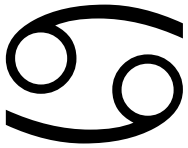

دانشگاه پیام نور

دانشکده علوم پایه

گروه علمی بیوشیمی

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته بیوشیمی(M.Sc)

عنوان پایان نامه:

بررسی القای آپوپتوز روی سلول سرطانی خون(HL-60) توسط ICD-85 (ترکیب پپتیدی مشتق ازسم مارو عقرب)در محیط invitro

اساتید راهنما :

دکتر عباس زارع –دکتر بهزاد لامع راد

استاد مشاور:

حسن مروتی

نگارش:

زهرا شهرام یار

بهمن ۱۳۸۸

جمهوری اسلامی ایران
وزارت علوم تحقیقات و فناوری

دانشگاه پیام نور استان تهران

تاریخ .....
شماره .....
پیوست .....

تصویب نامه

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی

تحت عنوان:

" بررسي القاي آ پو پتوز روي سلولهاي سرطاني HL-60 به وسيله ICD-85 (تركيب پلي پپتيدي از سموم مار و عقرب در محيط اينو يترو) "

تاریخ دفاع : ۸۸/۱۱/۱۸ ساعت:۱۲ - ۱۰

نمره: ۱۹/۸۲ نوزده و هشتاد و دو صدم درجه ارزشیابی: عالی

هیات داوران:

داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	امضاء
استاد راهنما	آقاي دكتر عباس زارع	دانشیار	
استاد مشاور	آقاي دكتر حسن مروتي	استاد	
استاد داور داخلی	آقاي دكتر رضا حاجي حسيني	دانشیار	
استاد داور خارجی	آقاي دكتر قاسم عطايي		
نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر سیا لطفی	دانشیار	
استاد راهنمای همکار	اقای دکتر بهزاد لامع راد	استادیار	

تهران، خیابان انقلاب
خیابان استاد نجات اللهی
نبش خیابان سپند
پلاک ۳۳۳
تلفن: ۸۸۸۰۱۰۹۰
دورنگار: ۸۸۹۰۳۱۵۸
پست الکترونیکی:
info@Tehran.pnu.ac.ir
نشانی الکترونیکی:
http://www.Tehran.pnu.ac.ir

تقدیم به امام عصر (عج)

آنکه قدوم سبزش ، زردی پائیز و سرمای زمستان را به بهاری زیبا تبدیل می کند و دلهای مرده را روحی دوباره می بخشد .

به پدرم

این کوه استوار پایداری و بلندترین قله صبرو متانت ، آنکه نگاهش جان و کلامش به من زندگی می بخشد .

به مادرم

نخستین آموزگار زندگی ام ، آنکه زیباترین لحظه های زندگی را درآغوش او گذرانده ام .

این کار کوچک را از صمیم قلب به پیشگاه پاک و بلندتان تقدیم می کنم وسرفراز هستم از اینکه فرمان شما را به کار بسته و جز تحصیل علم به چیزی دل نبسته ام و جز عمل خیر به چیزی نیندیشیده ام و تنها آرزوی من خشنودی شما از کار و اندیشه من است .عمرتان دراز و عزت شما افزون باد .

به همسرم

آنکه هر وقت در کنارش بودم به ساحل آرامش و امنیت رسیده ام وپس از خدا ، بهتر ازاو یارو یاوری نداشته ام .

به یگانه فرزندم

آنکه وجودش امیدبخش زندگیم است و دلم همیشه برای او می تپد .

به برادران فرهیخته و خواهر عزیز تر از جانم

به پاس حمایت وتشویق بیدریغشان در طول زندگیم .

و به تمام یارانی که معنای ناب دوستی و مفهوم والای عشق در وجود گرانمایه شان خلاصه شده است

تقدیرو تشکر

خداوند بزرگ را سپاس می گذارم که توفیق عطا کرد تا کار خویش را به سرانجام برسانم و حاصل تحقیق و پژوهش خود را به محضر عالمان تقدیم دارم .

از استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر عباس زارع میرک آبادی رئیس بخش جانوران سمی و تهیه پادزهر موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی که مساعدتها و رهنمودهای بی دریغشان در تمام این مدت چراغی فراسوی تمام مشکلاتم بوده است واز فضایل اخلاقی و تجربیات گرانقدر ایشان در تمامی مراحل کار بهره مند گشتم ،تشکر و قدردانی می کنم .

