بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده علوم پایه

گروه زیست شناسی

(گرایش بیوشیمی)

بررسی و مطالعه نقش ساختاری و عملکردی لوپ متصل به روی در پروتئین اندوستاتین بر اساس مطالعات بیوانفورماتیک

از:

صدیقه اسکندری

استاد راهنما:

دکتر مجید تقدیر

اساتید مشاور:

دکتر سید محسن اصغری

دکتر بیژن رنجبر

(شهریور ۱۳۹۱)

تقدیر و تشکر:

خداوند را بخاطر تمام مهربانی‌هایی که به دیده می‌بینم و گاه بخاطر ضعف بشری متوجه اش نیستم سپاس می‌گویم. او را شاکرم که در کنار نعمت‌های بی حد و حصرش موهبت کسب علم را به من عطا نمود، تا به اندک مقدار فهم خویش، درک کنم که چه نیکو خالقی است. او را سپاس در رشته‌ای تحصیل کردم که شوق و علاقه به آن گرمی‌بخش سردی‌های زندگی‌ام بود و نیز فرصتی تا عظمت خداوند را در مسیرهای نادیدنی ببینم و یاد بگیرم چطور در مسیر زندگی‌ام، بزرگیش را یادآور خویش باشم.

خداوند را سپاس بخاطر مهربان پدر و مادری که هستی مرا جشن گرفتند و وجود مرا بزرگ شمردند تا خود نیز باور کنم که می‌توانم باشم و موهبت‌ها را تجربه کنم و باور کنم در اوج ناامیدی هنوز می‌توان منتظر امید ماند.

دوران تحصیلم فرصتی بود تا رسم گفتار نیک، پندار نیک وکردار نیک را در سایه اساتید ارجمند و فرزانه‌ام جستجو کنم و از هر یک ارمغانی توشه راه زندگی‌ام کنم. شاید قدردانی کمترین کاری باشد که من شاگرد می‌توانم در مقابل تمام خوبی‌های ایشان انجام دهم. از استاد راهنمای عزیز و بزرگوارم **جناب آقای دکتر مجید تقدیر** نهایت سپاس را دارم و امیدوارم در قالب واژه‌ها و قلم ضعیفم بتوانم مدیون بودنم را به ایشان بازگو کنم. انجام این پروژه بعد از فراق پدر، جز با وجود امیدبخش ایشان ممکن نبود. بحث علمی و شاگردی مکتب علمی ایشان بسیار لذت بخش و فرصتی بود تا سعی کنم، آئین خوب دیدن، خوب شنیدن، دقت کردن و درک کردن را یاد بگیرم. و همچنین فرصتی بود تا صبر استاد را در مقابل پرسش‌های گاه و بی‌گاه شاگرد نظاره‌گر باشم و تا آنجا وام‌دار ایشان گردم که شاگردی مکتب اخلاق، صبر و بزرگواری ایشان را تا همیشه بر خود واجب بدانم.

از استاد مشاور گرانقدرم **جناب آقای دکتر اصغری** تشکر می‌کنم. راهنمایی و پیگیری‌های ایشان در بخش تجربی پروژه تا آنجا بود که عنوان استاد راهنما خطاب به ایشان، چیزی جز ادای دین نیست و اخلاق و بزرگواری ایشان در تمام این دوران، درسی فراموش نشدنی برای من خواهد بود. همچنین از استاد مشاور ارجمندم جناب آقای دکتر بیژن رنجبر نهایت سپاس را دارم.

از اساتید داور بزرگوار سرکار خانم پروفسور سریری و جناب آقای دکتر آقامعالی که زحمت داوری پایان نامه را تقبل کردند و همچنین سرکار خانم دکتر سرمد نماینده محترم تحصیلات تکمیلی کمال تشکر را دارم.

شایسته است از جناب آقای دکتر رضا خدارحمی ، دکتر منصوری، سرکار خانم حیدری، دکتر جعفریان، دکتر علی‌اکبر بخاطر همکاری و زحمات بی‌دریغشان تشکر کنم. از سرکار خانم ندافی، کارشناس محترم آزمایشگاه بیوفیزیک محاسباتی و بیو ترمودینامیک دانشگاه تربیت مدرس که حسن خلق و فروتنی ایشان برای من بیاد ماندنی خواهد بود نیز تشکر می‌کنم. از دوستان خوبم در آزمایشگاه شیمی-فیزیک و استاد ارجمند جناب آقای دکتر روحی که بخش تئوری پروژه موهبتی بود تا بواسطه یکجا بودن محل کار از حسن‌خلق و برخورد ایشان درس بیاموزم کمال تشکر را دارم. از اساتید محترم گروه زیست‌شناسی و کارشناسان محترم بخصوص سرکار خانم شایگان تشکر می‌نمایم.

از تمام همکلاسی‌ها و دوستان عزیزم (خانم‌ها: اصفیایی، ابراهیمی، خانجانی، چمنی، جوادی، مرادی، صدر ممتاز، قوامی، ملاکریمی، شاهنگیان، ترحمی) که هر یک به نحوی و در حد توان، غم مرا امید بخشیدن تشکر می‌کنم و خدا را بخاطر فرصت دوستی و آشنایی با آنان شاکرم و از آقایان جعفری، رحمانی و محسنی بخاطر همکاری بی‌دریغشان تشکر می‌کنم و برای تک تک این عزیزان آرزوی موفقیت می‌نمایم.

