

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و
نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه
متعلق به دانشگاه رازی است.



دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست شناسی

گرایش سلولی - مولکولی

عنوان پایان نامه

**بررسی تأثیر عصاره گیاه چویل (*Ferulago Angulata*) بر روی تکثیر سلول
های سرطانی و القای آپوپتوز**

استاد راهنما:

دکتر حمید مهدیونی

استاد مشاور:

دکتر حسن اکرمی

نگارش:

شفق حیدری

شهریور ۱۳۹۰

تقدیم بہ پدر و مادر م، مہربان فرشتگانی کہ:

سخنات ناب باور بودن، لذت و غرور دانستن، جسارت خواستن، عظمت رسیدن و تمام تجربہ ہامی یکتا و زیبای

زندگیم، میون حضور سبز آنہاست.

چکیده

پیشینه و هدف تحقیق: چویل (*Ferulago Angulata*) گیاهی پایا به طول ۶۰ تا ۱۵۰ سانتی متر می‌باشد و در شرق ترکیه، شمال عراق و ایران پراکنش دارد. در کشورهای مختلف مطالعات متعددی جهت بررسی اثرات ضد سرطانی گیاهان بومی انجام گردیده و اثر ترکیبات گیاهی بر انواع رده‌های سلول‌های سرطانی مورد ارزیابی قرار گرفته است. هدف این تحقیق تشخیص خواص ضد سرطانی این گیاه از طریق بررسی تأثیر کشندگی و ضد تکثیری عصاره‌های برگ و گل گیاه چویل بر رده سلولی آدنوکارسینومای معده (AGS) و القای آپوپتوز در این سلول‌ها، می‌باشد.

روش تحقیق: گیاه چویل از کوه‌های شاهو و نواکوه در استان کرمانشاه، غرب ایران، جمع آوری شد. به منظور تعیین کشندگی غلظت‌های مختلف عصاره‌های اتانولی برگ و گل گیاه چویل بر روی رده سلولی AGS، از تست‌های تریپان بلو و نوترال رد استفاده شد. جهت ارزیابی وقوع آپوپتوز، تکنیک‌های تشخیص الگوی نردبانی DNA و بررسی میکروسکوپی و فلوسیتومتری رنگ آمیزی آنکسین-V نشان دار شده با فلورسین، مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج: نتایج تست‌های تریپان بلو و نوترال رد نشان داد عصاره چویل در رفتاری وابسته به غلظت و زمان سبب مرگ سلول‌های AGS می‌گردد ($t\text{-test}, P_{\text{value}} < 0.05$). بر اساس این نتایج، سلول‌های AGS به عصاره اتانولی برگ چویل (نسبت به گل) حساس تر می‌باشند ($\text{two-way ANOVA}, P_{\text{value}} < 0.05$). تأثیر عصاره اتانولی برگ و گل در بروز الگوی نردبانی DNA به صورت وابسته به غلظت بود به طوری که پس از گذشت زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت، در الکتروفورز ژل آگارز نمونه‌های تحت تیمار با غلظت‌های ۱۶۰، ۲۰۰ و ۲۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره گل چویل و در غلظت‌های ۱۲۰، ۱۶۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره برگ چویل، الگوی نردبانی DNA مشاهده شد. براساس نتایج رنگ آمیزی آنکسین-V نشان دار شده با فلورسین، در نمونه‌های تحت تیمار با غلظت‌های ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره گل و برگ بیشتر سلول‌ها در مراحل اولیه آپوپتوز قرار داشتند. در نمونه‌های تحت تیمار با غلظت‌های ۱۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره گل و برگ بیشتر سلول‌ها در مراحل انتهایی آپوپتوز قرار داشتند. همچنین براساس نتایج حاصل از فلوسیتومتری، در گروه‌های تحت تیمار با غلظت‌های ۸۰ و ۱۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی برگ و گل گیاه چویل، با افزایش غلظت عصاره افزایش قابل ملاحظه‌ای در میزان سلول‌های آپوپتوزی در مراحل اولیه و انتهایی در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. بحث: در این تحقیق برای نخستین بار تأثیرات قابل ملاحظه‌ی کشندگی و القای آپوپتوز توسط عصاره‌های اتانولی برگ و گل گیاه چویل بر روی رده سلولی AGS، گزارش شد. بنابراین، با توجه به اهمیت القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی، عصاره چویل گزینه مناسبی به عنوان ترکیب گیاهی با خواص بالقوه ضد سرطانی برای تحقیقات آتی می‌باشد. مطالعات بیش‌تری جهت شناسایی ترکیبات فعال و بررسی مکانیسم اثر عصاره بر مسیرهای سیگنالی آپوپتوز، مورد نیاز است.