همچنین از استاد گرانقدرم جناب آقای مهندس حسن مروتی رئیس آزمایشگاه کنترل کیفی واکسنهای انگلی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی که در تمام مراحل کاربا صبر و متانت و به طور مستمر بار سنگین این تحقیق را بیش از سایرین به دوش کشیدند تشکر و قدردانی می کنم .

بر خود لازم می دانم از راهنماییهای دلسوزانه ،زحمات بی دریغ و ارزنده استاد گرامی جناب آقای دکتر محسن لطفی رئیس بخش کنترل کیفی فراورده های بیولوژیک موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی ، در خصوص موافقت ایشان برای انجام مراحل پایان نامه در این بخش و نیز در اختیار گذاشتن اکثر مواد مورد نیاز برای انجام تحقیق و تجربیات فراوانی که در طول کار در اختیاربنده گذاشتند تشکر و قدردانی کنم .

از استاد گرامی جناب آقای دکتر عباس نوری رئیس بخش میکروسکوپ الکترونی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی به جهت مساعدت ایشان در انجام مرحله عسکبرداری از سلولهای تیمار شده در زیر میکروسکوپ الکترونی تشکر و قدر دانی می کنم .

از استادان ارجمند جناب آقای دکتر علی میر جلیلی رئیس بخش بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی و جناب آقای دکتر خسروآقایی پور رئیس آزمایشگاه ژنومیکس موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی نیز به جهت موافقت ایشان درانجام مرحله تخلیص DNA

سلول در این بخش ودر اختیار گذاشتن مواد آزمایشگاهی مورد نیاز وارائه آموزش های متعدد مربوط به آزمایشات مولکولی مختلف تشکروقدردانی می کنم .

از استاد گرامی جناب آقای دکتر غلامرضا حبیبی رئیس بخش تولید واکسنهای تک یاخته ای موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی نیز به جهت موافقت و مساعدت ایشان برای انجام تخلیص والکتروفورزDNA در این بخش و ارائه مشاوره های ارزشمند به اینجانب و نیز از همکارشان سرکار خانم بزرگی به خاطرمحبت و همکاری های دلسوزانه ایشان تشکر و قدر دانی می کنم .

از خانم دکتر مریم جلالی در دانشگاه تربیت معلم ، خانم مهندس صفویه ، خانم مهندس قربانی و سرکار خانم هاشمی در آزمایشگاه ژنومیکس بخش بیوتکنولوژی که با روحیه ای زنده و سرشار از محبت ازمساعدتهای دلسوزانه ، شایسته و بایسته ایشان برخوردار شدم تشکر و قدردانی می کنم .

وبا تشکر و سپاس فراوان از بخش کنترل کیفی فراورده های بیولوژیک موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، خانمها مهندس عفت پرمور ،مهندس فاطمه اخلاقی ،دکتر آناهیتا عمادی ،دکتر آزاده فردی پور ، دکتر زهره مجاهدی ومعصومه بحریاری وآقایان مرتضی کمالی ،دکتر شیروانی ، دکتر افشین حاجی زاده ،دکتر ابراهیم حسن نیا که افتخارحضور در محضرشان را داشتم و هر کدام به نحوی مرا در انجام کار یاری نمودند .

در پایان از همه کسانی که مرا در انجام این تحقیق یاری کردند،صمیمانه سپاسگزاری نموده و برای همگی آنان ،از درگاه ایزد منان آرزوی توفیق روز افزون دارم .

چکیده

مطالعات قبلی روی ICD-85 (پپتید مشتق از زهر مار و عقرب)که توسط محققین موسسه سرم سازی رازی استخراج شده است ،اثر مهاری این ترکیب را در لاین سلولی سرطان پستان -MDA) (MB 231 نشان داد . همچنین در مطالعاتی که در شرایط invivo صورت گرفت ،اثر سرکوب تومور پستان در موش های آزمایشگاهی توسط ICD-85 تائید شد .

مکانیسم حقیقی ICD-85 تاکنون ناشناخته مانده است . از اینرو این تحقیق که پیش روی شما است به منظور روشن شدن مکانیسم اثر ICD-85 به عنوان ماده ضد رشد سلولهای سرطانی HL-60 صورت گرفته است .