در نهایت عشق و احترام

تقدیم به

روح پاک پدرم، که شور و هیجان زندگی را در کسب علم می دانست

مادر سراسر مهربانیم، که امید بخش دوران تحصیل و زندگی ام هست

استاد ارجمند و فرزانه ام، جناب آقای دکتر مجید تقدیر که تا همیشه وام دار منش و صبر شان خواهم بود

استاد گرانقدرم، جناب آقای دکتر سید محسن اصغری که سپاس گزار بزرگواری شان خواهم بود

چکیده

بررسی و مطالعه نقش ساختاری و عملکردی لوپ متصل به روی در پروتئین اندوستاتین بر اساس مطالعات بیو انفورماتیک

صدیقه اسکندری

اندوستاتین قطعه پروتئولیتیکی کلاژن XVIII است که بطرز بسیار مؤثری از رگزایی و رشد تومورجلوگیری می کند اما هنوز مکانیسم عمل آن مشخص نشده است. مطالعات نشان دادند که قطعه انتهای آمینی اندوستاتین موشی و انسانی فعالیت های ضد توموری، ضد مهاجرت و ضد نفوذ پذیری مشابه با اندوستاتین کامل را نشان می دهند. این قطعه محتوی یک یون فلزی روی است. اتصال یون روی جهت پایداری گرمایی وترمودینامیکی و همچنین فعالیت ضد توموری و ضد مهاجرتی این قطعه ضروری است.

در این مطالعه به منظور شناسایی مکانیسم فعالیت این توالی از اندواستاتین انسانی، پپتید جدید که دارای پیوند دی سولفید اما ناتوان در اتصال به یون روی در ساختار خود می‌باشد طراحی و سنتز شد (ES1-SS). توانایی پپتید جدید در مهار تکثیر سلول اندوتلیال و رگزایی *in vitro* و رشد تومور *in vivo* مورد بررسی قرارگرفت. دیده شد که پپتید جدید فاقد فعالیت ضد تکثیری و ضدرگزایی قابل توجه‌ای بوده اما فعالیت ضد توموری مشابه‌ای را با پپتید طبیعی(ES1 Zn) در مدل سرطان سینه موش دارا می‌باشد. به نظر می‌رسد احتمالاً ES1-SS دارای فعالیت ضد توموری غیروابسته به رگزایی می‌باشد. تغییرات ساختار دوم پپتید توسط طیف‌سنجی FT-IR، دورنگ‌نمایی دورانی ناحیه دور و فلورسانس ذاتی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل نشان دادند که پپتید جدید دارای ساختار دوم مشابه همراه با تفاوت در ساختار موضعی لوپ در مقایسه با پپتید طبیعی می‌باشد. یافته‌های حاصل از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی نشان دادند که در حضور پیوند دی‌سولفیدی و حفظ ساختار لوپ بدون یون روی، ساختار متوسط و تحرک پپتید ES1-SS مشابه با پپتید ES1 Zn می‌باشد. نتایج نشان دادند که پیوند دی‌سولفیدی اثرات قابل توجهی بر مدهای حرکتی اساسی و همبستگی حرکات بین باقیمانده‌های انتهای آمینی و کربوکسیلی مهم در عملکرد پپتید ES1-SS می‌گذارد، بطوریکه پپتید در نبود یون روی در ساختار خود، فعالیت ضد توموری از خود نشان می‌دهد. شبیه‌سازی میانکنش پپتید با گیرنده اینتگرین $\alpha_v\beta_3$ نشان داد که اتصال دو پپتید به گیرنده از نواحی مشابه‌ای صورت می‌گیرد. در نهایت، به نظر می‌رسد که تفاوت عملکرد دو پپتید بدلیل تفاوت در خواص دینامیکی و ساختاری می-باشد. بعلاوه نتایج تکمیلی حاصل از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی و شبیه‌سازی میانکنش با گیرنده پپتید جهش‌یافته که ناتوان در اتصال به یون روی در ساختار خود می‌باشد (ES1 no Zn) پیشنهاد می‌کند که کانفورماسیونی را که فلز روی در ساختار ایجاد می‌کند یک رخداد کلیدی در فعالیت مهارکنندگی این پپتید از طریق اینتگرین است.

کلید واژه: پپتید اندوستاتین، فعالیت ضدتوموری، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، شبیه‌سازی میانکنش پپتید با گیرنده

