بسم الله
الرحمن الرحیم

دانشگاه تربیت مدرس

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

خانم فرانک فلاحیان رشته بیوشیمی بالینی رساله دکتری خود را با عنوان: « بررسی نقش eGMP در القاء تکثیر / آپوپتوز از طریق PKG و تعیین الگوی بیان ایزوفرمهای آن در دو رده سلولی سرطان سینه، MCF-7 و MDA-MB468 » در تاریخ ۱۳۹۰/۶/۲۶ ارائه کردند.

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	دکتر سیامک سلامی	
استاد ناظر	دکتر محمد تقی خانی	
استادناظر	دکتر محمدجواد رسایی	
استاد ناظر	دکتر علی رحیم‌پور	
استاد ناظر	دکتر پروین پاسالار	
نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر سید 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 آئین‌نامه‌های 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 ۵- این آیین‌نامه در ۵ 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 **فرانک فلاحیان** دانشجوی رشته **بیوشیمی بالینی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۵** مقطع **دکتری** دانشکده **علوم پزشکی** 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

۹۰/۷/۱

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 **۱۳۹۰** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر کرمی تهرانی** ، مشاوره **دکتر سلامی** 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 ٥ : 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 **فرانک فلاحیان** دانشجوی رشته **بیوشیمی بالینی** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی فرانک فلاحیان

تاریخ و امضا

۹۰/۷/۱

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

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

عنوان

بررسی نقش cGMP در القاء تکثیر/ آپوپتوز از طریق PKG و تعیین الگوی بیان ایزوفرم های آن در دو رده سلولی سرطان سینه،MCF-7 و MDA-MB-468

نگارش

فرانک فلاحیان

استاد راهنما

دکتر فاطمه کرمی تهرانی

استاد مشاور

دکتر سیامک سلامی

تابستان ۱۳۹۰

چکیده

اخیرا فعالسازی PKG توسط cGMP بعنوان یک مکانیسم مولکولی جدید برای القا آپوپتوز در سلولهای سرطانی مورد توجه قرار گرفته است بر این اساس تحقیق حاضر به منظور بررسی نقش مسیر cGMP/PKG در مهار رشد و القاء آپوپتوز در سلول های سرطان پستان، MCF-7 و MDA-MB-468 طراحی گردید. تیمار سلول ها با YC-1 (فعال کننده گوانیلیل سیکلاز محلول) موجب مهار رشد سلولی و القاء آپوپتوز در آن ها گردید. نقش مسیر cGMP/PKG در مهار رشد سلولی با اندازه گیری میزان cGMP درون سلولی و استفاده از مهار کننده پروتئین کیناز G (KT5823) تایید گردید. در این تحقیق همچنین الگوی بیان ایزوفرم های PKG با استفاده از RT-PCR تعیین گردید. نتایج نشان داد که هر سه ایزوفرم PKG در هر دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-468 بیان می شوند. سپس به منظور بررسی نقش ایزوفرم های PKG در مهار رشد سلولی، از فعال کننده ها و مهار کننده های ایزوفرم های PKG استفاده گردید. نتایج بدست آمده نشان داد که تیمار سلول ها با فعال کننده ایزوفرم PKGIβ موجب مهار رشد و القاء آپوپتوز می گردد. نتیجه بدست آمده با استفاده از مهار کننده های ایزوفرم های PKG مورد تایید قرار گرفت. در این تحقیق به منظور بررسی آپوپتوز از تکنیک های فلوسایتومتری(رنگ آمیزی دوگانه سلول ها با Annexin V-FITC/PI)، رنگ آمیزی سلول ها با هوخست ۳۳۲۵۸ ، آنالیز سیکل سلولی و اندازه گیری فعالیت کاسپازهای ۳و ۹ استفاده گردید. در رده سلولی MDA-MB-468 افزایش فعالت کاسپاز-۳ و -۹ در اثر فعالسازی مسیر cGMP/PKG مشاهده گردید در حالی که در رده MCF-7 تنها افزایش فعالیت کاسپاز-۹ مشاهده شد. افزایش فعالیت کاسپاز-۹ در هر دو رده سلولی پیشنهاد کننده مسیر میتوکندریایی آپوپتوز می باشد

پژوهش حاضر اولین گزارشی است که در مورد نقش PKGIβ در تنظیم رشد و القاء آپوپتوز در سلول های سرطان پستان انسانی MCF-7 و MDA-MB-468 ارائه گردیده است.