ابتدا سیتوتوکسیسیته ICD-85 روی سلول HL-60 توسط تست MTT تعیین شد و تغییرات مرفولوژیکی حاصل از ICD-85 در سلول هایی که به مدت۲۴ ساعت در معرض این ترکیب قرار گرفتند زیر میکروسکوپ **الکترونی** مشاهده شد. سپس میزان LDH آزاد شده در محیط سلولهایی که تحت تاثیر ICD-85 قرار گرفته بودند، اندازه گیری شد و در انتها آنالیز DNA قطعه قطعه شده با استفاده از ژل الکتروفورز صورت گرفت .

مقدار IC50 پس از افزودن غلظتهای مشخص از ICD-85 به مدت۲۴ ساعت به سلول HL-60 برابربا۰/۰۴µ g/ml محاسبه شد . همچنین در این سلولهادر مقایسه با سلولهای کنترل که در معرض ICD-85قرار نگرفته بودند، زیر میکروسکوپ الکترونی تغییرات قابل توجهی از جمله :کوچک شدن نسبت هسته به سیتوپلاسم ، جمع شدن سیتوپلاسم ، متراکم شدن محتویات هسته ای ، افزایش واکوئول های سیتوپلاسمی ،تشکیل اجسام آپوپتوتیک ،تخریب میتوکندری مشاهده شد . دراندازه گیری میزان LDH نیز هیچ تغییر معنی داری در میزان LDH آزاد شده در غلظت های مختلف سم در مقایسه با سلول کنترل مشاهده نشد . DNA قطعه قطعه شده(ladder pattern) اختصاصی در ژل آگارز الکتروفورز ، نتایج به دست آمده به وسیله میکروسکوپ الکترونی در القای آپوپتوزیس توسط ICD-85 را تائید کرد .

نتایج تحقیق حاضر اثر ضد رشد و القای آپوپتوز توسط ترکیبICD-85 ، روی لاین سلولی HL-60 را نشان می دهد .

واژه های کلیدی :

ترکیب ICD-85 ، سلول HL-60 ، تست MTT ،تست LDH ، سیتوتوکسیسیته ،IC50 ، ladder pattern ،آپوپتوز ،DNA fragmentation ،کمپتوتسین ،اجسام آپوپتوتیک

