بسم الله الرحمن الرحیم

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

خانم معصومه توکلی یرکی رشته **بیوشیمی بالینی** رساله **دکتری** خود را با عنوان « **بررسی نقش ۱۵ – لیپواکسیژناز در القا تکثیر سلولی یا آپوپتوز از طریق 13-S-HODE در دو رده سلولی سرطان سینه MDA-MB468 ، MCF-7** » در تاریخ **۱۳۹۱/۷/۲۶** ارائه کردند.

بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	امضاء
استاد راهنما	دکتر فاطمه صغری کرمی تهرانی	
استاد مشاور	دکترمجید سیرتی ثابت	
استاد ناظر	دکترمحمد تقی خانی	
استاد ناظر	دکترزهیر صراف	
استاد ناظر	دکترمحمد فیروز رای	
استاد ناظر	دکتر سعید بوذری	
نماینده تحصیلات تکمیلی	دکترسید علیرضا مصباح نمین	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه-های مصوب انجام شود.

ماده ٤- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ٥- این آیین‌نامه در ٥ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/٤/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/٤/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب معصومه توکلی یرکی دانشجوی رشته بیوشیمی بالینی ورودی سال تحصیلی ۱۳۸۷ مقطع دانشکده **دکتری** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

امضا

تاریخ

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل رساله دکتری نگارنده در رشته بیوشیمی بالینی است که در سال ۱۳۹۱ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی دکتر فاطمه کرمی تهرانی ، مشاوره دکتر مجید سیرتی ثابت از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ٤ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ٤ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ٦ : اینجانب معصومه توکلی یرکی دانشجوی رشته بیوشیمی بالینی مقطع دکتری تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی
تاریخ و امضا معصومه توکلی یرکی

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته بیوشیمی بالینی

عنوان

بررسی نقش۱۵-لیپواکسیژناز در القا تکثیر سلولی یا آپوپتوز از طریق 13-S-HODE در دو رده سلولی سرطان سینه MCF-7, MDA-MB468

نگارش

معصومه توکلی یرکی

استاد راهنما

دکتر فاطمه کرمی تهرانی

استاد مشاور

دکتر مجید سیرتی ثابت

پائیز ۱۳۹۱

تقدیم به:

پدر و مادر مهربان

و

همسر عزیزم

تشکر و قدردانی:

از استاد ارجمندم سرکار خانم دکتر کرمی تهرانی که افتخار شاگردی ایشان را در این مقطع داشته ام، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از استاد ارجمند جناب آقای دکتر مجید سیرتی ثابت که زحمت مشاوره این پژوهش را تقبل فرمودند ، کمال تشکر را دارم.

از اساتید ارجمند هیأت داوران رساله آقای دکتر محسن فیروزرای، آقای دکتر سعید بوذری، آقای دکتر زهیر صراف و آقای دکتر محمد تقی خانی که زحمت مطالعه و داوری رساله را تقبل فرمودند سپاسگزارم.

از مدیریت محترم گروه بیوشیمی بالینی استاد ارجمند جناب آقای دکتر علیرضا مصباح نمین و

کلیه اساتید محترم گروه بیوشیمی بالینی کمال تشکر را دارم .

از کارشناسان محترم آزمایشگاه های گروه بیوشیمی بالینی، سرکار خانم ها افشار نادری، اعتمادی کیا سپاسگزار بوده و از کلیه کارکنان محترم دانشگاه تربیت مدرس بویژه دانشکده علوم پزشکی و بخش پژوهشی جناب آقای موسویان و سرکار خانم دباغ کمال تشکر را دارم.

از حمایت های ارزشمند علمی و کمک های شایان آقای دکتر وحید سلیمی و اساتید ارجمند گروه ژنتیک دانشگاه یوترخت کشور هلند سپاسگذارم.

از تمامی دوستان و همکاران آزمایشگاهی خصوصا خانم دکتر فرانک فلاحیان، آقای دکتر محمود آقایی و آقای دکتر رامین سراوانی کمال تشکر را دارم.