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
	فصل اول: مقدمه
۲	۱-۱- بیماری سرطان
۳	۱-۱-۱- تومورزایی
۳	۱-۱-۲- متاستاز
۴	۱-۱-۳- روش های کنونی درمان سرطان
۴	۱-۲- آپتوز
۴	۱-۲-۱- بررسی تاریخی واژه "مرگ برنامه ریزی شده"
۵	۱-۲-۲- نقش آپتوز در اعمال بدن
۶	۱-۲-۳- عوامل کلیدی تنظیم مسیر سیگنالی آپتوز
۶	۱-۲-۳-۱- خانواده کاسپازها
۶	۱-۲-۳-۲- اعضای خانواده Bcl-2
۷	۱-۲-۴- مسیرهای سیگنالی آپتوزی
۷	۱-۲-۴-۱- مسیر خارجی آپتوز
۸	۱-۲-۴-۲- مسیر داخلی آپتوز
۹	۱-۲-۵- مراحل رویداد آپتوز
۹	۱-۲-۵-۱- فاز القایی آپتوز
۹	۱-۲-۵-۲- فاز تاثیر گذار آپتوز
۱۰	۱-۲-۵-۳- فاز تخریبی آپتوز
۱۰	۱-۲-۶- خصوصیات مورفولوژیکی آپتوز
۱۱	۱-۲-۷- تفاوت میان آپتوز و نکروز
۱۲	۱-۲-۸- نقش آپتوز در بروز بیماری
۱۲	۱-۳- روش های بررسی آپتوز
۱۲	۱-۳-۱- بررسی کشندگی
۱۳	۱-۳-۱-۱- بررسی کشندگی با تریپان بلو
۱۳	۱-۳-۱-۲- بررسی کشندگی با رنگ حیاتی نوترال رد
۱۳	۱-۳-۲- بررسی مورفولوژیکی
۱۴	۱-۳-۲-۱- رنگ آمیزی با آنکسین-V نشان دار شده فلورسین و PI
۱۵	۱-۳-۲-۲- فلوسیتومتری
۱۵	۱-۳-۳- بررسی مولکولی

۱۵.....	۱-۳-۳-۱- روش بررسی الگوی نردبانی DNA
۱۷.....	۴-۱- گیاهان به عنوان منبع داروهای ضد سرطانی
۱۸.....	۱-۴-۱- تاریخچه استفاده از گیاهان در درمان سرطان
۱۹.....	۲-۴-۱- القای آپوپتوز توسط ترکیبات ضد سرطانی با منشأ گیاهی
۲۰.....	۳-۴-۱- گیاه چویل
۲۱.....	۵-۱- سرطان معده
۲۱.....	۶-۱- اهداف پژوهش

فصل دوم: مواد و روش ها

۲۴.....	۱-۲- طرح کلی آزمایش
۲۵.....	۲-۲- فهرست دستگاهها و مواد استفاده شده
۲۷.....	۳-۲- روش تهیه محلول ها
۲۷.....	۱-۳-۲- روش تهیه محیط کشت RPMI 164
۲۷.....	۲-۳-۲- آنتی بیوتیک استرپتومایسین سولفات و پنی سیلین G
۲۷.....	۳-۳-۲- سرم جنین گاوی (FBS)
۲۸.....	۴-۳-۲- محلول ال-گلوتامین
۲۸.....	۵-۳-۲- محلول 0.25% EDTA Trypsin
۲۸.....	۶-۳-۲- طرز تهیه محلول تریپان بلو ۰/۴%
۲۸.....	۷-۳-۲- محلول نوترال رد ۱۰۰ X
۲۸.....	۸-۳-۲- محلول نوترال رد ۱X
۲۹.....	۹-۳-۲- محلول رنگ بر
۲۹.....	۱۰-۳-۲- محلول ذخیره اتیدیوم برماید
۲۹.....	۱۱-۳-۲- PBS (بدون Ca^{2+} و Mg^{2+})
۲۹.....	۱۲-۳-۲- بافر TAE (۱۰x)
۳۰.....	۱۳-۳-۲- تهیه محلول ذخیره از عصاره اتانولی برگ و گل گیاه چویل
۳۱.....	۴-۲- روش کار
۳۱.....	۱-۴-۲- کشت سلولهای رده AGS
۳۱.....	۲-۴-۲- تحویل سلول به صورت زنده
۳۲.....	۳-۴-۲- پاساژ و حفظ ذخیره سلولی

۳۲.....	۴-۴-۲- شمارش سلولی
۳۳.....	۵-۴-۲- ذخیره سلول ها به صورت منجمد
۳۳.....	۶-۴-۲- ذوب نمودن سلول های منجمد شده
۳۳.....	۵-۲- بررسی میزان زنده ماندن سلول ها با استفاده از رنگ آمیزی تریپان بلو
۳۴.....	۱-۵-۲- روش رنگ آمیزی تریپان بلو
۳۵.....	۶-۲- بررسی میزان زنده ماندن سلول ها با استفاده از رنگ آمیزی حیاتی نوترال رد (NR)
۳۵.....	۱-۶-۲- روش رنگ آمیزی حیاتی نوترال رد (NR)
۳۶.....	۷-۲- ارزیابی کیفی مرگ سلولی با استفاده از روش رنگ آمیزی آنکسین-فلورسین
	۱-۷-۲- روش رنگ آمیزی سلول های چسبنده با آنکسین V-فلورسین و PI با استفاده از کیت Annexin-V-Fluos Stainin kit
۳۶.....	
۳۷.....	۱-۱-۷-۲- روش تهیه محلول آنکسین V نشان دار شده فلورسین
۳۷.....	۸-۲- ارزیابی کمی مرگ سلولی با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری
۳۸.....	۹-۲- تشخیص مرگ سلولی با روش الگوی نردبانی DNA
۳۸.....	۱-۹-۲- تشخیص الگوی نردبانی DNA با استفاده از روش Ioanno
۳۹.....	۲-۹-۲- بررسی الگوی نردبانی DNA با استفاده از پروتکل Roch
۴۰.....	۱۰-۲- الکتروفورز DNA
۴۰.....	۱۱-۲- روش های آماری