واژه های کلیدی: CGMP ، پروتئین کیناز G ، سلو ل های سرطان پستان انسانی، آپوپتوز

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱- سرطان پستان ۲

۱-۱-۱- انواع سرطان پستان ۲

۱-۱-۲- مرحله‌بندی سرطان پستان ۲

۱-۱-۳- درجه بافت شناسی سرطان پستان ۳

۱-۱-٤- عوامل افزایش‌دهنده احتمال بروز سرطان پستان ۳

۱-۱- ٥- تشخیص سرطان پستان ٤

۱-۱-٦- روشهای درمان سرطان سینه ٥

۱-۲-Cyclic GMP ٦

۱-۲-۱- سنتز cGMP توسط آنزیم های گوانیلیل سیکلاز ٦

۱-۲-۱-۱- گوانیلیل سیکلازهای متصل به غشاء ٦

۱-۲-۱-۲-گوانیلیل سیکلازهای محلول ۸

۱-۲-۱-۲-۱- ساختار دمین های گوانیلیل سیکلازهای محلول ۸

۱-۲-۱-۲-۲- تنظیم گوانیلیل سیکلازهای محلول توسط لیگاندها ۹

۱-۲-۲- cGMP و سیگنالینگ سلولی ۱۰

۱-۲-۲-۱- پروتئین کینازهای وابسته به cGMP ۱۱

۱-۲-۲-۲- کانال های دریچه دار وابسته به نوکلئوتید های حلقوی ۱۱

۱-۲-۲-۳- فسفودی استرازهای تنظیم شونده توسط cGMP ۱۲

۱-۲-۳- cyclic GMP و فیزیولوژی سلولی ۱۳

۱-۲-۳- ۱-تحرک عضلات صاف رگی ۱۳

۱-۲-۳-۲- هموستاز الکترولیت ها و مایعات در روده ۱٤

۱-۲-۲-۳- انتقال نور ۱۶
۱-۳- پروتئین کینازهای وابسته به cGMP ۱۷
۱-۳-۱- ساختار ۱۷
۱-۳-۲- سوبستراهای PKG ۱۸
۱-۳-۳- مسیرسیگنالینگ PKG ۲۰
۱-۳-٤- بیان PKG در سلول های توموری ۲۱
۱-۳-۵- اثرات آنتی توموری cGMP و پروتئین کیناز G در سلول های سرطانی ۲۱
۱-۳-٦- مهار مسیر سیگنالینگ β-catenin/ T- cell factor توسط PKG در سلول های سرطانی ۲۲
۱-۳-۷- نقش PKG در پیشگیری از تشکیل تومور ۲۳
۱-۳-۸- نقش PKG در Anoikis ۲۳
۱-۳-۹- نقش PKG در مهار اتصالی ۲٤
۱-۳- ۱۰- اثرات آنتی توموری PKG در *in vivo* ۲۵
۱-۳-۱۱- PKG بعنوان یک هدف درمانی ۲٦
۱-٤- آنالوگ های cGMP بعنوان ابزار بیوشیمیایی ۲۸
۱-۵- انواع مرگ سلولی ۳۱
۱-۵-۱-ویژگی های مورفولوژیکی آپوپتوز ۳۳
۱-۵-۲- پروتئین های دخیل در آپوپتوز ۳٤
۱-۵-۲-۱-کاسپازها ۳٤
۱-۵-۳- مسیرهای آپوپتوزی ۳٤
۱-۵-۳-۱- مسیر خارجی ۳٤
۱-۵-۳-۲- مسیر داخلی ۳۵
۱-۵-۳-۳- ارتباط مسیر داخلی با مسیر خارجی یا مسیر مشترک ۳۵

