

منت خدای عزوجل که طاعتش موجب قربت است و به سگرا نذرش

مزیذ نعمت هر نفسی که فرومی رود مدحیات است و چون برمی آید

مفرح ذات پس در هر نفسی دو نعمت موجود است و بر هر نعمت

شکری واجب

۵۰۵۵



دانشگاه علوم پزشکی تهران  
دانشکده داروسازی

پایان نامه :  
جهت دریافت دکترای عمومی داروسازی

موضوع :  
بررسی میزان بیان آنزیم iNOS در سلول Parent T47D و مقاوم به  
تاموکسیفن و بررسی اثر  $\beta$  - استرادیول در بیان این آنزیم و نقش  
احتمالی آن در مقاومت سلولی

اساتید راهنما :  
جناب آقای دکتر سید ناصر استاد  
جناب آقای دکتر محمد شریف زاده

استاد مشاور :  
جناب آقای دکتر ابراهیم عزیزی

نگارش :  
اندیشه منشی

۳ / ۱۶ / ۱۳۸۶

شماره پایان نامه : ۴۶۲۸

سال تحصیلی : ۸۵-۱۳۸۴

۹۰۵۶۴

تقدیم بہ

پدر و مادر عزیزم      یکا نہ ہمارا مان، ہمیشگی ام

خواہر و برادر احم      یاوران بی ریام

تقدیم به

دوستان خوبم      آفرینندگان خاطرات دوران دانشجویی ام

آموزگار کلاس پنجم دبستان سرکار خانم کشاورز

که نغمه خودباوری را در گوشم زمزمه کرد

و بیاد

آموزگار کلاس اول دبستان مرحومه خانم مباحثری

که به حق قلم در دست گرفتن را به من آموخت

روخسار

## فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۱	فصل اول : مقدمه
۲	۱- سرطان
۲	۱-۱- مقدمه
۲	۱-۲- سرطان پستان
۳	الف - مبانی مولکولی سرطان پستان
۴	۱-۳- درمان سرطان پستان
۴	الف - جراحی
۴	ب - پرتو درمانی
۵	ج - ژن درمانی

## فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۵.....	د - بهبود دهنده های پاسخ ایمنی .....
۵.....	هـ - شیمی درمانی .....
۶.....	ر - درمان Ablative .....
۶.....	ز - هورمون درمانی .....
۶.....	(۱) استروژن .....
۶.....	(۲) پروژستین ها .....
۷.....	(۳) آندروژن ها .....
۷.....	(۴) آنالوگ LHRH .....
۷.....	(۵) آنالوگ سوماتواستاتین .....
۸.....	(۶) کورتیکواستروئید ها .....
۸.....	(۷) آنتی پروژستین ها .....
۸.....	(۸) آنتی استروژن ها .....
۹.....	• تاموکسیفن .....
۱۵.....	(۹) مهار کننده های آروماتاز .....
۱۸.....	۱-۴- نیتریک اکساید .....
۱۸.....	۱-۴-۱- آنزیم های تولید کننده NO .....

## فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۱۹	۱-۴-۲- اثرات متفاوت NO در داخل بدن
۲۰	۱-۴-۳- نقش NO در التهاب
۲۰	۱-۴-۴- نقش NO در بیولوژی سرطان
۲۰	۱-۴-۵- اثرات متناقض NO در روند Apoptosis
۲۱	۱-۵-۵- مرگ برنامه ریزی شده سلولی (Apoptosis)
۲۲	۱-۵-۱- مورفولوژی Apoptosis
۲۲	۱-۵-۲- مکانیسم القای Apoptosis توسط NO در سلول های سرطانی
۲۳	۱-۵-۳- NO به عنوان مهار کننده Apoptosis
۲۳	۱-۵-۱-۳- مکانیسم مهار Apoptosis توسط NO در سلولهای سرطانی
۲۴	۱-۵-۴- عوامل موثر سلولی در تعیین نوع اثر NO
	۱-۵-۵- حضور نیتریک اکساید سنتاز ها و ارتباط آن با رسپتور استروژن در سلول های سرطانی
۲۵	سرطانی پستان
۲۶	۱-۶-۶- کلیات کشت سلول
۲۶	۱-۶-۱- مزایا و معایب کشت سلولی
۲۸	۱-۶-۲- آزمایشات رشد و سمیت سلولی

## فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۳۰	فصل دوم: مواد و روش کار
۳۱	۱-۲- خصوصیات فیزیکوشیمیایی استرادیول
۳۱	۲-۲- مواد لازم جهت کشت سلولی
۳۲	۳-۲- سایر مواد مورد استفاده
۳۲	۴-۲- رده سلولی
۳۳	۵-۲- دستگاه های مورد استفاده
۳۴	۶-۲- سایر وسایل مورد استفاده
۳۴	۷-۲- روش تحقیق
۳۴	۲-۷-۱- آماده سازی محلول ها
۳۴	۲-۷-۱-۱- آماده سازی محیط کشت
۳۶	• آماده سازی تاموکسیفن
۳۶	۲-۷-۱-۲- آماده سازی بافر فسفات سالین (PBS)
۳۷	۲-۷-۱-۳- آماده سازی تریپان بلو
۳۷	۲-۷-۱-۴- آماده سازی محلول 1X تریپسین - EDTA
۳۸	۲-۷-۱-۵- آماده سازی غلظتهای مختلف ۱۷-β - استرادیول
۳۹	۲-۷-۲- انتخاب ظرف کشت



## فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۴۰	۲-۷-۳- پاساژ سلولی
۴۳	۲-۷-۴- فریز کردن سلول
۴۵	۲-۷-۵- دفریز کردن
۴۶	۲-۷-۶- شمارش مستقیم سلول ها به روش Trypan Blue Dye Exclusion
۵۰	۲-۸-۸- آزمایشات انجام شده
	۲-۸-۱- رسم منحنی رشد و محاسبه زمان دو برابر شدن سلول های Parent T47D و Tam R-6
۵۰	۲-۸-۲- رنگ آمیزی سلول ها با هماتوکسیلین
۵۱	۲-۸-۳- ایمونوسیتوشیمی
۵۳	۲-۸-۳-۱- مواد و وسایل مورد نیاز جهت ایمونوسیتوشیمی
۵۴	۲-۸-۳-۲- روش انجام ایمونوسیتوشیمی
۵۵	۲-۸-۹- آنالیز تصاویر کامپیوتری به روش نیمه کمی
۵۹	۲-۱۰- آنالیز آماری
۶۰	۲-۱۱- آزمایش ایمونوسیتوشیمی به تشریح
۶۳	۲-۱۲- آزمایش شمارش سلولی به روش غیر مستقیم
۶۴	۲-۱۲-۱- شمارش غیر مستقیم با استفاده از MTT
۶۴	۲-۱۲-۱-۱- وسایل و مواد لازم جهت آزمایش MTT

## فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۶۵	۲-۱-۱۲-۲ آماده سازی محلول MTT
۶۵	۲-۱۲-۲ آزمایش MTT به تشریح
۶۷	۲-۱۳-۲ شمارش مستقیم با استفاده از Trypan Blue
۶۷	۲-۱۳-۱ وسایل و مواد لازم جهت آزمایش
۶۹	فصل سوم : نتایج
۷۰	۳-۱- زمان دو برابر شدن سلول Parent T47D و Tam R-6
	۳-۲- بررسی اثر $\beta$ - استرادیول بر بیان آنزیم iNOS در سلولهای Parent T47D و Tam R-6
۷۱	با استفاده از روش ایمنوسیتوشیمی
	۳-۲- نتایج ایمنوسیتوشیمی سلولهای Parent T47D و Tam R-6 به صورت نسبی و نیمه
۷۶	کمی با استفاده از نرم افزار OLYSIA BioReport
	۳-۴- بررسی اثر $\beta$ - استرادیول و تاموکسیفن ( $10^{-6}$ مولار) بر روی رشد سلولی با استفاده از
۷۷	روش MTT
	۳-۵- بررسی نسبت میزان بیان آنزیم iNOS به میزان Viability در سلولهای Parent T47D و
۷۹	Tam R-6 در غلظت های مختلف $\beta$ -۱۷- استرادیول

## فهرست مطالب

صفحه

عنوان

۳-۶- بررسی اثر غلظت  $M 10^{-8}$  از  $\beta$ -۱۷ - استرادیول بر سلولهای Parent T47D و Tam R-6

۷۹ ..... به روش شمارش مستقیم سلولی

۸۱ ..... فصل چهارم : بحث

۸۹ ..... فصل پنجم : منابع

## فهرست تصاویر

صفحه	عنوان
۲-۲	بررسی اثر $\beta$ - استرادیول بر بیان آنزیم iNOS در سلولهای Tam R-6 و Parent T47D
۷۱	با استفاده از روش ایمونوسیتوشیمی .....