فصل سوم: نتایج

۴۲.....	۱-۳- بررسی میزان مرگ سلولی با استفاده از روش تریپان بلو
	۱-۱-۳- بررسی معنی دار بودن یا عدم معنی داری میزان مرگ سلول های سرطانی تحت تیمار با غلظت های مختلف عصاره اتانولی برگ/گل گیاه چویل پس از انکوباسیون ۴۸/۲۴ ساعت نسبت به گروه کنترل
۴۲.....	۲-۱-۳- بررسی معنی دار بودن یا عدم معنی داری اختلاف میان میزان مرگ سلولی پس از انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعت
۴۴.....	۳-۱-۳- بررسی معنی دار بودن یا عدم معنی داری اختلاف میان میزان مرگ سلولی القا شده توسط عصاره اتانولی برگ و گل گیاه چویل
۴۴.....	
۴۵.....	۲-۳- بررسی میزان مرگ سلولی با استفاده از روش نوترال رد
	۲-۲-۳- بررسی معنی دار بودن یا عدم معنی داری میزان مرگ سلول های سرطانی تحت تیمار با غلظت های مختلف عصاره اتانولی برگ/گل گیاه چویل در پس از انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعت نسبت به گروه کنترل
۴۶.....	

۳-۲-۳- بررسی معنی دار بودن یا عدم معنی داری اختلاف میان میزان مرگ سلولی پس از انکوباسیون ۲۴	۴۸
و ۴۸ ساعت.....	۴۷
۳-۲-۴- بررسی معنی دار بودن یا عدم معنی داری اختلاف میان میزان مرگ سلولی القا شده توسط عصاره	۴۸
اتانولی برگ و گل گیاه چویل.....	۴۸
۳-۲-۵- بررسی معنی دار بودن یا عدم معنی داری اختلاف میان میزان مرگ سلولی محاسبه شده توسط	۴۹
روش تریپان بلو و نوترال رد.....	۴۹
۳-۳- تشخیص مرگ سلولی با روش الگوی نردبانی DNA.....	۵۰
۳-۳-۱- بررسی مرگ سلولی در سلول های تحت تیمار با عصاره اتانولی برگ گیاه چویل پس از ۲۴ ساعت و	۵۰
۴۸ ساعت توسط روش الگوی نردبانی DNA.....	۵۰
۳-۳-۲- بررسی مرگ سلولی در سلول های تحت تیمار با عصاره اتانولی گل گیاه چویل توسط روش الگوی	۵۲
نردبانی DNA.....	۵۲
۳-۴- ارزیابی کیفی مرگ سلولی با استفاده از روش رنگ آمیزی آنکسین V-فلورسین و PI.....	۵۴
۳-۴-۱- نتایج رنگ آمیزی آنکسین V-فلورسین و PI نمونه سلول های AGS کنترل.....	۵۴
۳-۴-۲- نتایج رنگ آمیزی آنکسین V-فلورسین و PI نمونه سلول های AGS تحت تیمار با DMSO یک	۵۴
درصد.....	۵۴
۳-۴-۳- نتایج رنگ آمیزی آنکسین V-فلورسین و PI نمونه سلول های AGS تحت تیمار با غلظت های ۴۰،	۵۷
۸۰، ۱۲۰ و ۱۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی برگ گیاه چویل پس از ۲۴ ساعت.....	۵۷
۳-۴-۴- نتایج رنگ آمیزی آنکسین V-فلورسین و PI نمونه سلول های AGS تحت تیمار با غلظت های ۴۰،	۶۱
۸۰، ۱۲۰ و ۱۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی گل گیاه چویل پس از ۲۴ ساعت.....	۶۱
۳-۵- ارزیابی کمی مرگ سلولی با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری.....	۶۵
۳-۵-۱- انجام فلوسیتومتری بر روی نمونه سلول های بدون تیمار کنترل منفی.....	۶۵
۳-۵-۲- انجام فلوسیتومتری بر روی نمونه سلول های سرطانی AGS تحت تیمار با DMSO با غلظت	۶۵
نهایی یک درصد، در زمان انکوباسیون ۲۴ ساعت.....	۶۵
۳-۵-۳- انجام فلوسیتومتری بر روی نمونه سلول های سرطانی AGS تحت تیمار با غلظت های ۸۰ و ۱۶۰	۶۵
میکروگرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی برگ گیاه چویل، پس از انکوباسیون ۲۴ ساعت.....	۶۵
۳-۵-۴- انجام فلوسیتومتری بر روی نمونه سلول های سرطانی AGS تحت تیمار با غلظت های ۸۰ و ۱۶۰	۶۸
میکروگرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی گل گیاه چویل، پس از انکوباسیون ۲۴ ساعت.....	۶۸

فصل چهارم: بحث

۷۱.....	۴-۱- تعیین کشندگی با روش های رنگ سنجی تریپان بلو و نوترال رد.....
۷۲.....	۴-۲- تشخیص مرگ سلولی با روش الگوی نردبانی DNA.....
۷۵.....	۴-۳- ارزیابی کیفی مرگ سلولی با استفاده از روش رنگ آمیزی آنکسین-V- فلورسین و PI.....
۷۸.....	۴-۴- ارزیابی کمی مرگ سلولی با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری.....
۷۹.....	۴-۵- نتیجه گیری و پیشنهادات برای تحقیقات آینده.....
۸۱.....	منابع.....