۱-۵-٤- آپوپتوز در درمان سرطان ۳۵
۱-٦- فرضیه‌ها، اهداف و سیر منطقی تحقیق ۳٦
۱-٦-۱- فرضیه ها ۳۷
۱-٦-۲- اهداف ۳۷
فصل دوم: مواد و روش ها ۳۸
۲-۱- کشت سلولی و تثبیت آن ۳۹
۲-۱-۱- تجهیزات و دستگاه های مورد نیاز ۳۹
۲-۱-۲- مواد و وسایل مورد نیاز ۳۹
۲-۱-۳- تهیه محیط کشت و محلول های مورد نیاز ٤۰
۲-۱-٤- رده های سلولی مورد بررسی ٤۰
۲-۱-٤-۱- رده سلولی MCF-7 ..... ٤۰
۲-۱-٤-۲- رده سلولی MDA-MB-468 ..... ٤۱
۲-۱-۵- شریط کشت و نگهداری رده های سلولی ٤۱
۲-۱-٦- پاساژ سلول ها ٤۱
۲-۱-۷- شمارش سلولی ٤۲
۲-۱-۸- انجماد و نگهداری سلول ها ٤۲
۲-۱-۸- ۱- کشت سلول های فریز شده ٤۲
۲-۲- سنجش بیان ژن ایزوفرم های PKG (PKGIα ، PKGIβ و PKGII ٤۳
۲-۲-۱- استخراج RNA ٤۳
۲-۲-۲- سنتز cDNA ٤۳
۲-۲-۳- انتخاب پرایمر برای ایزوفرم های پروتئین کینازG ٤٤
۲-۲-٤- تکنیک RT-PCR ٤۵
۲-۲-۵- الکتروفورز ژل آگارز ٤٦

۲-۲-۵-۱- مواد و بافرهای مورد نیاز..... ٤٦
۲-۲-۵-۲- روش کار..... ٤٦
۲-۳- تیمار سلول ها..... ٤٧
۲-۳-۱- مواد و وسایل مورد نیاز..... ٤٧
۲-۳-۲- تیمار سلول ها با ترکیبات مورد نظر..... ٤٧
۲-٤- بررسی سیتوتوکسیسیتی با استفاده از روش MTT..... ٤٨
۲-٤-۱- مواد و وسایل مورد نیاز..... ٤٨
۲-٤-۲- اصول روش..... ٤٨
۲-٤-۳- روش کار..... ٤٨
۲-۵- اندازه گیری میزان cGMP در سلول ها..... ٤٩
۲-۵-۱- مواد مورد نیاز..... ٤٩
۲-۵-۲- اساس روش..... ٤٩
۲-۵-۳- روش کار..... ۵۰
۲-٦- بررسی آپوپتوز با فلوسایتومتری..... ۵۰
۲-٦-۱- اساس روش..... ۵۰
۲-٦-۲- مواد و دستگاه های مورد نیاز..... ۵۱
۲-٦-۳- روش کار..... ۵۲
۲-۷- رنگ‌آمیزی سلول‌ها با Annexin V/PI و بررسی با میکروسکوپ فلورسنت..... ۵۳
۲-۷-۱- مواد و لوازم لازم مورد نیاز..... ۵۳
۲-۷-۲- روش کار..... ۵۳
۲-۸- بررسی سیکل سلولی با استفاده از فلوسایتومتری..... ۵۳
۲-۸-۱- مواد، وسایل و دستگاه های مورد نیاز..... ۵۳
۲-۸-۲- اساس روش..... ۵٤