عنوان صفحه

فهرست جداول .....خ

فهرست شکل‌ها.....د

چکیده فارسی.....ر

چکیده انگلیسی.....ز

فصل اول : مقدمه و تئوری ۲

۱-۱-کلیات ۲

۱-۲- رشد تومور نیازمند تشکیل رگهای خونی جدید ۳

۱-۲-۱- القاکننده‌های رگزایی ٤

۱-۲-۲- مهارکننده‌های طبیعی رگزایی ٤

۱-۲-۲-۱- مهار کننده‌های مشتق شده ماتریکسی ٥

۱-۲-۲-۲- مهار کننده‌های مشتق شده- غیر ماتریکسی ٦

۱-۳- رگزایی به عنوان یک هدف درمانی سرطان ۸

۱-٤- داروهای درمانی ضدرگزایی ۹

۱-٤- ۱- آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (MAbs) ۹

۱-٤-۲- مهار کننده‌های ریز مولکول. ۱۰

۱-٤-۳- مقایسه ریز مولکولها و آنتیبادیهای مونوکلونال ۱۱

۱-٤-٤- پپتیدهای ضدرگزایی ۱۲

۱-٥- طبقه بندی پپتیدهای ضد رگزایی ۱۳

۱-٥-۱- پپتیدهای مشتق از فاکتور رشد و رسپتورهای فاکتور رشد ۱۳

۱-٥-۲- پپتیدهای مشتق از پروتئینهای آبشار انعقادی ۱٤

۱-٥-۳- پپتیدهای مشتق از کموکینها ۱٥

۱-٥-٤- پپتیدهای مشتق از پروتئینهای ماتریکس خارج سلولی ۱٥

۱-٦- اندوستاتین ۱۸
۱-٦-۱- بیوسنتز اندوستاتین از کلاژن ۱۸ ..... ۱۹
۱-٦-۲- مکانیزم عمل اندوستاتین ۱۹
۱-٦-۳- اثرات اندوستاتین روی رشد تومور و رگزایی ۲۱
۱-٦-٤- مدیفیکاسیون‌های انجام شده بر روی اندوستاتین ۲۲
۱-۷- نقش یون روی در پایداری ساختاری و عملکرد اندوستاتین ۲۲
۱-۸- نقش ساختاری و عملکردی پیوندهای دی‌سولفیدی در پروتئین اندوستاتین ۲٤
۱-۹- نتایج حاصل از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی و شبیه‌سازی میانکنش با گیرنده اندوستاتین ۲۵
۱-۱۰- اهمیت دینامیک مولکولی پروتئین ها در عملکرد ۲٦
۱-۱۱- شبیه سازی دینامیک مولکولی ۲۹
۱-۱۱-۱ مراحل انجام دینامیک مولکولی ۲۹
۱-۱۱-۲ تحلیل نتایج شبیه‌سازی دینامیک مولکولی ۳۲
۱-۱۲- نقش اینتگرین $\alpha_v\beta_3$ در رگزایی و سرطان ۳۳
۱-۱۳- هدف از تحقیق ۳۳

فصل دوم : مواد و روش‌ها **۳۵**

۲-۱- دستگاه های مورد استفاده ۳۵
۲-۲- مواد شیمیایی مورد استفاده ۳۵
۲-۳- تأیید حضور پیوند دی سولفید در پپتید ES1-SS ۳۵
۲-٤- بررسی اتصال پپتیدها به یون روی توسط Flame atomic absorption spectrometry ۳٦
۲-۵- مطالعات فعالیت پپتیدها در شرایط *in vivo* و *in vitro* ۳۷
۲-۵-۱- بررسی فعالیت ضد توموری *in vivo* ۳۷
۲-۵-۲- آزمون تکثیر سلول های اندوتلیال بند ناف انسانی (HUVEC) ۳۷
۲-۵-۲-۱- کشت سلول‌های اندوتلیال بند ناف انسانی (HUVEC) ۳۸
۲-۵-۲-۲- تریپسینه کردن و پاساژ سلول‌های اندوتلیال بند ناف انسانی (HUVEC) ۳۸
۲-۵-۲-۳- تهیه محیط کشت RPMI 1640 و محلول ۰.۲۵٪ تریپسین- EDTA ۳۹
۲-۵-۳- آزمون تشکیل لوله های مویرگی و سنجش مهار رگزایی *in vitro* ۳۹

۲-۵-۳-۱- آزمون تشکیل لوله های مویرگی از سلول های HUVEC در ماتریکس کلاژن ٤٠
۲-۵-۳-۲- تهیه ژل کلاژن جهت آزمون تشکیل لوله های مویرگی ٤١
۲-٦- مطالعات طیف سنجی ٤١
۲-٦-۱- مطالعه ساختار دوم نمونه ها با استفاده از طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی ناحیه دور ٤١
۲-٦-۲- مطالعات FT-IR ٤١
۲-٦-۳- مطالعه نشر فلورسانس ذاتی ٤٢
۲-۷- مدل‌سازی مولکولی ٤٢
۲-۸- ایجاد پیوند دی‌سولفیدی در ساختار ٤٣
۲-۹- شبیه سازی دینامیک مولکولی (MD) ٤٣
۲-۹-۱- ابزار محاسبه ٤٣
۲-۹-۲- روش محاسبه ٤٤
۲-۹-۳- شرایط محاسبه ٤٤
۲-۹-٤- تحلیل اطلاعات ٤٥
۲-۹-٤-۱- حرکت ها و نوسانات درون ملکولی ٤٥
۲-۱۰- شبیه‌سازی میانکنش پپتید با گیرنده ٤٥
فصل سوم : نتایج ٤٧
۳-۱-طراحی پپتیدها ٤٧
۳-۱-۱- تأیید حضور پیوند دیسولفیدی در ساختار پپتید ES1-SS ٤٨
۳-۲-بررسی اتصال پپتیدها به یون روی توسط Flame atomic absorption spectrosco ٤٨
۳-۲-۱- تیمار پپتیدها با یون روی و نمکزدایی با استفاده از کروماتوگرافی فیلتراسیون ژلی ٤٩
۳-۲-۲- تعیین غلظت پپتیدها ٤٩
3-2-3-Flame atomic absorption spectrometry ٥٠
۳-۳- مطالعات فعالیت پپتیدها در شرایط *in vivo* و *in vitro* ٥٠
۳-۳-۱- مطالعات *in vivo* اثرات ضد توموری ES1 Zn و ES1-SS ٥٠
۳-۳-۲- مطالعات *in vitro* اثرات ضد توموری ES1 Zn و ES1-SS ٥٢
۳-۳-۲-۱- بررسی قابلیت مهار تکثیر سلولهای اندوتلیال بند ناف انسانی (HUVEC) ٥٢