فهرست مطالب **شماره صفحه**

فصل اول :مقدمه ومروری بر منابع **۱**

۱-۱- بیان مسئله ۲

۱-۲- تاریخچه ۳

۱-۳- تعریف سرطان ۵

۱-۴- سیکل سلولهای سرطانی ۵

۱-۵- تغییرات سرطان ۶

۱-۶- عوامل موثر در ایجاد سرطان ۷

۱-۷- لوسمی ۸

۱-۷-۱- لوسمی میلوئید حاد (AML) ۱۰

۱-۷-۲- لوسمی میلوئید مزمن (CML) ۱۰

۱-۷-۳- میزان بروز و سبب شناسی ۱۰

۱-۷-۴- تظاهرات بالینی و آزمایشگاهی لوسمی ۱۱

۱-۸- روشهای تشخیص سرطان ۱۱

۱ -۹- مراحل درمان سرطان ۱۲

۱-۱۰- داروهای شیمی درمانی ۱۳

۱-۱۱- روش درمان لوسمی ۱۴

۱-۱۲- کمپتوتسین ۱۶

۱-۱۲-۱- مکانیسم عمل کمپتوتسین ۱۷

۱-۱۳- مکانیسم درمان سرطان ۱۹

۱-۱۳-۱- القای آپوپتوز ۲۰

۱-۱۳-۲- مسیرهای القای آپوپتوز ۲۴

۱-۱۳-۳- روشهای تشخیص آپوپتوز ۲۴

۱-۱۴- ترکیبات زهر مار و کاربرد آن در پزشکی ۲۷

۱-۱۵- ترکیبات زهر عقرب و کاربرد آن در پزشکی ۲۸

۱-۱۵-۱- طبقه بندی توکسینها ی عقرب ۲۹

۱-۱۶- برخی از آنزیمها وتوکسین های زهر ماروعقرب ۳۰

۱-۱۶-۱- نوروتوکسین ها (کولین استراز ها) ۳۰
۱-۱۶-۲- دندروتوکسین ها ۳۰
۱-۱۶-۳- میوتوکسین ها ۳۱
۱-۱۶-۴- فسفو لیپاز A2 ۳۱
۱-۱۶-۵- آنزیمهای انعقادی و ضد انعقادی ۳۱
۱-۱۶-۶- آنزیم های شبه ترومبین ۳۲
۱-۱۶-۷-آنزیمهای فعال کننده پروترومبین ۳۳
۱-۱۶-۸- مهار کننده های تجمع پلاکت ۳۳
۱-۱۶-۹ - پروتئین های غیر آنزیمی شبه لکتین C ۳۴
۱-۱۶-۱۰- آنزیمهای متالوپروتئیناز ۳۵
۱-۱۶-۱۱- دیس اینتگرینها ۳۶
۱-۱۷- فعالیتهای ضد سرطانی و ضد التهابی دیس اینتگرینها ۳۶
۱-۱۸- فعالیت های ضد سرطانی و ضد التهابی فسفولیپاز A2(PLA2) ۳۸
۱-۱۹- دیگر پپتیدهای ضد توموری ۳۹
۱-۲۰- پپتیدهای تسکین دهنده درد ۳۹
۱-۲۱- مروری بر منابع ۴۰
فصل دوم : مواد و روشها ۴۳
۲-۱- مواد و وسایل مورد نیاز ۴۴
۲-۲- کشت و نگهداری سلول ۴۶
۲-۲-۱- مشخصات سلول HL-60 ۴۶
۲-۲-۲- روش کشت سلول HL-60 ۴۶
۲-۲-۳- نگهداری روزمره ۴۶
۲-۲-٤- تعویض محیط کشت ٤۸
۲-۲-۵- محیط کشت نگهدارنده ٤۸
۲-۲-٦- ذخیره سلول HL-60 در تانک ازت ۴۸
۲-۲-۷- خارج کردن سلول از تانک ازت ۴۹
۲-۲-۸- آماده سازی ترکیب ICD-85 ۴۹

۲-۳- اندازه گیری سیتوتوکسیسیته ۵۰
۲-۳-۱- روش اول : آزمایش MTT (MTT Assay) ۵۰
۲-۳-۱-۱- روش آزمایشMTT ۵۰
۲-۳-۱-۲- اندازه گیری IC50 ۵۱
۲-۳-۲- روش دوم :اندازه گیری لاکتات دهیدروژناز(LDH cytotoxicity assay) ۵۲
۲-۳-۲-۱- آماده سازی محلولها ۵۲
۲-۳-۲-۲- روش آزمایش ۵۲
۲-۴- تهیه مقاطع میکروسکوپ الکترونی ۵۴
۲-۴-۱- ثبوت ۵۴
۲-۴-۲- آبگیری ۵۴
۲-۴-۳- مرحله انتقالی ۵۵
۲-۴-۴- آغشتگی به رزین (نفوذ) ۵۵
۲-۴-۵- قالب گیری ۵۵
۲-۴-۶- برش دادن ۵۶
۲-۴-۷- نحوه ساخت محلول رنگ آمیزی تولوئیدین بلو ۵۶
۲-۴-۸- رنگ آمیزی مثبت برای برشهای فوق نازک ۵۷
۲-۴-۹- نحوه تهیه اورانیل استات ۵۷
۲-۴-۱۰- نحوه تهیه سیترات سرب ۵۷
۲-۴-۱۱- روش رنگ آمیزی با اورانیل استات ۵۸
۲-۴-۱۲- روش رنگ آمیزس سیترات سرب ۵۸
۲-۵- استخراج و تخلیص DNA سلول ۶۰
۲-۵-۱- آماده سازی سلول برای تخلیص DNA ۶۰
۲-۵-۲- آماده سازی کمپتوتسین ۶۱
۲-۵-۳- روش استخراج DNA با استفاده از کیت ۶۱
۲-۵-۴- روش نگهداری DNA استخراج شده ۶۲
۲-۶-DNA ژل الکتروفورز ۶۳
۲-۶-۱- طرز تهیه ژل آگارز ۱٪ ۶۳
۲-۶-۲- الکتروفورز DNA ۶۳

۲-۶-۳- رنگ آمیزی ژل ۶۳
۲-۶-۴- شرایط نگهداری DNA ۶۳
فصل سوم : نتایج ۶۵
۳-۱- اثر ICD-85 روی رشد و تکثیر سلول ۶۶
۳-۲- اثر ICD-85 در فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) ۶۸
۳-۳- اثر ICD-85 روی مرفولوژی سلول ۶۹
۳-۴- اثر ICD-85 روی DNA سلول ۷۰
فصل چهارم : بحث ۷۲
فصل پنجم :پیشنهادات ۸۲
فصل ششم :منابع و ماخذ ۸۴
خلاصه انگلیسی ۹۲