۲-۸-۳- روش کار ٥٤
۲-۹- بررسی مورفولوژی هسته سلول های آپوپتوزی با استفاده از رنگ هوخست ۳۳۲۵۸ ..... ٥٥
۲-۹-۱- مواد و وسایل مورد نیاز ٥٥
۲-۹-۲- روش کار ٥٥
۲-۱۰- سنجش فعالیت کاسپاز- ۳ ..... ٥٦
۲-۱۰-۱- اساس روش ٥٦
۲-۱۰-۲- مواد مورد نیاز ٥٦
۲-۱۰-۳- روش کار ٥٦
۲-۱۱- اندازه گیری فعالیت کاسپاز-۹ ..... ٥٨
۲-۱۱-۱- روش کار ٥٨
فصل سوم: نتایج و یافته ها ٦٠
۳-۱- بررسی الگوی بیان ایزوفرم های پروتئین کیناز G با استفاده از RT-PCR در رده های سلولی سرطان پستان (MCF-7 و MDA-MB-468) ٦١
۳-۱-۱- نتایج حاصل از RT-PCR در رده سلولی MCF-7 ..... ٦١
۳-۱-۲- نتایج حاصل از RT-PCR در رده سلولی MCF-7 ..... ٦٢
۳-۲- بررسی اثرات YC-1 بروی رده های سلولی سرطان پستان MCF-7 و MDA-MB-468 ..... ٦٣
۳-۲-۱- بررسی اثرات YC-1 بروی رشد رده های سلولی MCF-7 و MDA-MB-468 ..... ٦٤
۳-۲-۲- اندازه گیری cGMP درون سلولی پس از تیمار با YC-1 در دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-468 ..... ٦٦
۳-۲-۳- بررسی نقش پروتئین کیناز G در مهار رشد ناشی از افزایش cGMP در دو رده ٦٨

سلولی MCF-7 و MDA-MB-468.....

۳-۲-۳-۱- نتایج مربوط به تاثیر مهار کننده اختصاصی پروتئین کیناز G بروی رشد سلول های MCF-7 و MDA-MB-468..... ٦٨

۳-۲-۳-۲- نتایج مربوط به تاثیر مهار کننده اختصاصی پروتئین کینازG بر روی سیتوتوکسیسیتی ناشی از YC-1 در دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-468..... ٦٩

۳-۲-٤- بررسی اثر سیتوتوکسیک YC-1 بروی سلول های رده MCF-7 و MDA-MB-468 توسط فلوسایتومتری..... ٧١

۳-۲-٤-۱- نتایج بررسی اثر سیتوتوکسیک YC-1 بروی سلول های رده MCF-7 با استفاده از فلوسایتومتری..... ٧٢

۳-۲-٤-۲- نتایج بررسی اثر سیتوتوکسیک YC-1 بروی سلول های رده MDA-MB-468 با استفاده از فلوسایتومتری..... ٧٣

۳-۲-٥- رنگ آمیزی سلول های MCF-7 و MDA-MB-468 با AnnexinV-FITC /PI و بررسی با میکروسکوپ فلورسنت..... ٧٥

۳-۲-٦- بررسی سیکل سلولی با استفاده از فلوسایتومتری..... ٧٦

۳-۲-٦-۱- نتایج بررسی سیکل سلولی با استفاده از فلوسایتومتری در رده سلولی MCF-7..... ٧٦

۳-۲-٦-۲- نتایج بررسی سیکل سلولی با استفاده از فلوسایتومتری در رده سلولی MDA-MB-468..... ٧٨

۳-۲-۷- بررسی مورفولوژی هسته سلول های MCF-7 و MDA-MB-468 با رنگ هوخست ۳۳۲۵۸..... ٨٠

۳-۲-۸- بررسی فعالیت کاسپازها..... ٨٢

۳-۲-۸-۱- اندازه گیری فعالیت کاسپاز -۳ در دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-468..... ٨٢

۳-۲-۸-۲- انـــــدازه گیـــــری فعالیـــــت کاســـــپاز -۹ در دو رده ســـــلولی MCF-7 و MDA-MB-468..... ۸۳