۳-۳-۲-۲- بررسی قابلیت مهار تشکیل لوله های مویرگی از سلول های HUVEC در ماتریکس کلاژن ۵۵
۳-٤- مطالعات طیف سنجی پپتیدها ۵٦
۳-٤-۱- مطالعه ساختار دوم ES1 Zn و ES1-SS توسط طیف سنجی دورنگنمایی دورانی ناحیه دور ۵٦
۳-٤-۲- مطالعه ساختاری توسط طیف‌سنجی FT-IR ۵۹
۳-٤-۳- مطالعات فلورسانس ذاتی ٦۰
۳-۵- مطالعه تئوری ٦۲
۳-۵-۱- پایداری شبیه سازی ٦۲
۳-۵-۲- انعطاف پذیری ساختاری ٦٤
۳-۵-۳- همبستگی حرکت های ساختاری ٦۵
۳-۵-٤- حرکت های هماهنگ اصلی ٦٦
۳-۵-۵- تغییرات فاصله بین باقیماندههای آمینواسیدی طی زمان شبیهسازی ٦۷
۳-۵-٦- شبیه سازی میانکنش پپتید با گیرنده ۷۰
فصل چهارم : بحث و نتیجه‌گیری ۷۵
فصل پنجم : منابع ۸۵

جدول۳-۱. ترادف آمینواسیدی ES1 Zn و ES1-SS ٤٧

جدول ۳-۲. نسبت Zn^{+2} متصل شده به ازای هر پپتید حاصل از روش طیف سنجی جذب اتمی ٥٠

جدول۳-۳. مقادیر IC_{50} نمونه ها در آزمون مهار تکثیر سلول های HUVEC ٥٢

جدول۳-٤. درصد مهار تکثیر سلول های HUVEC در غلظت های مختلف نمونه ٥٣

جدول۳-٥. مقادیر IC_{50} نمونه ها در آزمون تشکیل لوله های مویرگی از سلول های HUVEC ٥٤

جدول۳-٦. درصد مهار رگزایی در آزمون تشکیل لوله های مویرگی از سلول های HUVEC ٥٤

جدول ۳-۷. درصد ساختارهای دوم (ES1 Zn) تخمین زده شده با استفاده از نرم افزار J-700 2^{nd} structure estimate ٥٧

جدول ۳-۸. درصد ساختارهای دوم (ES1-SS) تخمین زده شده با استفاده از نرم افزار J-700 2^{nd} structure estimate ٥٨

جدول ۳-۹. توزیع ساختار دوم پپتید ES1 Zn بر اساس مطالعه باند آمید I در دمای ۲٥° ٦٠

جدول ۳-۱۰. توزیع ساختار دوم پپتید ES1-SS براساس مطالعه باند آمید I در دمای ۲٥° ٦٠

جدول ۳-۱۱. انرژی کل میانکنش هریک از آمینواسیدهای پپتید ES1 Zn با گیرنده اینتگرین ٧١

جدول ۳-۱۲. انرژی کل میانکنش هر یک از آمینواسیدهای پپتید ES1 no Zn با گیرنده اینتگرین ٧٢

جدول ۳-۱۳. انرژی کل میانکنش هر یک از آمینواسیدهای پپتید ES1-SS با گیرنده اینتگرین ٧٣

شکل (۱-۱). مقایسه نحوه عملکرد آنتی بادی‌های مونوکلونال و ریز مولکول‌ها ۱۲
شکل (۱-۲). نمایش شماتیک مولکول Endostar و قطعه (٤۹-٦) مشتق از اندوستاتین ۱٦
شکل (۱-۳). نمایش قطعه ۲۷ آمینواسیدی انتهای آمینی در مولکول اندوستاتین و بصورت مشتق از آن ۱۷
شکل (۱-٤). نمایش شماتیک پروتئین اندوستاتین و انتهای کربوکسیلی کلاژن ۱۸ ..... ۱۹
شکل (۱-۵). نمایش شبکه پیام رسانی اندوستاتین ۲۱
شکل (۱-٦). موقعیت پیوندهای دی‌سولفیدی در مولکول اندوستاتین ۲٤
شکل(۱-۷). مراحل انجام شبیه‌سازی ۳۰
شکل (۲-۱). آزمون تشکیل لوله های مویرگی از سلول های HUVEC در ماتریکس کلاژن ٤۰
شکل (۳-۱). نمایش ریبون پپتید ES1 Zn و پپتید ES1-SS بر اساس توالی آمینواسیدی ٤۸
شکل (۳-۲). کروماتوگرام ستون سفادکس G10، پپتید ES1-SS و پپتید ES1 Zn ٤۹
شکل (۳-۳). اندازه گیری ابعاد تومور ۵۱
شکل (۳-٤). تیمار موش دارای تومور BT-474 با استفاده از پپتیدهای ES1 Zn و ES1-SS ۵۱
شکل (۳-۵). درصد مهار تکثیر در غلظتهای مختلف سه نمونه ۵۲
شکل (۳-٦). سلول های اندوتلیال بند ناف انسانی قبل و بعد از تیمار با نمونه ها ۵۳
شکل (۳-۷). درصد مهار رگزایی در آزمون تشکیل لوله های مویرگی از سلول های HUVEC توسط غلظتهای مختلف پپتیدها ۵۵
شکل (۳-۸). آزمون تشکیل لوله های مویرگی از سلول های HUVEC در ماتریکس کلاژن. ۵۵
شکل (۳-۹). طیف Far-UV-CD ES1 Zn در حضور $ZnCl_2$ 2 mM و EDTA 10 mM ۵۷
شکل (۳-۱۰). طیف Far-UV-CD در حضور $ZnCl_2$ 2 mM و DTT 5 mM ۵۸
شکل(۳-۱۱). طیف Far-UV-CD پپتیدها در حضور $ZnCl_2$ 2 mM ۵۸
شکل (۳-۱۲). مشتق دوم باند آمیدI در طیف FT-IR پپتیدها ۵۹
شکل(۳-۱٤). نشر فلورسانس ذاتی پپتیدها ٦۱
شکل (۳-۱۵). نشر فلورسانس ذاتی ES1-SS ٦۱
شکل (۳-۱٦). تغییرات RMSD پپتیدها نسبت به ساختار اولیه ٦۲
شکل (۳-۱۷). تغییرات انرژی کل در طول زمان متعادل سازی هر سه پپتید ٦۳
شکل(۳-۱۸). تغییرات متقارن انرژی جنبشی و پتانسیل در طول زمان متعادل سازی ٦٤
شکل (۳-۱۹). مقایسه RMSF ساختاری پپتیدها ٦٤