چکیده:

آنزیم ۱۵-لیپواکسیژناز نوع ۱ (15-LOX-1) جزء آنزیم های کلیدی برای متابولیسم اسیدهای چرب غیر اشباع بوده که اخیرا فعال سازی آن به عنوان هدف مولکولی جدیدی برای القاء آپوپتوز در سلول های سرطانی مطرح شده است. از آنجا که سرطان سینه جزء شایع ترین سرطان ها و علل مرگ و میر در بین زنان می باشد و درباره نقش مسیر آنزیمی 15-LOX-1 در تنظیم رشد این نوع سرطان تا کنون مطالعه ای انجام نشده است، لذا تحقیق حاضر به منظور بررسی نقش مسیر آنزیمی 15-LOX-1 در مهار رشد و القاء آپوپتوز در سلول های سرطانی سینه، MCF-7و MDA-MB-231 طراحی گردیده است. تیمار سلول ها با فعال کننده آنزیم 15-LOX-1 منجر به مهار رشد سلولی، القاء آپوپتوز و توقف سیکل سلولی گردید. نقش آنزیم 15-LOX-1 در فرایند های فوق با اندازه گیری میزان هیدروکسی اکتادکادی انوئیک اسید (13(S)HODE) درون سلولی به عنوان محصول اصلی آنزیم فوق و نیز استفاده از مهارکننده های اختصاصی آنزیم و میزان بیان آنزیم تائید گردید. در این تحقیق به منظور بررسی آپوپتوز از تکنیک فلوسایتومتری به روش رنگ آمیزی با Annexin V-FITC/PI و آنالیز سیکل سلولی استفاده گردید. هم چنین به منظور تعیین مسیر احتمالی پایین دست آنزیم 15-LOX-1، نقش 13(S)HODE در مهار رشد و القاء آپوپتوز در رده های سلولی سرطانی سینه مطالعه گردید. در آپوپتوز القاء شده توسط آنزیم 15-LOX-1 ، نقش 15(S)HETE به عنوان محصول 15-LOX-2 نیز در مهار رشد سلولی مطالعه گردید. نتایج بدست آمده نشان دادند که تیمار سلول ها با 13(S)HODE موجب مهار رشد سلولی، القاء آپوپتوز و توقف سیکل سلولی می گردد و می تواند واسطه اثرات آنزیم 15-LOX-1 در این سلول ها باشد. تحقیق حاضر اولین گزارشی است که در مورد نقش فعال شدن آنزیم 15-LOX-1 در تنظیم رشد و القاء آپوپتوز در سلول های سرطانی سینه MCF-7و MDA-MB-231 ارائه گردیده است و نتایج مطالعه ما بر اهمیت مسیر 13(S)HODE /15-LOX-1 به عنوان مسیر مولکولی جدید برای تنظیم رشد و القاء مرگ سلولی در سرطان سینه تاکید می کند.