۳-۳- مشخص نمودن ایزوفرم های پروتئین کیناز G دخیل در رشد سلولی با استفاده از فعال کننده ها و مهارکننده های اختصاصی در رده های سلولی MCF-7 و MDA-MB-468..... ۸۵

۳-۳-۱- تاثیر فعال کننده اختصاصی ایزوفرم Iα پروتئین کیناز G (8-APT-cGMP) بروی رشد رده های سلولی MCF-7 و MDA-MB-468..... ۸۵

۳-۳-۲- تاثیر فعال کننده اختصاصی ایزوفرم Iβ پروتئین کیناز G (8-Br-PET- cGMP) بروی رشد رده های سلولی MCF-7 وMDA-MB-468..... ۸۷

۳-۳-۲-۱- تاثیر فعال کننده اختصاصی ایزوفرم Iβ پروتئین کیناز G (8-Br-PET- cGMP) بروی رشد رده سلولی MCF-7..... ۸۷

۳-۳-۲-۲- تاثیر فعال کننده اختصاصی ایزوفرم Iβ پروتئین کیناز G (8-Br-PET- cGMP) بروی رشد رده سلولی MDA-MB-468 ..... ۸۹

۳-۳-۳- تاثیر فعال کننده اختصاصی ایزوفرم II پروتئین کیناز G بروی رشد رده های سلولی MCF-7 وMDA-MB-468..... ۹۰

۳-۳-٤- تاثیر مهار کننده های اختصاصی ایزوفرم های پروتئین کینازG بر روی رشد دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-468 ..... ۹۱

۳-۳-۵- تاثیر مهار کننده اختصاصی ایزوفرم I پروتئین کیناز G (RP-8-Br-PET-cGMP) بروی سیتوتوکسیسیتی ناشی از 8-Br-PET-cGMP در دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-468..... ۹۳

۳-۳-٦- تاثیر مهار کننده اختصاصی ایزوفرم II پروتئین کیناز G (RP-8-pCPT- cGMP) بروی سیتوتوکسیسیتی ناشی از 8-Br-PET-cGMP دردو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-468..... ۹٤

۳-۳-۷- تاثیر مهار کننده های ایزوفرم های پروتئین کیناز G بروی سیتوتوکسیسیتی ناشی از ۹٦

YC-1 در دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-468.....

۳-۳-۷-۱- تاثیر مهار کننده های ایزوفرم های پروتئین کیناز G بروی سیتوتوکسیسیتی ناشی از YC-1 در رده سلولی MCF-7..... ۹۷

۳-۳-۷-۲- تاثیر مهار کننده های ایزوفرم های پروتئین کیناز G بروی سیتوتوکسیسیتی ناشی از YC-1 در رده سلولی MDA-MB-468..... ۹۸

۳-۳-۸- بررسی اثر سیتوتوکسیک 8-Br-PET-cGMP بروی سلول های رده MCF-7 و MDA-MB-468 توسط فلوسایتومتری..... ۱۰۰

۳-۳-۸-۱- نتایج بررسی اثر سیتوتوکسیک 8-Br-PET-cGMP بروی سلول های رده MCF-7 توسط فلوسایتومتری..... ۱۰۱

۳-۳-۸-۲- نتایج بررسی اثر سیتوتوکسیک 8-Br-PET-cGMP بروی سلول های رده MDA-MB-468 توسط فلوسایتومتری..... ۱۰۲

۳-۳-۹ - رنگ آمیزی سلول های MCF-7 و MDA-MB-468 با AnnexinV-FITC /PI و بررسی با میکروسکوپ فلورسنت..... ۱۰٤

۳-۳-۱۰- بررسی سیکل سلولی با استفاده از فلوسایتومتری..... ۱۰۵

۳-۳-۱۰-۱- نتایج بررسی سیکل سلولی با استفاده از فلوسایتومتری در رده سلولی MCF-7..... ۱۰۵