فهرست شکل ها

شکل	صفحه
شکل ۱-۱- مثال هایی از مرگ سلولی آپوپتوزی	۵.....
شکل ۲-۱- مسیر های سیگنالی آپوپتوز	۷.....
شکل ۳-۱- تفاوت میان سلول آپوپتوزی و سلول نکروزی	۱۱.....
شکل ۴-۱- گیاه <i>Ferulago angulata</i>	۲۱.....
شکل ۱-۲- رده سلولی AGS (عکس برداری توسط دوربین میکروسکوپ معکوس، بزرگنمایی $100\times$)	۳۱.....
شکل ۲-۲- نحوه شمارش سلولی بر روی لام نئوبار	۳۲.....
شکل ۱-۳- بررسی کشندگی با روش تریپان بلو	۴۳.....
شکل ۲-۳- مقایسه میان نتایج انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعت، آزمون تریپان بلو	۴۴.....
شکل ۳-۳- مقایسه میان نتایج عصاره گل و برگ، آزمون تریپان بلو	۴۵.....
شکل ۴-۳- بررسی کشندگی با روش نوترال رد	۴۶.....
شکل ۵-۳- مقایسه میان نتایج انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعت، آزمون نوترال رد	۴۷.....
شکل ۶-۳- مقایسه میان نتایج عصاره گل و برگ، آزمون نوترال رد	۴۸.....
شکل ۷-۳- مقایسه میان نتایج دو آزمون تریپان بلو و نوترال رد	۴۹.....
شکل ۳-۸- الف) نمایش قطعه قطعه شدن DNA سلول های AGS پس از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲ درصد در گروه های تحت تیمار با غلظت های ۱۶۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی برگ گیاه چویل پس از ۲۴ ساعت	۵۱.....
شکل ۳-۸- ب) نمایش قطعه قطعه شدن DNA سلول های AGS پس از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲ درصد در گروه های تحت تیمار با غلظت های ۸۰، ۱۲۰، ۱۶۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی برگ گیاه چویل پس از ۴۸ ساعت	۵۱.....
شکل ۳-۹- الف) نمایش قطعه قطعه شدن DNA سلول های AGS پس از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲ درصد در گروه های تحت تیمار با غلظت های ۲۰۰ و ۲۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی گل گیاه چویل پس از ۲۴ ساعت	۵۳.....
نمایش ۳-۹- ب) قطعه قطعه شدن DNA سلول های AGS پس از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲ درصد در گروه های تحت تیمار با غلظت های ۱۲۰، ۱۶۰، ۲۰۰ و ۲۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی گل گیاه چویل پس از ۴۸ ساعت	۵۳.....
شکل ۳-۱۰- سلول های AGS کنترل رنگ آمیزی شده توسط آنکسین V-فلورسین و PI	۵۵.....
شکل ۳-۱۱- سلول های AGS تحت تیمار با DMSO با غلظت نهایی یک درصد، پس از ۲۴ ساعت، رنگ آمیزی شده توسط آنکسین V-فلورسین و PI	۵۶.....

- شکل ۳-۱۲- سلول های AGS تحت تیمار با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی برگ گیاه چویل پس از ۲۴ ساعت، رنگ آمیزی شده توسط آنکسین V-فلورسین و PI.....۵۷
- شکل ۳-۱۳- سلول های AGS تحت تیمار با غلظت ۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی برگ گیاه چویل پس از ۲۴ ساعت، رنگ آمیزی شده توسط آنکسین V-فلورسین و PI.....۵۸
- شکل ۳-۱۴- سلول های AGS تحت تیمار با غلظت ۱۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی برگ گیاه چویل پس از ۲۴ ساعت، رنگ آمیزی شده توسط آنکسین V-فلورسین و PI.....۵۹
- شکل ۳-۱۵- سلول های AGS تحت تیمار با غلظت ۱۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی برگ گیاه چویل پس از ۲۴ ساعت، رنگ آمیزی شده توسط آنکسین V-فلورسین و PI.....۶۰
- شکل ۳-۱۶- سلول های AGS تحت تیمار با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی گل گیاه چویل پس از ۲۴ ساعت، رنگ آمیزی شده توسط آنکسین V-فلورسین و PI.....۶۱
- شکل ۳-۱۷- سلول های AGS تحت تیمار با غلظت ۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی گل گیاه چویل پس از ۲۴ ساعت، رنگ آمیزی شده توسط آنکسین V-فلورسین و PI.....۶۲
- شکل ۳-۱۸- الف و ب) سلول های AGS تحت تیمار با غلظت ۱۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی گل گیاه چویل پس از ۲۴ ساعت، رنگ آمیزی شده توسط آنکسین V-فلورسین و PI.....۶۳
- شکل ۳-۱۹- سلول های AGS تحت تیمار با غلظت ۱۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی گل گیاه چویل پس از ۲۴ ساعت، رنگ آمیزی شده توسط آنکسین V-فلورسین و PI.....۶۴
- شکل ۳-۲۰- آنالیز فلوسیتومتری سلول های سرطانی AGS، رنگ آمیزی شده توسط آنکسین V-فلورسین و PI. (عصاره اتانولی برگ چویل).....۶۷
- شکل ۳-۲۱- آنالیز فلوسیتومتری سلول های سرطانی AGS، رنگ آمیزی شده توسط آنکسین V-فلورسین و PI. (عصاره اتانولی گل چویل).....۶۹
- شکل ۴-۱- الکتروفورز ژل آگارز DNA سویه های مختلف MCF7 پس از القای آپوپتوز توسط doxorubicin در مدت زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت.....۷۴