واژه های کلیدی: ۱۵-لیپواکسیژناز نوع ۱ ، 13(S)HODE ، آپوپتوز، MCF-7و MDA-MB-231

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱

۱- ۱-لیپواکسیژناز ها ۲

۱-۱-۱- متابولیسم آراشیدونیک اسید ۲

۱-۱-۲- متابولیسم لینولئیک اسید ۳

۱-۲- انواع لیپواکسیژنازها ۵

۱-۲-۱- لیپواکسیژناز نوع ۵ ..... ۵

۱-۲-۲- لیپواکسیژناز نوع۸ ..... ۶

۱-۲-۳- لیپواکسیژناز نوع ۱۲ ..... ۷

۱-۲- ۴-لیپواکسیژناز نوع ۱۵ ..... ۷

۱-۳- تاریخچه کشف آنزیم ۱۵-لیپواکسیژناز ۸

۱-۳-۱- خصوصیات آنزیمی ۱۵-لیپواکسیژناز ۱۰

۱-۳-۲- جنبه های ساختاری آنزیم ۱۵-لیپواکسیژناز ۱۱

۱-۳-۳- تعیین اختصاصیت سوبسترا برای لیپواکسیژنازها ۱۲

۱-۴- تنظیم فعالیت لیپواکسیژنازهای سلولی ۱۵

۱-۴-۱- تنظیم ۱۵-لیپواکسیژناز در سطح رونویسی ۱۵

۱-۴-۲- تنظیم ۱۵-لیپواکسیژناز در سطح ترجمه ۱۷

۱-۴-۳- تنظیم ۱۵-لیپواکسیژناز در سطح بعد از ترجمه ۱۷

۱-۵- فعالیت های بیولوژیک آنزیم ۱۵-لیپواکسیژناز ۱۸

۱-۵-۱- نقش ۱۵-لیپواکسیژناز در تمایز و تکامل سلول ۱۹

۱-۵-۲- نقش ۱۵-لیپواکسیژناز در التهاب ۲۰
۱-۵-۳- نقش ۱۵-لیپواکسیژناز در سرطان ۲۲
۱-۶- تنظیم مرگ سلول های سرطانی از طریق لیپواکسیژنازها ۲۶
۱-۷- لیپواکسیژناز به عنوان یک هدف درمانی ۳۰
۱-۸- سرطان پستان و لیپواکسیژناز نوع ۱۵ ..... ۳۰
۱-۹- فرضیه‌ها، اهداف و سیر منطقی تحقیق ۳۲
۱-۹-۱- فرضیه ها ۳۳
۱-۹-۲- اهداف ۳۴
فصل دوم: مواد و روش ها ۳۵
۲-۱- تجهیزات و وسایل مورد نیاز ۳۶
۲-۱-۱-تجهیزات ضروری اتاق کشت سلول ۳۶
۲-۱-۲- تجهیزات مورد نیاز جهت انجام آزمایشات ۳۶
۲-۱-۳-مواد و وسایل مورد نیاز ۳۶
۲-۲- کشت سلولی ۳۷
۲-۲-۱-تهیه محیط کشت و محلول های مورد نیاز ۳۷
۲-۲-۲- رده های سلولی مورد بررسی ۳۷
۲-۲-۲-۱- رده سلولی MCF-7 ..... ۳۷
۲-۲-۲-۲- رده سلولی MDA-MB-231 ..... ۳۸
۲-۲-۳- شریط کشت و نگهداری رده های سلولی ۳۸
۲-۲-۴- پاساژ سلول ها ۳۸
۲-۲-۵- شمارش سلولی ۳۹
۲-۲-۶- انجماد و نگهداری سلول ها ۳۹

۲-۲-۷-استفاده مجدد از سلول های فریز شده ۴۰
۲-۳- تیمار سلول ها ۴۰
۲-۳-۱- مواد و وسایل مورد نیاز ۴۰
۲-۳-۲- تیمار سلول ها با فعال کننده ، مهارکننده و محصولات لیپواکسیژناز ۴۰
۲-۴- بررسی سیتوتوکسیسیتی با استفاده از روش MTT ۴۱
۲-۴-۱- مواد و وسایل مورد نیاز ۴۱
۲-۴-۲- اصول روش بررسی سیتوتوکسیسیتی ۴۱
۲-۴-۳- روش کار ۴۱
۲-۵- بررسی بیان ژن آنزیم ۱۵-لیپواکسیژناز در حضور و عدم حضور فعال کننده ۴۲
۲-۵-۱- استخراج RNA ۴۲
۲-۵-۲- سنتز cDNA ۴۳
۲-۵-۳- انتخاب پرایمر برای آنزیم ۱۵-لیپواکسیژناز نوع ۱ ..... ۴۳
۲-۵-۴- تکنیک RT-PCR ۴۴
۲-۵-۵- الکتروفورز ژل آگارز ۴۵
۲-۵-۵-۱- مواد و بافرهای مورد نیاز ۴۵
۲-۵-۵-۲- روش کار ۴۵
۲-۶- اندازه گیری میزان 13-S-HODE در سلول ها ۴۵
۲-۶-۱- مواد مورد نیاز ۴۵
۲-۶-۲- اساس روش ۴۶
۲-۶-۳- روش کار ۴۶
۲-۷- اندازه گیری میزان 15-S-HETE در سلول ها ۴۷
۲-۷-۱- مواد مورد نیاز ۴۷