۳-۳-۱۰-۲- نتایج بررسی سیکل سلولی با استفاده فلوسایتومتری در رده سلولی MDA-MB-468..... ۱۰۷

۳-۳-۱۱- بررسی مورفولوژی هسته سلول های MCF-7 و MDA-MB-468 با رنگ هوخست ۳۳۲۵۸..... ۱۰۹

۳-۳-۱۲- بررسی فعالیت کاسپازها..... ۱۱۱

۳-۳-۱۲-۱- اندازه گیری فعالیت کاسپاز -۳ در دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-468..... ۱۱۱

۳-۳-۱۲-۲- انـــــدازه‌گیـــــری فعالیـــــت کاســـــپاز-۹ در دو رده ســـــلولی MCF-7 و MDA-MB-468 ..... ۱۱۲

فصل چهارم: بحث، نتیجه گیری و پیشنهادها..... ۱۱٤

فهرست منابع..... ۱۳۱

چکیده انگلیسی ۱۵۳

فهرست جداول

جدول ۲-۱: آماده سازی نمونه های PCR..... ٤٤

جدول ۲-۲: شرایط انجام **PCR**..... ٤٥

جدول ۲-۳: روش اندازه‌گیری کاسپاز-۳..... ٥٨

فهرست نمودارها

نمودار ۳-۱- تاثیر غلظت های مختلف YC-1 بروی رشد سلول های MCF-7 در زمان های ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت..... ٦٤

نمودار ۳-۲- تاثیر غلظت های مختلف YC-1 بروی رشد سلول های MDA-MB-468 در زمان های ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت..... ٦٥

نمودار۳-۳- منحنی استاندارد به دست آمده از غلظت های استاندارد cGMP موجود در کیت سنجش cGMP..... ٦٦

نمودار ۳-٤- اثر YC-1 بروی میزان cGMP درون سلولی در رده های سلولی MCF-7..... ٦۷

نمودار ۳-٥- اثر YC-1 بروی میزان cGMP درون سلولی در رده های سلولی MDA-MB-468..... ٦۷

نمودار۳-٦- تاثیر مهارکننده اختصاصی پروتئین کیناز G (KT5823) بروی رشد سلول های MCF-7 و MDA-MB-468 پس از ٤۸ ساعت..... ٦۹

نمودار ۳-۷- درصد سلول های زنده تیمار شده با YC-1 در حضور و عدم حضور KT5823 در رده سلولی MCF-7..... ۷۰

نمودار ۳-۸- درصد سلول های زنده تیمار شده با YC-1 در حضور و عدم حضور KT5823 در رده سلولی MDA-MB-468..... ۷۱

نمودار۳-۹- درصد سلول های زنده، آپوپتوتیک اولیه،دیررس و نکروزی در رده سلولی MCF-7 پس از تیمار باYC-1 ..... ۷۲

نمودار۳-۱۰- درصد سلول های زنده، آپوپتوتیک اولیه،دیررس و نکروزی در رده سلولی MDA-MB-468 پس از تیمار باYC-1 ..... ۷٤

نمودار ۳-۱۱- تاثیر YC-1 بروی توزیع سیکل سلولی در سلول های رده MCF-7 ..... ۷۸

نمودار ۳-۱۲- تاثیر YC-1 بروی توزیع سیکل سلولی در سلول های رده MDA-MB-468 ..... ۸۰

نمودار ۳-۱۳- فعالیت کاسپاز-۳ در رده سلولی MCF-7 پس از تیمار با YC-1 در سه زمان مختلف..... ۸۲

نمودار ۳-۱٤- فعالیت کاسپاز-۳ در رده سلولی MDA-MB-468 پس از تیمار با YC-1 در سه زمان مختلف..... ۸۳