شکل (۳-۲۰). انطباق ساختار متوسط دو پپتید جهش‌یافته بر پپتید طبیعی بر اساس کربن آلفا ٦٥
شکل (۳-۲۱). نمودار DCCM هر سه پپتید ٦٥
شکل (۳-۲۲). RMSF در طول اولین، دومین و سومین بردار ویژه پپتیدها ٦٦
شکل (۳-۲۳). نمودار دو بعدی تغییرات فاصله پپتیدها ٦٧
شکل (۳-۲٤). نمودار تغییرات فاصله ٦٨
شکل (۳-۲٥). نمودار تغییرات فاصله ٦٨
شکل (۳-۲٦). نمودار تغییرات فاصله ٦٩
شکل (۳-۲۷). نمودار تغییرات فاصله ٦٩

فصل اول

مقدمه و تئوری

۱-۱-کلیات

هر ساله از هر صد هزار نفر ۳۵۰-۱۰۰ نفر به علت سرطان فوت می‌کنند. نقص تنظیم سلولی، دلیل اکثریت و یا تمام موارد سرطان می‌باشد. این نقص به دلیل تخریب ژنتیکی بوده و معمولاً با اثرات مواد شیمیایی ایجادکننده تومور، هورمون‌ها و گاهی ویروس‌ها همراه است. فرایند ایجاد سرطان انکوژنز[۱] و یا تومورژنز[۲] نامیده می شود. این پروسه یک فعل و انفعال بین ژنتیک و محیط می باشد. معمولاً سرطان در نتیجه جهش‌هایی است که فرد در طول زندگیش با آن‌ها مواجه می‌شود. جهش‌ها در دو کلاس ژنی در شروع سرطان دخیل می باشند: پروتو انکوژن ها[۳] و ژن های سرکوب کننده تومور[۴]. کلاس سوم ژن‌ها، که از دو کلاس دیگر تخصصی‌تر می‌باشند ژن‌های سرایدار[۵] نام داشته و گاهی با سرطان مرتبط می‌باشند. به طور نادر، رخداد موتاسیون در یک ژن منفرد منجر به شروع سرطان می گردد. تغییرات ژنتیکی که باعث ایجاد سرطان می شوند، خصوصیات سلول‌ها را تغییر داده و باعث فرار سلول‌ها از کنترل‌های رشد نرمال ومنجر به ایجاد یک فنوتیپ سرطانی می‌شوند. سلول‌های سرطانی نیاز به محرکی دارند تا تکثیر شوند و این محرک نباید نیازمند یک سیگنال القایی خارجی باشد. این سلول‌ها معمولاً اتصالاتشان را به سلول‌های محیطی و یا ماتریکس خارج‌سلولی از دست داده و تومور منتشر می‌گردد. ممکن است یک سلول سرطانی تا یک نقطه‌ای شبیه به یک سلول نرمال باشد که تقسیمات سریعی دارند، اما سلول سرطانی و سلولی که از آن به وجود می‌آید نامیرا می باشد. در برخی موارد، سلول‌ها از تومور اولیه به محل‌های جدید مهاجرت می‌کنند و در این محل‌ها، تومورهای ثانویه تشکیل می دهند. این فرایند را متاستاز[۶] می‌گویند. اکثر مرگ‌هایی که در اثر سرطان رخ می دهند، به علت تومورهای مهاجم و سریع الرشدی‌اند که متاستاز می دهند. متاستاز، پروسه‌ای پیچیده با مراحل متعدد می‌باشد. تهاجم به بافت-های جدید غیرتصادفی بوده و به طبیعت سلول متاستاز دهنده و بافتی که مورد تهاجم واقع شده است، بستگی دارد. اگر سلول‌های تومور، فاکتورهای رشد و فاکتورهای رگزا[۷] (القا کننده‌های رشد رگ‌های خونی) را تولید نمایند، متاستاز تسهیل می گردد. سلول‌های مهاجر و متحرک خطرناک‌ترین سلول‌ها می‌باشند. بافت‌هایی که مورد حمله واقع شده‌اند مثل استخوان، رگ-های خونی و کبد، که اکثراً تولید فاکتورهای رشد می‌نمایند، آسیب‌پذیرترین سلول‌ها می‌باشند. این سلول‌ها مقاوم‌تر خواهند

[1] .oncogenesis
[2] .tumorgenesis
[3] .Proto-Oncogenes
[4] .Tumor- Suppress genes
[5] .Caretaker genes
[6] .methastasis
[7] .angiogenesis

بود اگر تولید: ۱) فاکتورهای ضد تکثیری که تقسیم سلول‌های توموری را متوقف می‌نمایند ۲) مهارکننده های آنزیم های پروتئولیتیک (این مهار کننده ها پروتئازهای سلول سرطانی را که جهت نفوذ به سلول استفاده می شوند مسدود می کنند) و ۳) فاکتورهای ضدرگزایی که از تحریک رشد رگ‌های خونی توسط سلول‌های توموری جلوگیری می‌کنند، را نمایند [۱].

