آمد.

د - جامعه آماری، روش نمونه‌گیری و حجم نمونه (در صورت وجود و امکان):

سلو های سرطانی کبد کشت داده شده

ه- روش ها و ابزار تجزیه و تحلیل داده‌ها:

تجزیه و تحلیل آماری با SPSS و روش آنالیز واریانس انجام می گیرد.

و- نحوه اعتبارسنجی:

در این پژوهش دوز بیولوژیکی اشعه x بر سلول های سرطانی کبد همراه با حساس کننده پرتویی سلیمارین با تکنیک های آزمایشگاهی بررسی می شود. بر اساس نتایج سه بار تکرار آزمایشات مستقل و پس از بررسی آماری، اعتبار سنجی انجام خواهد شد. آزمایشات حداقل به صورت سه بار تکرار انجام و نتایج حاصل از هر آزمایش با آزمایشات دیگر و همچنین در مقایسه با یکدیگر با آنالیز آنوا یک طرفه برای مقایسه گروهها بررسی و نتایج از نظر آماری تجزیه و تحلیل خواهد شد.

محدویت های تحقیق

- 1- تفاوت پاسخ سلولی محیط کشت spheroid در مواجهه با پرتو
- 2- عدم دارا بودن ویژگی های کامل مدل in vitro به نسبت مدل in vivo تومورال کبدی

ز- منابع و مراجع مورد استفاده:

1. Mahmoudi, Professor Dr. Aqeel, 1402, Descriptive study of liver cirrhosis in patients referred to Abu Ali Sina Balkhiti Educational Seminary Hospital in 1401, <https://civilica.com/doc/2244530>
2. Hall EJ, Giaccia AJ. Radiobiology for the Radiologist. 8th ed. Wolters Kluwer; 2021.
3. Amann T, Bataille F, Spruss T, Mühlbauer M, Gäbele E, Schölmerich J, et al. Activated hepatic stellate cells promote tumorigenicity of hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2009; (4)10: 646--653.
4. Yu SJ. A concise review of updated guidelines regarding the management of hepatocellular carcinoma around the world: 2010-2016. *Clin Mol Hepatol* 2016; 22(1): 7-17.
5. Liu Y, Chen S, Xu X, et al. Radiosensitivity of HepG2 cells and mechanisms. *J Radiat Res.* 2017;58:123–133.
6. Li Q, Chen X, et al. Radiobiological characteristics of HepG2 cells. *Radiat Res.* 2015;184:34–44.
7. Zhao L, et al. Dose-dependent radiosensitization of HepG2 cells by plant polyphenols. *Phytomedicine.* 2019;55:197–205.
8. Marzban, M., et al., Effects of gamma rays on rat testis tissue according to the morphological parameters and immunohistochemistry: radioprotective role of silymarin. 2017. 9(6): p. 4524.
9. Saller, R., et al., An updated systematic review of the pharmacology of silymarin. 2007. 14(2): p.70-80.
10. Polyak SJ, Morishima C, Lohmann V, et al. Mechanisms of action of silymarin in liver disease. *Clin Liver Dis.* 2019;23(2):279–292.
11. González, C.A., N. Sala, and T.J.H. Rokkas, Gastric cancer: epidemiologic aspects. 2013. 18: p. 34-38.
12. Adhikari, M., et al., In vitro studies on radioprotective efficacy of silymarin against γ -irradiation. 2013. 89(3): p. 200-211
13. Lal, M. and D.J.D. Gupta, Studies on radiation sensitization efficacy by silymarin in colon carcinoma cells. 2016. 4 (1.)
14. Deep, G. and R.J.I.c.t. Agarwal, Chemopreventive efficacy of silymarin in skin and prostate cancer. 2007. 6(2): p. 130-145.
15. Hamidi Begejan, Jila and Asadi, Asadollah and Abdolmaleki, Arash and Zolfaqarpour, Farhad, , Investigation of the role of ciliary marin in inhibiting cancer cells, Third International Conference on Medicinal Plants, Traditional Medicine and Organic Agriculture, 2024 Hamedan, <https://civilica.com/doc/2064118>
16. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018;68:394–424.
17. Park S, Kim J, et al. ROS-mediated apoptosis in 3D hepatoma spheroids after X-ray exposure. *Free Radic Biol Med.* 2019;135:113–124.
18. Turkoglu, D. Characterization of a new external neutron beam facility at the Ohio State University. *Journal Radioanal Nucl Chem.* 2012. , 291, 321–327,
19. Knoll, G. F. Radiation detection and measurement, 3rd Edition. John Wiley & Sons, 2010.
20. Vinci M, Gowan S, et al. Advances in 3D tumor spheroid models for cancer research. *BMC Biol.* 2012;10:29.
21. Hamidi Begejan, Jila and Asadi, Asadollah and Abdolmaleki, Arash and Zolfaqarpour, Farhad, , Investigation of the role of ciliary marin in inhibiting cancer cells, Third International Conference on Medicinal Plants, Traditional Medicine and Organic Agriculture, 2024 Hamedan, <https://civilica.com/doc/2064118>
22. Rahimi, D., et al., Antiproliferative and Antitelomerase Effects of Silymarin on Human Colorectal and Hepatocellular Carcinoma Cells. 2024. 90(04): p. 298-304.

23. ملک زاده، پرویز و رحمانی، حانیه و شیخ اکبری مهرا، رضا، 1403، سیلیمارین گزینه های نوین در مدیریت بیماری های کبدی و سرطان، دومین کنفرانس ملی زیست شناسی گیاهان دارویی، قم
2354307/https://civilica.com/doc،
24. نجفی امیر، بهنام بهزاد، کرمی مهاجری سمیه. تاثیر آنتی اکسیدانی و پرواکسیدانی آمینوگوانیدین بر رده سلولی سرطان کبد انسان (2-HepG). مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران (نامه دانشگاه) 1398: 29 (172): 134-127.
25. Yin Wang a, , Ai-Jun Yuan b, , Yue-Jin Wu b, Li-Mei Wu c, Ling Zhang. Silymarin in cancer therapy: Mechanisms of action, protective roles in chemotherapy-induced toxicity, and nanoformulations. Journal of Functional Foods <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105384>.
26. Erdi Bilgic, Nina Tuncel & Timur Koca (2023) Radio-sensitivity on HEPG2 cells of silver nanoparticles synthesized by Silybum marianum, Inorganic and Nano-Metal Chemistry, 53:2, 122-130, DOI: 10.1080/24701556.2021.1987460
27. J Yang, Y Sun, F Xu , W Liu , T Hayashi , K Mizuno S Hattori , H Fujisaki and T Ikejima. Autophagy and glycolysis independently attenuate silibinin-induced apoptosis in human hepatocarcinoma HepG2 and Hep3B cells. Human and Experimental Toxicology journals.sagepub.com/home/het(2021) , Vol. 40(12) 2048 –2062 DOI: 10.1177/09603271211017609
28. Lal M, Gupta D. Studies on radiation sensitization efficacy by silymarin in colon carcinoma cells. Discoveries 2016, January-March; 4(1): e56. DOI: 10.15190/d.2016.3
29. Li Y, Wang S, et al. Comparative study of 2D vs. 3D hepatoma cell models under radiation. Oncotarget. 2017;8:75489–75501.
30. Dierickx L, Van den Berge DL, et al. Optimization of radiation protocols in 3D hepatoma models. Int J Radiat Biol. 2018;94:1050–1059
31. Singh RP, et al. Silibinin preferentially radiosensitizes prostate cancer by inhibiting DNA repair signaling. Clin Cancer Res. 2015; (PMID: 26516160).