فهرست جداول و شکلهاو نمودارها **شماره صفحه**

جدول۱-۱ : انواع داروهای شیمی درمانی و نحوه تاثیر آنها ۱۸

شکل۱-۱ : دو مکانیسم تاثیر داروهای شیمی درمانی ۱۹

شکل ۱-۲ : استفاده از سیستمهای آپوپتوتیک در درمان سرطان ۲۰

شکل۱-۳ : مقایسه سلول زنده و سلول آپوپتوتیک ۲۲

شکل۱- ۴ : مقایسه سلولهای آپوپتوتیک و نکروتیک ۲۲

شکل۱- ۵ : تغییرات تدریجی در سلولها در جریان آپوپتوز ۲۳

شکل۱-۶ : نمایش فعالیت اندونوکلئازها ۲۳

شکل ۱- ۷ : مسیر داخلی آپوپتوز ۲۵

شکل ۱- ۸ : مسیر خارجی آپوپتوز ۲۵

شکل ۱- ۹ : نمایش فعالیت میتوکندری و شبکه آندوپلاسمی در جریان آپوپتوز ۲۶

شکل۱- ۱۰ : اهمیت پروتئینهای BH3 سنتتیک و P53 در آپوپتوز ۲۶

جدول ۱-۲ : داروها و کیتهای تشخیصی کلینیکال مشتق شده از زهر مار ۳۵

جدول ۱-۳ : موتیفهای تشخیص داده شده به وسیله مولکولهای چسبنده در دیس اینتگرینهای زهر مار ۳۷

شکل ۲-۱ : سلولHL-60 ۴۷

شکل ۲-۲ : میکروسکوپ الکترونی ۵۹

شکل ۲-۳ : تانک الکتروفورز ۶۴

نمودار ۳-۱ : درصد مهاری غلظتهای مختلف ICD-85 را روی سلول HL-60 ۶۶

شکل ۳-۱ : روند تغییر رنگ سلولها در جریان آزمایش MTT ۶۷

شکل ۳-۲ : نمایش تغییرات سلولها و تشکیل کریستال فورمازان در جریان آزمایش MTT زیر میکروسکوپ معکوس ۶۷

جدول۳-۱ : میزان LDH آزادشده به ازای افزودن غلظتهای مختلف ICD-85 ۶۸

نمودار۳-۲ : نمودار میزان LDH آزادشده به ازای افزودن غلظتهای مختلف ICD-85 ۶۸

شکل ۳-۱ : تصویر سلولها زیر میکروسکوپ الکترونی ۶۹

شکل۳-۲ : تصویر قطعه قطعه شدن DNA در سلولهایی که تحت ICD-85 قرار گرفتند. ۷۱

فصل اول : مقدمه

۱-۱- بیان مساله

سرطان عنوانی است که به انواع مختلفی از بیماریها(بیش از ۲۰ نوع) اطلاق می شود که حاصل رشدو تکثیر بی رویه است . رشد لجام گسیخته سلولهای سرطانی نه تنها سبب تخریب در محل اولیه می شود بلکه با پیشرفت از طریق خون و دستگاه لنفاوی و درگیری سایر ارگانها (متاستاز)[1] منجر به بروز علائم و نشانه های خاص می گردد . دغدغه ای که امروز سرطان را به عنوان یک معضل بهداشتی در سطح جهان مطرح می کند و مبارزه با آن را جزو اولویت های بهداشتی - درمانی قرار می دهد ،رشد رو به افزایش تعداد مبتلایان به این بیماری در سطح جهانی ،به ویژه در کشور ما می باشد .احتمال ابتلا افراد در هرگروه سنی به سرطان وجود دارد ولی میزان وقوع بسیاری ازانواع سرطان با افزایش سن بالا می رود ، بنابراین در افرادی که عمر بیشتری دارند ، احتمال ابتلا به سرطان بیشتر است . علاوه بر مرگ و میر انسان ها ،بار اقتصادی این بیماری نیز برای جامعه بسیار زیاد است به طوریکه این بیماری حداقل ۶ هزار میلیارد تومان در سال ، بار مالی به ملت و دولت تحمیل می کند(۱۰) .