فهرست جدول ها

صفحه	جدول
۲۵.....	جدول ۱-۲- فهرست دستگاه ها.....
۲۶.....	جدول ۲-۲- فهرست کلی مواد.....
۲۹.....	جدول ۳-۲- مواد مورد نیاز جهت تهیه PBS.....
۳۰.....	جدول ۴-۲- مواد مورد نیاز جهت تهیه بافر TAE (10x).....

فصل اول

مقدمه

۱- مقدمه

۱-۱- بیماری سرطان

طبق گزارش سازمان جهانی بهداشت در سال ۲۰۰۸، سالانه بیش از ۷/۵ میلیون نفر در سراسر جهان به علت ابتلا به سرطان می‌میرند. در اروپا تخمین زده می‌شود که سالانه ۳/۲ میلیون مورد جدید و ۱/۷ میلیون مرگ به علت سرطان رخ دهد (Ferlay et al., 2007). در حالیکه در گذشته سرطان بیماری بود که بیشتر در کشورهای توسعه یافته رخ می‌داد، اما امروزه بعد از بیماری‌های قلبی-عروقی، سرطان دومین عامل مهم مرگ و میر در سراسر جهان می‌باشد (Kaur et al., 2011).

تومورزایی توسط انواعی از کارسینوژن‌ها (مواد سرطان‌زا) القا می‌شود که منجر به تشکیل و پیشروی سرطان می‌گردند. از جمله کارسینوژن‌های محیطی می‌توان دود سیگار، استرس، آلوده کننده‌ها و ضایعات صنعتی، بخارات گازولین، سموم و آفت کش‌ها را نام برد (Thompson, 1995).

سرطان بیماری است که حدود ۲۰۰ نوع سلولی را تحت تاثیر قرار می‌دهد، تومورزایی^۱ روند چند مرحله‌ای است که با تغییر شکل سلولی آغاز و با افزایش تکثیر سلولی، کسب حداکثر پتانسیل تهاجمی و پتانسیل رگ‌زایی و وقوع متاستاز ادامه می‌یابد. تشکیل رگ‌های خونی جدید از رگ‌های موجود، آنژیوژنز یا رگ‌زایی نامیده می‌شود. وقوع رگ‌زایی برای پیشروی تومور و انجام متاستاز ضروری است (Hahn & Weinberg., 2002).

سرطان یک بیماری ژنتیکی است که با رشد سلولی غیر قابل کنترل و در نبود تنظیم چرخه سلولی رخ می‌دهد. تنظیم نادرست چرخه سلولی می‌تواند در نتیجه آسیب به DNA ایجاد شود. در شرایط فیزیولوژیکی طبیعی، رشد کنترل نشده سلول‌های آسیب دیده توسط مکانیسم آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی) خنثی می‌شود. اما اگر این سلول‌ها از دست مکانیسم تنظیمی آپوپتوز فرار کنند (برای مثال از طریق وقوع جهش در ژن‌های دخیل در بروز آپوپتوز)، می‌توانند سبب ایجاد تومور شوند (Thompson., 1995).

¹. carcinogenesis

۱-۱-۱-۱-تومورزایی

به طور کلی روند توسعه تومور شامل سه فاز می باشد. فاز آغازی^۱، فاز ترویج^۲ و فاز پیشرفت^۳ فاز آغازی سریع (بازه زمانی چند ساعت تا چند روز) و برگشت‌ناپذیر می باشد. این مرحله زمانی رخ می دهد که ماده سرطان زا سبب ایجاد آسیب غیر قابل تعمیر یا با تعمیر نادرست در DNA سلول طبیعی و ایجاد جهش سوماتیک شود. آسیب DNA به خودی خود جهش زا^۴ نمی باشد، مگر اینکه سلولی که دچار جهش سوماتیک شده است از طریق میتوز سبب ایجاد کلونی از سلول های جهش یافته شود. فاز ترویج روندی طولانی مدت است و احتیاج به سال ها یا دهه ها برای انتشار دارد. طی این فاز سلول های جهش یافته سبب ایجاد نواحی پیش بدخیم پر سلولی می شوند که از لحاظ تکثیر بسیار فعال می باشند.

فاز پیشرفت یک رخداد غیر قابل برگشت دیگر می باشد که در زمانی بسیار کوتاه شاید در کمتر از یک سال رخ می دهد. طی این فاز کلونی های سرطانی جدید با قابلیت تکثیر و تهاجم بسیار بالا تشکیل می شوند که در نهایت سبب وقوع متاستاز می گردند (Surh., 1999).