۲-۷-۲- اساس روش ۴۷

۲-۷-۳- روش کار ۴۸

۲-۸- بررسی آپوپتوز با فلوسایتومتری ۴۸

۲-۸-۱- اساس روش ۴۹

۲-۸-۲- مواد و دستگاه های مورد نیاز ۴۹

۲-۸-۳- روش کار ۵۰

۲-۹- بررسی سیکل سلولی با استفاده از فلوسایتومتری ۵۱

۲-۹-۱- مواد، وسایل و دستگاه های مورد نیاز ۵۱

۲-۹-۲- اساس روش ۵۱

۲-۹-۳- روش کار ۵۲

فصل سوم: نتایج و یافته ها ۵۳

۳-۱- بررسی اثرات Trichostatin A (TSA)روی رده های سلولی سرطان پستان MCF-7 و MDA-MB-231 ..... ۵۴

۳-۱-۱-بررسی اثرات TSA بروی رشد رده های سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 ..... ۵۴

۳-۱-۲- بررسی نقش ۱۵-لیپواکسیژناز نوع ۱ در تنظیم اثرات ناشی از TSA در دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 ..... ۵۷

۳-۱-۲-۱- نتایج مربوط به تاثیر مهار کننده اختصاصی ۱۵-لیپواکسیژناز نوع ۱ بروی رشد رده های سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 ..... ۵۷

۳-۱-۲-۲- نتایج مربوط به تاثیر مهار کننده اختصاصی ۱۵-لیپواکسیژناز نوع ۱ بر روی سیتوتوکسیسیتی ناشی از TSA در دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 ..... ۵۸

۳-۲- بررسی اثر سیتوتوکسیک TSA بروی سلول های رده MCF-7 و MDA-MB-231 توسط فلوسایتومتری ۵۹

۳-۲-۱- نتایج بررسی اثر سیتوتوکسیک TSA بروی سلول های رده MCF-7 با استفاده از فلوسایتومتری. ۵۹
۳-۲-۲- نتایج بررسی اثر سیتوتوکسیک TSA بروی سلول های رده MDA-MB-231 با استفاده از فلوسایتومتری..... ۶۱
۳-۲-۳- بررسی نقش ۱۵-لیپواکسیژناز نوع ۱ در تنظیم اثرات ناشی از TSA در القاء آپوپتوز در دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 ..... ۶۲
۳-۲-۳-۱- نتایج مربوط به تاثیر مهار کننده اختصاصی ۱۵-لیپواکسیژناز نوع ۱ بر روی القاء آپوپتوز ناشی از TSA در رده سلولی MCF-7..... ۶۳
۳-۲-۳-۲- نتایج مربوط به تاثیر مهار کننده اختصاصی ۱۵-لیپواکسیژناز نوع ۱ بر روی القاء آپوپتوز ناشی از TSA در دو رده سلولی MDA-MB-231 ..... ۶۵
۳-۳- بررسی سیکل سلولی با استفاده از فلوسایتومتری..... ۶۷
۳-۳-۱- نتایج بررسی سیکل سلولی با استفاده از فلوسایتومتری در رده سلولی MCF-7 ۶۷
۳-۳-۲- نتایج بررسی سیکل سلولی با استفاده از فلوسایتومتری در رده سلولی MDA-MB-23 ۶۹
۳-۳-۳- بررسی نقش ۱۵-لیپواکسیژناز نوع ۱ در تنظیم اثرات ناشی از TSA بر روی توزیع سیکل سلولی در دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 ..... ۷۰
۳-۳-۳-۱- نتایج مربوط به تاثیر مهار کننده اختصاصی ۱۵-لیپواکسیژناز نوع ۱ بر روی توزیع سیکل سلولی ناشی از TSA در دو رده سلولی MCF-7 . ..... ۷۱
۳-۳-۳-۲-نتایج مربوط به تاثیر مهار کننده اختصاصی ۱۵-لیپواکسیژناز نوع ۱ بر روی توزیع سیکل سلولی ناشی از TSA در دو رده سلولی MDA-MB-231 ..... ۷۳
۳-۴-بررسی نقش TSA در الگوی بیان ۱۵-لیپواکسیژناز نوع ۱ با استفاده از RT-PCR در رده های سلولی سرطان پستان (MCF-7 و MDA-MB-231)..... ۷۴
۳-۴-۱- نتایج حاصل از RT-PCR در رده سلولی MCF-7 ..... ۷۵
۳-۴ -۲- نتایج حاصل از RT-PCR در رده سلولیMDA-MB-231 ..... ۷۶
۳-۵- اندازه گیری غلظت 13-S-HODEدرون سلولی پس از تیمار با TSA در دو رده سلولی MCF-7.. ۷۷