درمان سرطان به روش‌های گوناگون انجام می‌شود، درمان‌های موجود برای برخی سرطان‌ها به خوبی پاسخگو بوده و درصد بالایی از بیماران بهبود می‌یابند ولی به طورکلی درمان‌های عمومی سرطان مانند شیمی درمانی و پرتودرمانی علاوه بر این‌که باعث از بین رفتن سلول‌های سرطانی می شوند، روی سلول‌های طبیعی نیز اثر می‌گذارند ولی با توجه به شرایط بیمار، اینگونه عوارض جانبی به علت اهمیت درمان سرطان پذیرفته می‌شود .

به دلیل وجود متغیر های مختلف در بروز و شیوع این بیماری ،سرطان را از بیماریهایی می شناسند که ریشه در ساختار اجتماعی ،فرهنگی و اقتصادی دارد . در کشور ما سومین علت مرگ و میر را سرطان ها تشکیل می دهند که در صورت مهار عوامل متعدد دخیل در ایجاد سرطان به جایگاه مشابه کشور های صنعتی یعنی دومین علت مرگ بر می گردد(۱۰) .

تحقیقات بنیادی سرطان طی دهه های اخیر باعث به دست آمدن پیشرفت های قابل توجهی در درک ما نسبت به بیولوژی و بیوشیمی سرطان شده و ثابت شده است که بعضی از عوامل ضد سرطان باعث القای آپوپتوز[2] می شوند(۵۶و ۵۷) .

---

1. Metastasis 2. Apoptosis

آپوپتوز مجموعه ای از رویدادهای مرگ سلولی است که منجر به ایجاد تغییرات خاص در الگوی مرفولوژیکی ،بیوشیمیایی و مولکولی می شود (۱۲). عدم وجود آپوپتوز، منجر به تظاهرات مختلفی از قبیل سرطان،بیماریهای خود ایمنی و عفونت های ویروسی می گردد . سرطانهایی مانند لوسمی[1]، لنفوم[2] و لوسمی ناشی از ویروس HTLV1 از موارد شناخته شده نقص در آپوپتوز می باشند . اثر پلی پپتید های مختلف جدا شده از سم ماردر درمان سرطان سالها ست که مورد توجه دانشمندان و پزشکان متخصص سرطان می باشد و طی سالهای اخیر اثر ضد سرطانی گروهی از این پروتئینها و القای آپوپتوز توسط آنها به اثبات رسیده است (۱۲و۱٦).

اثر سیتوتوکسیک و فعالیت کمی و کیفی و بیولوژیکی و دارویی ترکیب پپتیدی ICD-85 مشتق از سم مار و عقرب در سال ۱۳۸۷ روی سل لاین MDAMB-231 به وسیله اندازه گیری فعالیت آنزیم سیتوزولی LDH که توسط غشای سلول آسیب دیده در محیط کشت آزاد می گردد ، توسط آقای دکتر عباس زارع و همکارانشان در موسسه رازی مورد مطالعه قرار گرفت(۳۴) .
همچنین مطالعه دیگری روی اثر ضد سرطانی ICD-85 روی سل لاین MDAMB-231 در شرایط invitro وموش های مبتلا به سرطان پستان در شرایط invivo توسط آقای دکتر عباس زارع و همکارانشان انجام گرفت(۳۵) . ولی همچنان مکانیزم اثر ICD-85 ناشناخته باقی ماند .
هدف از این تحقیق ادامه پژوهش و مطالعه روی ترکیب ICD-85 و احتمالاً تعیین مکانیزم اثر این ترکیب روی سلولهای سرطانی میلوئیدی خون (HL-60) می باشد .

۱-۲- تاریخچه

سرطان یکی از مسائل مهم مرتبط با سلامت عمومی در ایران و همه کشورهای جهان می باشد. ثبت موارد سرطانی در ایران دارای سابقه طولانی است که بیشتر به صورت منطقه ای و مقطعی انجام گرفته است . برای اولین بار در سال ۱۳۴۶ ، ثبت موارد سرطانی در استان مازندران ،توسط ایستگاه تحقیقاتی بابل اجرا گردید . اما با توجه به ضرورت ساماندهی به وضعیت ثبت سرطان ،در سال ۱۳۶۳ با همت مسئولان وقت ثبت و گزارش اجباری بیماریهای سرطانی به تصویب مجلس شورای اسلامی رسید .