## فهرست نمودار

۱-۳	زمان دو برابر شدن سلول Tam R-6 و Parent T47D .....
۳-۳	نتایج ایمونوسیتوشیمی سلولهای Tam R-6 و Parent T47D به صورت نسبی و نیمه
۷۶	کمی با استفاده از برنامه OLYSIA BioReport .....
۴-۳	بررسی اثر $\beta$ - استرادیول و تاموکسیفن ( $10^{-6}$ مولار) بر روی رشد سلولی با استفاده از
۷۶	روش MTT .....
۵-۳	بررسی نسبت میزان بیان آنزیم iNOS به میزان Viability در سلولهای Parent T47D و
۷۸	Tam R-6 در غلظت های مختلف $\beta$ -۱۷ - استرادیول .....
۶-۳	بررسی اثر غلظت $10^{-8}$ M از $\beta$ -۱۷ - استرادیول بر سلولهای Tam R-6 و Parent T47D
۷۹	به روش شمارش مستقیم سلولی .....

## چکیده

سرطان پستان از شایع ترین بدخیمی ها در زنان است و تاموکسیفن به عنوان یک آنتی استروژن غیراستروئیدی مدتهاست که در درمان این بدخیمی کاربرد دارد و در مواردی نیز مقاومت به این دارو گزارش شده است .

نیتریک اکساید یک رادیکال آزاد درون سلولی است که به کمک نیتریک اکساید سنتازهای ساختاری و القاپذیر از اکسیداسیون L-Arginine حاصل می شود .

افزایش NO سلول می تواند سبب القا یا مهار Apoptosis شود که خود نقش تعیین کننده ای در جهت تداوم بقای سلولی و یا برعکس می تواند داشته باشد . این اثر NO وابسته به نوع سلول و غلظت آن در محیط سلول می باشد . وجود سیستم NO و نقش آن در عملکرد استروژن در رده های مختلف سلول های سرطانی پستان گزارش شده است .

ما در این تحقیق اثر  $\beta$ -17 - استرادیول را به عنوان القاکننده یا مهارکننده احتمالی نیتریک اکساید سنتاز القاپذیر (iNOS) در رشد سلولهای سرطانی T47D و رده مقاوم به تاموکسیفن و نقش احتمالی آن در مقاومت را بررسی کرده ایم .

نتایج این مطالعه نشان داد که بیان آنزیم iNOS در سلول Parent T47D با افزایش غلظت استرادیول از  $10^{-12}$  تا  $10^{-8}$  مولار افزایش یافت . به طوریکه به میزان حداکثر خود در غلظت  $10^{-8}$  مولار رسید و متعاقباً منحنی پرولیفراسیون سلول سیر مشابهی طی کرده است . با ادامه افزایش غلظت از  $10^{-8}$  تا  $10^{-4}$  با کاهش بیان آنزیم iNOS مواجه شدیم که به دنبال آن پرولیفراسیون سلول نیز کاهش یافت . اما سیر کاهش موازی و متناسب با کاهش بیان آنزیم نبود در واقع در زمانی ثابت پرولیفراسیون با سرعت کمتری نسبت به بیان آنزیم کاهش یافت . این پدیده احتمالاً به دلیل کاهش تولید محصول iNOS یعنی رادیکال آزاد NO می باشد که به دنبال افزایش غلظت

استرادیول صورت می گیرد . NO برای سلول های Parent T47D توکسیک می باشد . در حالیکه در سلولهای مقاوم به دنبال افزایش بیان آنزیم و نهایتاً تولید NO با افزایش پرولیفراسیون سلول مواجهیم یعنی NO در سلول های مقاوم منجر به افزایش رشد و مقاومت سلول در محیط کشت حاوی دارو شده است . از آنجاییکه در مطالعات *in vivo* به کارگیری دوزهای فارماکولوژیک استروژن با سرکوب سرطان پستان غیرمقاوم و عدم پاسخ گویی سرطان پستان نوع مقاوم همراه بوده است این مطلب می تواند موید نقش متفاوت NO در پیشرفت و سرکوب سلول سرطانی باشد .

فصل اول

مقدمه