۳-۵-۱-بررسی اثر هم افزایی (سینرژیک) TSA و 13-S-HODE در کاهش رشد سلول های MCF-7 و MDA-MB-231 ..... ۷۸

۳-۶- بررسی نقش محصولات ۱۵-لیپواکسیژناز نوع ۱ در رشد سلولی رده های سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 ..... ۸۰

۳-۶-۱- تاثیر13(S)HODE بروی رشد رده های سلولی MCF-7 وMDA-MB-231 ..... ۸۰

۳-۶-۱-۱- بررسی اثر سیتوتوکسیک 13(S)HODE بروی سلول های رده MCF-7 و MDA-MB-231 توسط فلوسایتومتری ۸۲

۳-۶-۱-۱-۱- نتایج بررسی اثر سیتوتوکسیک 13(S)HODE بروی سلول های رده MCF-7 با استفاده از فلوسایتومتری ۸۳

۳-۶-۱-۱-۲-نتایج بررسی اثر سیتوتوکسیک 13(S)HODE بروی سلول های رده MDA-MB-231 با استفاده از فلوسایتومتری ۸۴

۳-۶-۱-۲-بررسی نقش 13(S)HODE بر روی سیکل سلولی با استفاده از فلوسایتومتری در دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 ..... ۸۶

۳-۶-۱-۲-۱- نتایج بررسی سیکل سلولی بعد از تیمار با 13(S)HODE با استفاده از فلوسایتومتری در رده سلولی MCF-7 ..... ۸۶

۳-۶-۱-۲-۲- نتایج بررسی سیکل سلولی بعد از تیمار با 13(S)HODE با استفاده از فلوسایتومتری در رده سلولی MDA-MB-231 ..... ۸۸

۳-۶-۲- اندازه گیری غلظت 15-S-HETEدرون سلولی پس از تیمار با TSA در دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 ..... ۸۹

۳-۶-۲-۱ تاثیر 15(S)HETE بروی رشد رده های سلولی MCF-7 وMDA-MB-231 ۹۱

فصل چهارم: بحث، نتیجه گیری و پیشنهادها..... ۹۳

فهرست منابع..... ۱۰۷

چکیده انگلیسی..... ۱۱۸

فهرست جداول

جدول ۱-۱: رابطه توالی ۱۵-لیپواکسیژناز با عملکرد آنها..... ۱۵

جدول ۲-۱: آماده‌سازی نمونه برای PCR..... ۴۴

جدول ۲-۲: **شرایط انجام** PCR ۴۴

فهرست نمودارها

نمودار ۳-۱- تاثیر غلظت های مختلف TSA بر روی رشد سلول های MCF-7 در زمان های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت ۵۵

نمودار ۳-۲- تاثیر غلظت های مختلف TSA بر روی رشد سلول های MDA-MB-231 در زمان های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت..... ۵۶

نمودار۳-۳- تاثیر مهارکننده اختصاصی ۱۵-لیپواکسیژناز نوع ۱ (PD146176) بروی رشد سلول های MCF-7 و MDA-MB-231..... ۵۷

نمودار ۳-۴- درصد سلول های زنده تیمار شده با TSA در حضور و عدم حضورPD146176 در رده سلولی MCF-7 وMDA-MB-231 ..... ۵۸

نمودار۳-۵- درصد سلول های آپوپتوتیک اولیه و دیررس در رده سلولی MCF-7 پس از تیمار با TSA ۶۰

نمودار۳-۶- درصد سلول های آپوپتوتیک اولیه و دیررس در رده سلولی MDA-MB-231 پس از تیمار با TSA..... ۶۱