از آنجائیکه فاز اول و فاز سوم توسعه تومور غیر قابل برگشت و نسبتاً سریع رخ می دهند، فاز ترویج تومور احتمالاً بهترین هدف برای انجام راهکارهای پیشگیری و درمان سرطان می باشد (Sporn., 1976; Umar *et al.*, 2001).

۱-۱-۲-متاستاز

متاستاز و بدخیمی روندی چند مرحله‌ای است که طی آن سلول‌های سرطانی به سایر نقاط بدن مهاجرت می‌کنند. اکثر مرگ و میر مرتبط با سرطان به علت متاستاز تومور اولیه رخ می‌دهد. طی این روند، سلول های تومور اولیه برای کسب حداکثر قابلیت تهاجمی، دستخوش تغییرات ژنتیکی (بیان آنکوژن ها و مهار بیان ژن های سرکوب کننده تومور از جمله کاهش بیان پروتئین E-cadherin و افزایش بیان پروتئین N-cadherin)، تغییرات مورفولوژیکی و مولکولی (تغییر در اتصالات چسبندگی سلول به سلول و سلول به ماتریکس خارج سلولی)، می‌شوند (Sleman & Steeg., 2010; Steeg., 2003). در نتیجه این تغییرات، سلول های تومور اولیه با تخریب پروتئین های غشای پایه از محل اولیه خود جدا می‌گردند. این سلول ها سپس از طریق عروق خونی یا عروق لنفی، خود را به سایر اندام ها و بافت های بدن می‌رسانند و در بستر مویرگی این اندام ها پخش می‌شوند. سپس با اتصال به سلول های اندوتلیال مویرگ از جریان خون یا جریان لنف خارج می‌شوند و در بافت جدید نشست می‌کنند. سلول های متاستازی در بافت های جدید با افزایش

¹ . initiation phase

² . promotion phase

³ . progression phase

⁴ . mutagenic

تکثیر، تهاجم، بقا، رشد سریع و رگ زایی در نهایت تمامی بدن بیمار را درگیر می نمایند (Chambers *et al.*, 2002; Kopfstein & Christofori., 2006)

۱-۱-۳- روش های کنونی درمان سرطان

هم اکنون راهکار هایی نظیر رادیوتراپی، داروهای شیمی درمانی استاندارد و جراحی برای درمان سرطان به کار می روند. رادیوتراپی و استفاده از داروهای شیمی درمانی استاندارد، برخی از سلول های سرطانی را از طریق القای آپوپتوز از بین می برند. در شیمی درمانی از مواد شیمیایی خاصی استفاده می شود. این مواد قادر به تخریب سلول سرطانی و جلوگیری از رشد و پخش شدن آنها می باشند (Iajimi *et al.*, 2010). اما شیمی درمانی می تواند سبب کاهش رشد یا تخریب سلول های طبیعی بدن بیمار از جمله سلول های مو، دهان، سلول های دستگاه گوارش و سلول های خونی شود. متأسفانه اکثریت سرطان های انسانی به رادیوتراپی و داروهای شیمی درمانی مقاومت نشان می دهند (Gralla *et al.*, 2005).

۱-۲- آپوپتوز

در بدن انسان در هر ثانیه ۱۰۰۰۰۰ سلول طی میتوز تولید می شود و در همین زمان همین مقدار سلول از طریق فرایند آپوپتوز می میرد. این امر سبب حفظ همئوستازی بافتی ارگانیزم بالغ می شود، به این معنا که تعداد کل سلول ها در یک فرد بالغ ثابت است (Vaux and Korsmeyer., 1999). آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده سلولی^۱ احتمالاً مهم ترین سد دفاعی بدن در برابر سرطان می باشد. روند آپوپتوز در جانوران پر سلولی برای حذف سلول های زیان آور و آسیب رسان به کار می رود. روند کارسینوژنز علیه آپوپتوز عمل می کند و سبب آغاز، پیشروی و دائمی شدن فنوتیپ بدخیم می شود (Kaufmann & Gores., 2000; Sun *et al.*, 2004).

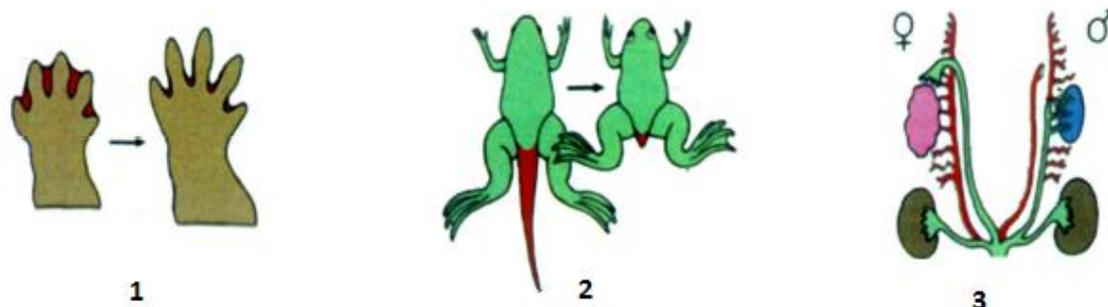
۱-۲-۱- بررسی تاریخی واژه "مرگ برنامه ریزی شده"

واژه "مرگ برنامه ریزی شده" برای اولین بار در سال ۱۹۶۴ توسط Lockshin ارائه شد. براساس نظریه وی در طول تکوین^۲، مرگ سلولی رخ می دهد که یک رخداد تصادفی نیست، بلکه مجموعه ای از اتفاقات کنترل شده می باشد. در سال ۱۹۵۱، Gluckmann برای اولین بار از روندی به نام روند آپوپتوتیک صحبت نمود (Gewies., 2003).