نمودار ۳-۱٥- فعالیت کاسپاز-۹ در رده سلولی MCF-7 پس از تیمار با YC-1 در سه ۸٤

زمان مختلف.....
نمودار ۳-۱۶- فعالیت کاسپاز-۹ در رده سلولی MDA-MB-468 پس از تیمار با YC-1 در سه زمان مختلف ۸٤
نمودار ۳-۱۷-تاثیر فعال کننده اختصاصی ایزوفرم Iα پروتئین کیناز G (8-APT-cGMP) بروی رشد سلول های رده MCF-7 ..... ۸٦
نمودار ۳-۱۸-تاثیر فعال کننده اختصاصی ایزوفرم Iα پروتئین کیناز G (8-APT-cGMP) بروی رشد سلول های رده MDA-MB-468..... ۸۷
نمودار ۳-۱۹-تاثیر فعال کننده اختصاصی ایزوفرم Iβ پروتئین کیناز G (8-Br-PET-cGMP) بروی رشد سلول های رده MCF-7 ..... ۸۸
نمودار ۳-۲۰-تاثیر فعال کننده اختصاصی ایزوفرم Iβ پروتئین کیناز G (8-Br-PET-cGMP) بروی رشد سلول های رده MDA-MB-468 ..... ۸۹
نمودار ۳-۲۱- اثر فعال کننده اختصاصی ایزوفرم II پروتئین کیناز G (8-pCPT-cGMP) بروی رشد سلول های رده MCF-7..... ۹۰
نمودار ۳-۲۲- اثر فعال کننده اختصاصی ایزوفرم II پروتئین کیناز G (8-pCPT-cGMP) بروی رشد سلول های رده MDA-MB-468 ..... ۹۱
نمودار۳-۲۳- تاثیر مهارکننده های ایزوفرم های پروتئین کیناز G بروی رشد سلول های MCF-7 و MDA-MB-468 ..... ۹۲

نمودار ۳-۲٤- درصد سلول های زنده تیمار شده با 8-Br-PET-cGMP در حضور و عدم حضور مهارکننده ایزوفرم I پروتئین کیناز G (Rp-8-Br-PET-cGMP) در رده سلولی MCF-7..... ۹۳
نمودار ۳-۲۵- درصد سلول های زنده تیمار شده با 8-Br-PET-cGMP در حضور و عدم حضور مهارکننده ایزوفرم I پروتئین کیناز G (Rp-8-Br-PET-cGMP) در رده سلولیMDA-MB-468 ..... ۹٤
نمودار ۳-۲٦-درصد سلول های زنده تیمارشده با 8-Br-PET-cGMP در حضور و عدم حضور مهار کننده ایزوفرم II پروتئین کیناز G (Rp-8-pCPT-cGMP) در رده سلولیMCF-7..... ۹۵
نمودار ۳-۲۷- درصد سلول های زنده تیمارشده با 8-Br-PET-cGMP در حضور و عدم ۹٦