نمودار ۳-۷- درصد سلول های آپوپتوتیک اولیه و دیررس بعد از تیمار با TSA در حضور و عدم حضور PD146176 در رده سلولی MCF-7..... ۶۳

نمودار ۳-۸- درصد سلول های آپوپتوتیک اولیه و دیررس بعد از تیمار با TSA در حضور و عدم حضور PD146176در رده سلولی -MDA ۶۵

نمودار ۳-۹- تاثیر TSA بروی توزیع سیکل سلولی در سلول های رده MCF-7. ..... ۶۸

نمودار ۳-۱۰- تاثیر TSA بروی توزیع سیکل سلولی در سلول های رده MDA-MB-231..... ۷۰

نمودار ۳-۱۱- نحوه توزیع سیکل سلولی بعد از تیمار با TSA در حضور و عدم حضور PD146176 در رده سلولی MCF-7..... ۷۱

نمودار ۳-۱۲- نحوه توزیع سیکل سلولی بعد از تیمار با TSA در حضور و عدم حضور PD146176 در رده ۷۳

سلولی MDA-MB-231.....

نمودار ۳-۱۳- اثر TSA بروی میزان 13-S-HODE درون سلولی در رده های سلولی MCF-7 ..... ۷۷

نمودار ۳-۱۴- اثر TSA بروی میزان 13-S-HODE درون سلولی در رده های سلولی MDA-MB-231..... ۷۸

نمودار ۳-۱۵- اثر TSA به همراه 13-S-HODE در رشد رده های سلولی MCF-7..... ۷۹

نمودار ۳-۱۶- اثر TSA به همراه 13-S-HODE در رشد رده های سلولی MDA-MB-231..... ۷۹

نمودار ۳-۱۷- تاثیر غلظت های مختلف 13(S)HODE بر روی رشد سلول های MCF-7 در زمان های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت..... ۸۱

نمودار ۳-۱۸- تاثیر غلظت های مختلف 13(S)HODE بر روی رشد سلول های MDA-MB-231 در زمان های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت..... ۸۲

نمودار۳-۱۹- درصد سلول های آپوپتوتیک اولیه و دیررس در رده سلولی MCF-7 پس از تیمار با 13(S)HODE. ۸۳

نمودار۳-۲۰- درصد سلول های آپوپتوتیک اولیه و دیررس در رده سلولی MDA-MB-231 پس از تیمار با 13(S)HODE..... ۸۵

نمودار ۳-۲۱- تاثیر 13(S)HODE بروی توزیع سیکل سلولی در سلول های رده MCF-7 ..... ۸۷

نمودار ۳-۲۲- تاثیر 13(S)HODE بروی توزیع سیکل سلولی در سلول های رده MDA-MB-231 .... ۸۹

نمودار ۳-۲۳- اثر TSA بروی میزان 15-S-HETE درون سلولی در رده های سلولی MCF-7..... ۹۰

نمودار ۳-۲۴- اثر TSA بروی میزان 15-S-HETE درون سلولی در رده های سلولی MDA-MB-231..... ۹۰