در نهایت در سال ۱۹۷۲، Kerr و همکاران واژه آپوپتوزیس را برای بیان شکلی از مرگ سلولی با خصوصیات مورفولوژیکی خاص و متمایز از نکروز ارائه نمودند (Kerr *et al.*, 1972). در دهه های ۷۰ و

^۱ . programmed cell death
^۲ . development

۸۰ میلادی مطالعات نشان داد نه تنها روند آپوپتوز دارای خصوصیات مورفولوژیکی خاصی است، بلکه یک روند برنامه ریزی شده در سطح ژنتیکی می باشد (Hengartner., 1997).



شکل ۱-۱: مثال هایی از مرگ سلولی آپوپتوزی (۱: از بین رفتن پرده بین انگشتان در دوران جنینی. ۲: از بین رفتن دم در قورباغه بالغ طی فرایند دگردیسی. ۳: تشکیل اندام های جنسی). (Gewies., 2003).

۱-۲-۲- نقش آپوپتوز در اعمال بدن

آپوپتوز رایج ترین و شناخته شده ترین نوع مرگ برنامه ریزی شده سلولی می باشد. واژه آپوپتوز منشا یونانی دارد، به معنای "falling off or dropping off" مانند افتادن برگ از درخت یا گلبرگ از گل. به این معنا که مرگ نیز مانند تولد بخش ضروری و جدایی ناپذیر از حیات موجود زنده را تشکیل می دهد (Leist & Jäättelä., 2001). آپوپتوز خودکشی فیزیولوژیک سلول است که در تکوین، تمایز یابی (تکامل اندام های جنسی، تکامل مغز)، حفظ همئوستازی بافتی در دوران جنینی، رویانی و بلوغ، تنظیم فعالیت سیستم ایمنی، حذف بافت ها و اندام های موقتی و بقایای فیلوژنتیکی و در حذف سلول های آسیب رسان و مضر نقش دارد. این فرآیند در پستانداران، حشرات، نماتودها و حتی گیاهان رخ می دهد (شکل ۱-۱).

آپوپتوز به دلایل مختلف رخ می دهد. فعال شدن محرک های مختلفی در داخل یا خارج سلول در این روند نقش دارد، که از آن جمله می توان به موارد زیر اشاره نمود: اتصال لیگاند به گیرنده مرگ سطح سلولی، آسیب DNA و تعمیر نشدن آن، درمان با داروهای سیتوتوکسیک، پرتودرمانی، نبود سیگنال های بقا، اختلال در روند تنظیم چرخه سلولی و فعال شدن سیگنال های مرگ (Gewies., 2003).

۱-۲-۳- عوامل کلیدی تنظیم مسیر سیگنالی آپوپتوز

آپوپتوز در دو مسیر اصلی رخ می دهد، مسیر خارجی و مسیر داخلی (مسیر میتو کندریایی)، در این دو مسیر اعضای خانواده های پروتئینی کاسپازها و خانواده Bcl-2، نقش اساسی به عهده دارند.

۱-۲-۳-۱- خانواده کاسپازها

تعداد زیادی از خانواده های پروتئازها در روند آپوپتوز نقش دارند، مهم ترین آنها کاسپاز^۱ها می باشند. کاسپازها یک خانواده از سیستمین پروتئازها هستند، شامل کاسپازهای آغازگر بالادست (کاسپازهای ۲، ۸، ۹، ۱۰) و کاسپازهای اجرایی پایین دست (کاسپازهای ۳، ۶، ۷) (Chang et al., 2003). در روند آپوپتوز، فعال شدن آبشار کاسپازی در نهایت سبب برش پروتئولیتیک بسیاری از پروتئین های سیتوپلاسمی و هسته ای می شود. از جمله این پروتئین ها، پروتئین های اسکلت سلولی می باشند، برش پروتئین های دخیل در اتصالات سلول به سلول و سلول به ماتریکس سبب بروز تغییرات مورفولوژیک و جدا شدن سلول از بافت پایه می شود. برش خوردن لامین های هسته ای A و B توسط کاسپازها، سبب عدم بازآرایی لامین های هسته ای و به هم ریختن ساختار پوشش هسته ای در طی آپوپتوز می شود. کاسپازها سبب فعال شدن اندونوکلازها و قطعه قطعه شدن DNA بین نوکلئوزومی می شوند. هم اکنون مشخص شده کاسپازها حتی در انتقال فسفاتیدیل سرین از نیمه داخلی غشا پلاسمایی به نیمه خارجی نیز نقش دارند، که این امر سبب شناسایی سلول آپوپتوتیک توسط فاگوسیت ها می گردد (Saraste & Pulkki., 2000).