حضور مهار کننده ایزوفرم II پروتئین کیناز G (Rp-8-pCPT-cGMP) در رده سلولی MDA-MB-468 .....
نمودار ۳-۲۸- درصد سلول های زنده تیمارشده با YC-1در حضور و عدم حضور مهار کننده ایزوفرم II پروتئین کیناز G (Rp-8-pCPT-cGMP) در رده سلولی MCF-7 ..... ۹۷
نمودار ۳-۲۹- درصد سلول های زنده تیمارشده با YC-1در حضور و عدم حضور مهار کننده ایزوفرم I پروتئین کیناز G (Rp-8-Br-PET-cGMP)در رده سلولی MCF-7 ..... ۹۸
نمودار ۳-۳۰- درصد سلول های زنده تیمارشده با YC-1در حضور و عدم حضور مهار کننده ایزوفرم II پروتئین کیناز G (Rp-8-pCPT-cGMP) در رده سلولی MDA-MB-468 ..... ۹۹
نمودار ۳-۳۱- درصد سلول های زنده تیمارشده با YC-1در حضور و عدم حضور مهار کننده ایزوفرم I پروتئین کیناز G (Rp-8-Br-PET-cGMP) در رده سلولی MDA-MB-468 ..... ۱۰۰
نمودار۳-۳۲- درصد سلول های زنده، آپوپتوتیک اولیه،دیررس و نکروزی در رده سلولی MCF-7 پس از تیمار با 8-Br-PET-cGMP ۱۰۱
نمودار۳- ۳۳ - درصد سلول های زنده، آپوپتوتیک اولیه،دیررس و نکروزی در رده سلولی MDA-MB-468 پس از تیمار با 8-Br-PET-cGMP ۱۰۳
نمودار ۳-۳٤- تاثیر 8-Br-PET-cGMP بروی توزیع سیکل سلولی در سلول های رده MCF-7 ..... ۱۰۷
نمودار ۳-۳۵- تاثیر 8-Br-PET-cGMP بروی توزیع سیکل سلولی در سلول های رده MDA-MB-468 ..... ۱۰۹
نمودار ۳-۳٦ - فعالیت کاسپاز-۳ در رده سلولی MCF-7 پس از تیمار با 8-Br-PET-cGMP در سه زمان مختلف ۱۱۱
نمودار ۳-۳۷- فعالیت کاسپاز-۳ در رده سلولی MDA-MB-468 پس از تیمار با 8-Br-PET-cGMP در سه زمان مختلف ۱۱۲
نمودار ۳-۳۸- فعالیت کاسپاز-۹ در رده سلولی MCF-7 پس از تیمار با 8-Br-PET-cGMP در سه زمان مختلف ۱۱۳
نمودار ۳-۳۹- فعالیت کاسپاز-۹ در رده سلولی MDA-MB-468 پس از تیمار با 8-Br-PET-cGMP در سه زمان مختلف ۱۱۳

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱- ساختار گوانیلیل سیکلازهای متصل به غشاء..... ۷

شکل ۱-۲- ساختار گوانیلیل سیکلازهای محلول..... ۹

شکل ۱-۳- تنظیم گوانیلیل سیکلاز محلول توسط لیگاندها..... ۱۰

شکل ۱-٤- مکانیسم مولکولی دخیل در اتساع عروق که از طریق cGMP به انجام می رسد..... ۱٤

شکل ۱-۵- تنظیم ترشحات روده توسط cGMP ۱٦

شکل ۱-٦- خصوصیات ساختاری پروتئین کینازهای G ۱۸

شکل ۱-۷- استفاده از PKG در درمان سرطان..... ۲۷

شکل ۱-۸- فرمول شیمیایی آنالوگ های cGMP..... ۳۰

شکل ۱-۹- انواع مرگ سلولی..... ۳۲

شکل ۳-۱- بیان mRNA ایزوفرم های پروتئین کیناز G و GAPDH در رده سلولی MCF-7 ..... ٦۲

شکل ۳-۲- بیان mRNA ایزوفرم های پروتئین کیناز G و GAPDH در رده سلولی MDA-MB-468 ..... ٦۳

شکل ۳-۳- الف) هیستوگرام سلول های کنترل MCF-7 و ب) هیستوگرام سلول های MCF-7 که با غلظت ۱۰۰ میکرومولار YC-1 تیمار شده اند..... ۷۳

شکل ۳-٤- الف) هیستوگرام سلول های کنترل MDA-MB-468 و ب) هیستوگرام سلول های MDA-MB-468 که با غلظت ۱۰۰ میکرومولار YC-1 تیمار شده اند..... ۷۵

شکل ۳-۵- مورفولوژی سلول های رده MCF-7 (الف) و رده MDA-MB-468 (ب) تیمار شده با (۱۰۰ میکرومولار)YC-1 که با Annexin V/PI رنگ‌آمیزی شده است..... ۷٦

شکل ۳-٦- تاثیر YC-1 بروی توزیع سیکل سلولی در سلول های رده MCF-7..... ۷۷

شکل ۳-۷- تاثیر YC-1 بروی توزیع سیکل سلولی در سلول های ۷۹