۱-۲- رشد تومور نیازمند تشکیل رگ‌های خونی جدید

اکثر تومورها تشکیل رگ‌های خونی جدیدی را القا می نمایند که به تومور تهاجم نموده و به آن مواد غذایی را می رسانند، این پروسه را رگزایی گویند. رگزایی فرایند زیست‌شناختی مهمی است که، نه تنها تحت شرایط فیزیولوژیکی بلکه در بیماری-های متعددی از جمله سرطان، آرتریت روماتوئید و دیابت رتینوپاتی رخ می دهد [۲]. تحت چنین شرایطی رگزایی یک فرایند بسیار تنظیم شده است، یعنی برای مدت زمان کوتاهی فعال شده و سپس به طور کامل مهار می شود [۳].

رشد تومور و متاستاز سلول‌های توموری نیز فرایندهایی وابسته به رگزایی هستند. تومورها، چه اولیه و چه ثانویه باشند، نیازمند بکارگیری رگ‌های خونی جدید، جهت رشد در مقادیر بالا می‌باشند. در غیاب یک فراورده خونی، یک تومور می تواند به توده‌ای از سلول‌ها تا 10^6 سلول، که کره‌ای به قطر ۲ میلی متر را به وجود می آورند، رشد نمایند. در این نقطه، تقسیم سلول‌های خارج از توده توموری با مرگ سلول‌هایی که در مرکز می باشند و به دلیل کمبود مواد غذایی می‌میرند، متعادل می-گردند.چنین تومورهایی، مشکلات کمی ایجاد می‌کنند، مگر آنکه هورمون ترشح کنند [۱]. فرایند رگزایی از طریق یک تعادل ظریف بین فاکتورهای پیش و ضد رگزایی درون زا[1] متعددی اداره می شود. یک عدم تعادل در این فاکتورها منجر به گسترش و پیشرفت پاتولوژیکی می‌شود [۵،٤]. فرایند رگزایی درگیر تعاملات میان انواع متعدد سلولی شامل سلول‌های اندوتلیال[2] (EC) و سلول‌های نیایی اندوتلیال، پری سیت‌ها[3]، سلول‌های ماهیچه صاف رگی، سلول‌های استروما[4] است. این تعاملات از طریق فاکتورهای ترشح شده متعددی، همچنین از طریق میانکنش‌های سلول ـ ماتریکس خارج سلولی (ECM)[5] صورت می-گیرد. میانکنش بین سلول‌های EC و ماتریکس خارج سلولی مهم است و فرایندهای سلولی همچون مهاجرت، تکثیر، تمایز، و آپوپتوزیس سلول‌های EC که برای فرایند رگزایی ضروری هستند را تحت تأثیر قرار می‌دهد. این فرایند پیچیده

[1] .endogenuse
[2] .endothelial cells
[3]. pericytes
[4]. stroma
[5] . extracellular matrix (ECM)

نیازمند مراحل متعددی از جمله تجزیه غشای پایه اطراف مویرگ، مهاجرت سلولهای اندوتلیال آستر مویرگها به تومور، تقسیم این سلولهای اندوتلیال و تشکیل یک غشای پایه جدید اطراف مویرگی که جدید ساخته شده است [۸-٦]. بسیاری از تومورها، فاکتورهای رشدی را تولید می نمایند که رگزایی را سبب می شوند، تومور های دیگر، تا حدی سلول های نرمال اطراف را تحریک به سنتز و ترشح چنین فاکتورهایی می‌نمایند [۱].

۱-۲-۱- القاکننده‌های رگزایی

القاکننده‌های رگزایی زیادی مشخص شده‌اند، که می‌توان از: اعضای خانواده فاکتور رشد اندوتلیال رگی[1](VEGF)، آنژیوپویتین[2] فاکتورهای رشد ترانسفورم‌کننده (TGF)[3]، فاکتور رشد مشتق شده-پلاکتی[4]، فاکتور نکروزکننده تومورα[5]، اینترلوکین‌ها[6] و اعضای خانواده فاکتور رشد فیبروبلاستی[7](FGF) نام برد [٦-٤]. در انسانها پنج ژن VEGF وسه ژن پروتئین پروتئین گیرنده VEGF وجود دارد.بیان VEGF می‌تواند با هیپوکسی، فقر سلول‌ها برای اکسیژن که زمانی که $(PO_2)< 7$ است رخ می دهد، القا شود. گیرنده های VEGF که تیروزین کیناز می باشند، جنبه‌های مختلف رشد رگ‌های خونی مثل بقای سلولی و رشد، مهاجرت سلولی و تراوایی دیواره رگی را تنظیم می‌نمایند. پیام هیپوکسی توسط فاکتور قابل القا توسط هیپوکسی(HIF-1)، که یک فاکتور رونویسی است در شرایط اکسیژن پایین فعال می شود و سپس به ژن VEGF متصل و رونویسی از آن ژن و حدود ۳۰ ژن دیگر را فعال می نماید که بسیاری از آنها بر روی توانایی رشد تومور اثر گذارند، ایجاد می شود [۱].

۱-۲-۲- مهارکننده‌های طبیعی رگزایی

مهار کننده‌های درون زا رگزایی شامل پپتیدهای متعدد ضدرگزایی، هورمون‌های متابولیتی و تنظیم کننده‌های مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی هستند.در اینجا این مهار کننده‌ها به دو کلاس مهم تقسیم می‌شوند [۹] :

[1] . vascular endothelial growth factor
[2]. angiopoietins
[3] . transforming growth factors
[4]. platelet-derived growth factor
[5] . tumor necrosis factor- α
[6] . interleukins
[7] . fibroblast growth factor

۱-۲-۲-۱- مهار کننده‌های مشتق شده ماتریکسی

آرستین[1]. ملکول ۲۶ کیلو دالتونی مشتق از دمین غیر کلاژنی (NC1) زنجیر α_1 کلاژن نوع چهار، که بطور گزینشی تشکیل لوله سلول‌های اندوتلیالی را مهار می کند [۱۰].