۱-۲-۳-۲- اعضای خانواده Bcl-2

در مسیر میتو کندریایی، پروتئین های اعضای خانواده Bcl-2 نقش مرکزی را به عهده دارند. این خانواده بر اساس عملکرد به دو گروه تقسیم می شود:

پروتئین های مهار کننده آپوپتوز، شامل: Bcl-2, BclXL, Bcl-w, Mcl-1, Bfl-1^۲

پروتئین های پیش برنده آپوپتوز که از نظر ساختاری به دو گروه تقسیم می شوند:

اعضای چند دمینی^۳، شامل: Bak^۵, Bax^۶, Bcl-r, Mtd

اعضای دارای دمین BH3^۴، شامل: Bid, Hrk, Bik, Bim, Bad (youle & strasser., 2008)

^۱ . cysteine-dependent aspartate-specific proteases

^۲ . B-cell lymphoma 2

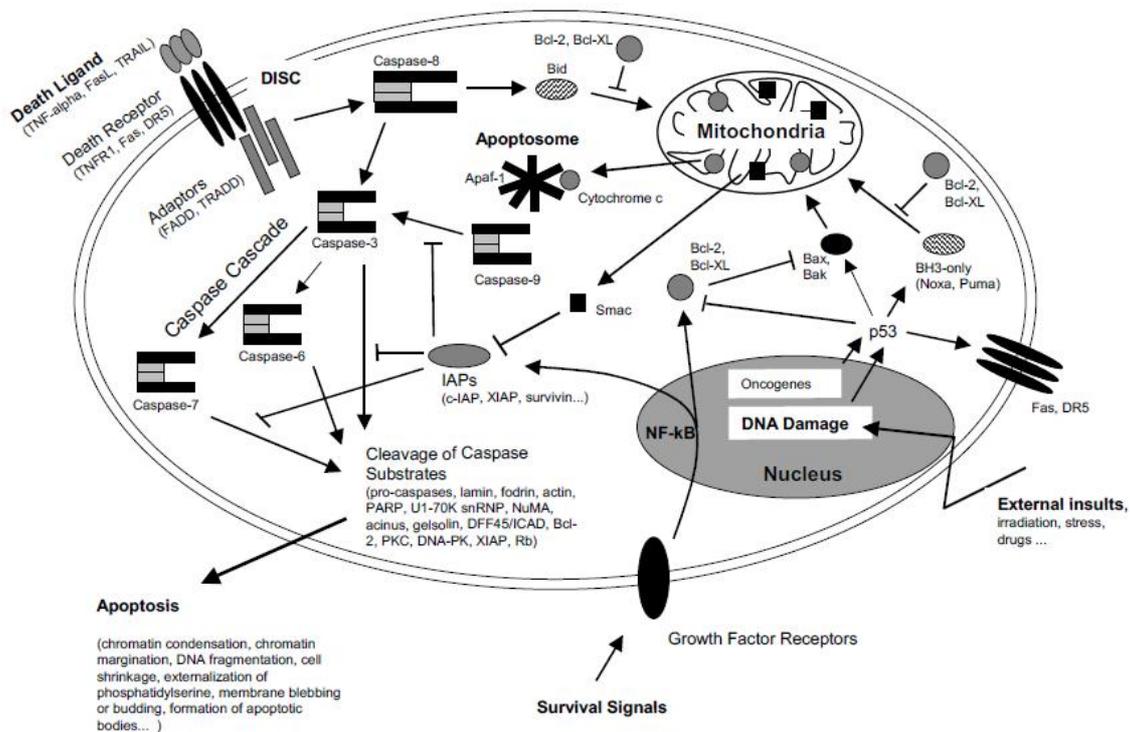
^۳ . multidomain members

^۴ . Bcl-2-associated X protein

^۵ . Bcl-2 antagonist/killer

^۶ . BH3-only members

^۷ . BH3 interacting domain death agonist



شکل ۱-۲: مسیر های سیگنالی آپوتوز (Gewies., 2003)

۱-۲-۴- مسیرهای سیگنالی آپوتوزی

آپوتوز در دو مسیر اصلی رخ می دهد: مسیر خارجی^۱ و مسیر داخلی^۲ (شکل ۱-۲). مسیر خارجی با فعال شدن گیرنده های مرگ سطح سلولی آغاز می گردد. مسیر داخلی، همراه با افزایش نفوذپذیری غشا میتوکندری و خروج سیتوکروم c می باشد (Hu & Kavanagh., 2003).

۱-۲-۴-۱- مسیر خارجی آپوتوز

این مسیر با فعال شدن "گیرنده های مرگ"^۳ که جزء گیرنده های مرگ سطح سلولی می باشند، آغاز می شود. گیرنده های مرگ متعلق به اعضای ابر خانواده ی ژنی گیرنده فاکتور نکروز دهنده تومور (TNFR)^۴ می باشند. این گیرنده ها شامل TNFR-1، Fas/CD95 و گیرنده های TRAIL شامل DR4 و DR5 هستند (Ashkenazi., 2002). ویژگی این خانواده وجود توالی غنی از سیستمین در

^۱ . extrinsic apoptosis pathways
^۲ . Intrinsic apoptosis pathways
^۳ . death receptors
^۴ . tumor necrosis factor receptor