نمودار ۳-۲۵- تاثیر ترکیب 15(S)HETE بروی رشد سلول های رده MCF-7 ..... ۹۱

نمودار ۳-۲۶- تاثیر ترکیب 15(S)HETE بروی رشد سلول های رده MDA-MB-231..... ۹۲

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱: انواع لیپواکسیژنازها ۳

شکل ۱-۲: مسیرهای متابولیسمی آراشیدونیک اسید و تولید واسطه های لیپیدی ۴

شکل ۱-۳: متابولیسم لینولئیک اسید ۵

شکل ۱-۴: متابولیسم اسید های چرب توسط ۱۵-لیپواکسیژناز ۹

شکل ۱-۵: ساختار سه بعدی از ۱۵-لیپواکسیژناز ۱۳

شکل ۱-۶: نحوه قرار گرفتن سوبسترا در جایگاه فعال آنزیم ۱۵-لیپواکسیژناز ۱۴

شکل ۱-۷: تنظیم فعالیت ۱۵-لیپواکسیژناز در داخل سلول ۱۶

شکل۱-۸- : نقش های بیولوژیک ۱۵-لیپواکسیژناز ۱۹

شکل۱-۹-گسترش تومور تحت کنترل ایزوفرم های لیپواکسیژنازها است ۲۳

شکل۱-۱۰: شبکه سیگنالینگ فعال شده توسط .12-HETE ۲۵

شکل۱-۱۱: مرگ سلولی از نوع آپوپتوز ۲۷

شکل۱-۱۲: متابولیسم لیپواکسیژناز روی توزیع سلولی ۲۹

شکل ۳-۱- الف) هیستوگرام سلول های کنترل MCF-7 و ب) هیستوگرام سلول های MCF-7 که با غلظت های مختلف TSA تیمار شده اند ۶۱

شکل ۳-۲- الف) هیستوگرام سلول های کنترل MDA-MB-231 و ب) هیستوگرام سلول های MDA-MB-231 که با غلظت های مختلف TSA تیمار شده اند ۶۲

شکل ۳-۳- الف) هیستوگرام سلول های کنترل MCF-7 ب) هیستوگرام سلول های MCF-7 که با غلظت ۲۰۰ نانومولار TSA تیمار شده اند ج) سلول های MCF-7 که با مهارکننده ۱۵-لیپواکسیژناز نوع ۱ در حضور غلظت ۲۰۰ نانومولار TSA تیمار شده اند ۶۴

شکل ۳-۴- الف) هیستوگرام سلول های کنترل MDA-MB-231 ب) هیستوگرام سلول های MDA-MB-231 که با غلظت ۲۰۰ نانومولار TSA تیمار شده اند ج) سلول های MDA-MB-231 که با مهارکننده ۱۵-لیپواکسیژناز نوع ۱ در حضور غلظت ۲۰۰ نانومولار TSA تیمار شده اند..... ۶۶

شکل ۳-۵- تاثیر TSA بروی توزیع سیکل سلولی در سلول های رده MCF-7..... ۶۸

شکل ۳-۶- تاثیر TSA بروی توزیع سیکل سلولی در سلول های رده MDA-MB-231 ..... ۶۹

شکل ۳-۷- الف) هیستوگرام سلول های کنترل MCF-7 ب) هیستوگرام سلول های MCF-7 که با غلظت ۲۰۰ نانومولار TSA تیمار شده اند ج) سلول های MCF-7 که با مهارکننده ۱۵-لیپواکسیژناز نوع ۱ در حضور غلظت ۲۰۰ نانومولار TSA تیمار شده اند..... ۷۲

شکل ۳-۸- الف) هیستوگرام سلول های کنترل MDA-MB-231 ب) هیستوگرام سلول های MDA-MB-231 که با غلظت ۲۰۰ نانومولار TSA تیمار شده اند ج) سلول های MDA-MB-231 که با مهارکننده ۱۵-لیپواکسیژناز نوع ۱ در حضور غلظت ۲۰۰ نانومولار TSA تیمار شده اند..... ۷۴

شکل ۳-۹- بیان mRNA آنزیم ۱۵-لیپواکسیژناز نوع ۱ و GAPDH در رده سلولی MCF-7..... ۷۵

شکل ۳-۱۰- بیان mRNA آنزیم ۱۵-لیپواکسیژناز نوع ۱ و GAPDH در رده سلولی MDA-MB-231 ۷۶

شکل ۳-۱۱- الف) هیستوگرام سلول های کنترل MCF-7 و ب) هیستوگرام سلول های MCF-7 که با غلظت های مختلف 13(S)HODE تیمار شده اند..... ۸۴

شکل ۳-۱۲- الف) هیستوگرام سلول های کنترل MDA-MB-231 و ب) هیستوگرام سلول های MDA-MB-231 که با غلظت های مختلف 13(S)HODE تیمار شده اند..... ۸۶

شکل ۳-۱۳- تاثیر 13(S)HODE بروی توزیع سیکل سلولی در سلول های رده MCF-7..... ۸۷

شکل ۳-۱۴- تاثیر 13(S)HODE بروی توزیع سیکل سلولی در سلول های رده MDA-MB-231..... ۸۸

فصل اول

مقدمه و

مروری بر مطالعات گذشته