کانستاتین[2]. قطعه ۲۴ کیلو دالتونی زنجیر α_2 نوع چهار کلاژن است. کانستاتین تکثیر سلول‌های اندوتلیال انسانی تحریک شده- سرم را مهار می‌کند، و باعث القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی بدون اثر مهاری بر روی تکثیر یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های غیر اندوتلیالی می‌شود [۱۱].

اندورپیلین[3]. پرلکان، پروتئوگلیکان هپاران سولفاتی غشای پایه است که نقش کلیدی در رشد رگی ایفا می‌کند [۱۲]. انتهای کربوکسیلی پرلکان، اندوریپیلین یا دمین ۷ پرلکان نامیده می‌شود که به طور بالقوه جنبه‌های متعددی از رگزایی: مهاجرت سلول اندوتلیال، رشد رگ خونی و... را در آزمایش‌های غشای کوریوآلانتوئیک جوجه و در آزمایش ماتری‌ژل موش مهار می-کند. به طور شگفت‌انگیز، اندوریپیلین به اندوستاتین که دیگر مهارکننده رگزایی مشتق شده- ماتریکسی است متصل می‌شود و اثرات ضد رگزایی آن را بی اثر می‌کند [۱۳].

اندوستاتین[4]. مهار کننده درون زا مشتق شده-کلاژن ۱۸ که منطبق بر قطعه ۲۰ کیلودالتونی مشتق شده از دمین انتهای کربوکسیلی کلاژن ۱۸ می‌باشد [۱۶-۱۴]. اندوستاتین نوترکیب به طور مؤثری رگزایی را در مدل‌های حیوانی بدون اثرات جانبی، سمیت یا افزایش مقاومت دارویی مهار، ورشد تومور اولیه و متاستاز را سرکوب می‌کند [۱۸،۱۷،۱۴].

قطعه شبه اندوستاتین از کلاژن ۱۵[5]. بر پایه بررسی همولوژی با اندوستاتین قطعه شبه اندوستاتین کلاژن ۱۵، با همولوژی ۷۰٪ با اندوستاتین، یافت شد. این قطعه، مهاجرت سلول‌های اندوتلیال را مهار می‌کند اما تأثیری روی تکثیر ندارد [۱۹].

[1]. Arresten
[2]. Canstatin
[3]. Endorepellin
[4]. Endostatin
[5]. Endostatin-like fragment from type XV collagen

فیبولین‌ها[1]. هضم پروتئولیتیکی غشای پایه توسط الاستازها و کاتپسین‌ها قطعاتی را ایجاد می‌کند که فعالیت ضد رگزایی دارند [۲۰]. از جمله آن‌ها قطعات انتهای کربوکسیلی منطبق بر فیبولین 1D و دمین ۳ فیبولین ۵ هستند، که اخیراً نشان داده شده است که فیبولین ۵ آنتاگونیست سیگنال‌دهی VEGF بوده و جوانه زنی رگزایی اندوتلیالی را مهار می‌کند [۲۱].

ترومبوسپوندین‌ها[2]. ترومبوسپوندین ۱ (TSP-1) اولین پروتئین شناخته شده به عنوان مهارکننده طبیعی رگزایی است [۲۲]، و یک گلیکوپروتئین بزرگ و چندکاره ECM است [۲۳]. برخی مطالعات پیشنهاد می‌کنند که TSP-1 ممکن است دارای فعالیت دو جانبه (پیش رگزایی و ضد رگزایی) وابسته به پروتئازهایی که قطعات TSP-1 را تولید می‌کنند، باشد [۲۵،۲٤].

توماستاتین[3]. کل قطعه ۲۸ کیلودالتونی زنجیره α_3 دمین NC1 نوع چهار کلاژن توماستاتین نامیده می‌شود [۲۷،۲٦]. بیان بالای دمین‌های توماستاتین در *in vivo* توسط سلول‌های توموری، خصوصیات تهاجمی را در مدل ملانومای موشی مهار می‌کند [۲۸].

۱-۲-۲-۲- مهار کننده‌های مشتق شده- غیر ماتریکسی

آنژیوستاتین[4]. شکست پلاسمینوژن توسط پروتئازها منجر به تشکیل پپتیدهای ضدرگزایی ۳۸ تا ٤۵ کیلودالتونی می‌شود [۳۱-۲۹].

آنتی ترومبین ۳ شکسته شده و دمین kringle-2 پروترومبین[5]. شکست لوپ انتهای کربوکسیلی آنتی ترومبین یک تغییرات کانفورماسیونی را در ملکول ایجاد می‌کند، وکانفورماسیون شکسته شده فعالیت ضدتوموری و ضدرگزایی را درمدل‌های موشی دارد [۳۲]. همچنین دمین kringle-2 پروترومبین فعالیت ضد تکثیر سلول اندوتلیالی را نشان می‌دهد [۳۳].

کندرومدولین I[6]. پروتئین ۲۵ کیلودالتونی NC1 ماتریکسی ویژه-غضروف و مهارکننده قوی رگزایی می‌باشد [۳٤].

---

[1] . Fibulins
[2] . Thrombospondins
[3] . Tumstatin
[4] . Angiostatin
[5] . Cleaved antithrombin III and prothrombin kringle-2
[6] . Chondromodulin-I

تیروزین کیناز۱ محلول شبه Fms[1]. ژن VEGFR-1 علاوه بر طول کامل گیرنده، از طریق پیرایش ضعیف یک فرم کوچک محلول(sFIt-1) را که فقط دارای ٦ دمین Ig است [۳۷-۳۵] و تمایل بالایی برای فاکتور رشد جفت[2] و اندوتلیال رگی دارد [۳۹،۳۸،۳۵] کد می‌کند. گزارش‌های متعددی پیشنهاد می‌کنند که sFIt-1 می‌تواند به عنوان یک عامل ضد توموری از طریق مهار فاکتور رشد اندوتلیال رگی عمل کند [٤٢-٤٠].

اینترفرون‌ها[3]. اینترفرون‌ها رگزایی القا شده توسط سلول‌های توموری را در موش مهار می‌کنند [٤٣].

اینترلوکین‌ها[4]. اینترلوکین‌ها خانواده‌ای از پروتئین‌های مشتق شده لوکوسیتی هستند که دارای اثرات وسیع الطیفی روی خواص خواص فیزیولوژیکی متعدد از جمله رگزایی می‌باشند [٤٤].

۲- **متوکسی استرادیول**(2-ME)[5]. متابولیت استرادیولی درون‌زا و مهارکننده رگزایی با اثر مستقیم بر روی سلول‌های سرطانی سرطانی می‌باشد [٤٨-٤٥].

فاکتور مشتق شده – رنگدانه اپی‌تلیوم (PEDF)[6]. قوی‌ترین مهارکننده رگزایی در چشم پستانداران است [٤٩]. اخیراً مطالعه‌ای پیشنهاد می‌کند که در شرایط فیزیولوژیکی یک تعادل حیاتی بین PEDF و VEGF وجود دارد وPEDF ممکن است توان رگزایی VEGF را خنثی کند [٥٠].

PEX. نشان داده شده است که PEX (دومین غیر کاتالیتیکی شبه-هموپکسینی انتهای کربوکسیلی MMP-2) از اتصال MMP-2 به اینتگرین $\alpha_v \beta_3$ جلوگیری می‌کند، بنابراین فعالیت پروتئولیتیکی آن را در سطوح سلولی مهار و رگزایی را مختل می‌کند [٥١].

فاکتور ٤ پلاکتی[7]. PF-4، پروتئین آزاد شده از گرانول‌های α پلاکتی طی تجمع پلاکتی است که دیده شده دارای خصوصیت خصوصیت ضدرگزایی *in vivo* و *in vitro* می‌باشد [٥٢].

---

[1] . Soluble Fms-like tyrosine kinase 1
[2] . placental growth factor
[3] . Interferons
[4] . Interleukins
[5] . 2-Methoxyestradiol
[6] . Pigment epithelium-derived factor
[7] . Platelet factor-4

قطعه پرولاکتین[1]. پرولاکتین دست نخورده (۲۳ کیلودالتونی) به طور آنزیماتیک در چندین بافت مختلف جهت تولید قطعات ۱۶ کیلودالتونی(16KPRL) و ۸ کیلودالتونی شکسته می‌شود [۵۳]. اگرچه پرولاکتین سالم فعالیت‌های پیش‌رگزایی دارد، اما قطعه 16KPRL فعالیت ضدرگزایی نهفته‌ای را نشان می‌دهد [۵۵،۵٤].

مهارکننده‌های بافتی ماتریکس متالوپروتئیناز[2]. مهارکننده‌های بافتی متالوپروتئینازهای ماتریکسی، تکثیر القاشده فاکتور رگزایی سلول اندوتلیال را در *in vitro* و *in vivo* و مستقل از مهار ماتریکس متالوپروتئینازهای ماتریکس، مهار می‌کنند [۵٦].

تروپونین I[3]. مهارکننده جدید رگزایی مشتق‌شده–غضروف،(Tn I) ، تکثیر سلول اندوتلیال را در سیستم‌های مدل *in vitro* و *in vivo* مهار می‌کند، همچنین Tn I متاستاز تومورهای متعددی را در *in vivo* مهار می‌کند [۵۷].

وازوستاتین[4]. مهارکننده قوی رگزایی است، که به طور انتخابی تکثیر سلول‌های اندوتلیال و رگزایی را در پاسخ به تحریک فاکتورهای رشد مهار می‌کند و رشد تومور را سرکوب می‌کند [۵۹،۵۸] .

۱-۳- رگزایی به عنوان یک هدف درمانی سرطان

عوامل شیمی درمانی[5] به طور اختصاصی سلول‌های توموری را هدف قرار نمی‌دهند، بلکه مانع تقسیم سلولی می‌شوند و یا آنزیم‌های درگیر در تکثیر سلولی یا متابولیسم را مهار می‌کنند.

بنابراین، این داروها تقسیم طبیعی سلول‌ها را برای بازسازی بافت‌هایی همچون مغزاستخوان، موکوس روده و فولیکول‌های مو را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهند. شیمی درمانی سرطان، محدودیت عدم ویژگی دارد در نتیجه نه تنها به سلول‌های سرطانی بلکه به سلول‌های طبیعی نیز آسیب می‌رساند. به منظور اجتناب از اثرات جانبی ایجاد شده در نتیجه سمیت به بافت‌های طبیعی، اغلب از دوزهای زیر نرمال عوامل شیمی درمانی سرطان استفاده می‌شود. نتیجه، اغلب ناکامل بودن پاسخ تومور و شکست احتمالی درمان، برگشت زود بیماری، مقاومت دارویی و متاستاز می‌باشد. با توجه به اثرات جانبی همراه با شیمی درمانی معمول، مزیت‌های زیادی در هدف قرار دادن سیستم رگی تومور وجود دارد، و تلاش‌های زیادی در جهت توسعه

[1] . Prolactin fragment
[2] . Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases
[3]. Troponin I
[4] . Vasostatin
[5] . Chemotherapeutic agents