1 . Leukemia 2. Lymphoma

بر اساس این قانون همه موسسات در مانی و آزمایشگاههای تشخیص طبی مکلف شدند هر بافت و نمونه ای که تحت عنوان " تشخیص ، درمان و تجسس " از بدن انسان زنده خارج می کنند ،مورد آزمایش قرار داده و چنانچه به موارد مشکوک سرطانی برخورد نمودند نتیجه آزمایش را به صورت کاملا" محرمانه به سازمان مبارزه با سرطان ارسال نمایند . درسال ۱۳۶۸ سازمان مبارزه با سرطان با اداره کل پیشگیری از بیماریهای غیر واگیر ادغام شد و شبکه بهداشتی درمانی کشور جایگزین واحدهای ثبت سرطان شدو امکان دسترسی به اطلاعات سرطان در کل کشور فراهم شد . در سال ۱۳۷۱ طرح کشوری ثبت موارد سرطانی تدوین و در سال ۱۳۷۴ ،با توزیع فرم های مربوطه به مورد اجرا گذاشته شد . در سالهای ۱۳۷۵ تا ۱۳۷۸ اطلاعات موارد سرطانی از سراسر کشور تدوین گردید و در سال ۱۳۷۸ براساس دستور وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی ،بازبینی در دستور العمل اجرایی صورت گرفت و در اختیار دانشگاههای علوم پزشکی کشور قرار گرفت(۱۰) .

طبق آخرین آمار های وزارت بهداشت ایران، سالانه حدود ۳۰۰۰۰ نفر بر اثر ابتلا به سرطان جان خود را از دست می دهند و مجموعا"حدود ۶۵۰ هزار سال عمر از دست رفته در اثر ابتلا به سرطان ایجاد می شود .از تعداد کل ۳۸۴۶۸ مورد سرطان ثبت شده ، تعداد۲۱۶۱۹ مورد آن مربوط به مردان و ۱۶۸۴۹ مورد مربوط به زنان بوده است . به عبارت دیگر ۵۶/۱ ٪ موارد سرطان در مردان و ۴۳/۹ ٪ موارد سرطان در زنان رخ داده است . بنابراین نسبت جنسی بروز سرطان در سال ۸۲ برابر ۱۲۸ می باشد یعنی در مقابل هر یکصد بیمار زن ۱۲۸ بیمار مرد وجود دارد(۱۰) .

و از تعدادکل ۶۷۷ و ۱۰۵۷ مورد سرطان خون ثبت شده به ترتیب در زنان و مردان ،فراوانی انواع شایع مرفولوژیک آن ها برابر ۲۳/۲ ٪ لوسمی لنفوبلاستی حاد و ۲۴/۳ ٪ لوسمی میلوئیدی حاد در زنان و ۲۱٪ لوسمی لنفوبلاستی حاد و ۱۹/۸ ٪ لوسمی میلوئیدی حاد در مردان می باشد .

همچنین در ایالات متحده آمریکا سرطان بعد از بیماریهای قلبی – عروقی دومین علت شایع مرگ و میرمی باشد .۷۰ هزار مورد جدید سرطان هر ساله در کشور پیدا می شود و قریب ۲۵۰ هزار نفر با آن زندگی می کنند . به علت بکار گیری داروهای ضد سرطان بقای بیماران در چند سال گذشته افزایش یافته است . این داروها منجر به فروکش نشانه ها می شوند و از پیشرفت بیماری جلوگیری می کنند و بیماران تا اندازه ای درمان می شوند (۱۰).

۱-۳- تعریف سرطان

سرطان یا فنوتیپ بدخیم یک سلول ،نتیجه نهایی مجموعه ای از تغییرات ژنتیکی است که موانع حفاظتی محدود کننده رشد سلول و آپوپتوز را از میان برمی دارد و ویژگی های جدیدی نظیر افزایش گیرنده های سطحی برای اتصال به غشای پایه ،استفاده از سیتوکاین هایی برای تسهیل جابجایی ،و ایجاد عوامل رگ زا و عروق حیاتی جدید به منظور تامین مواد مغذی و اکسیژن ، القا می کند که به سلول قابلیت متاستاز می دهد.این تغییرات ژنتیکی معمولا" عبارتند از: ناهنجاری در بروز یا فعالیت ژن های خاصی موسوم به پروتواونکوژن ها (غالبا فاکتورهای رشد یا گیرنده های آنها ،آنزیم های مربوط به مسیرهای رشد یا فاکتور های نسخه برداری) ، حذف یا غیرفعال شدن ژن های سرکوبگر تومور و نقص در آنزیم های ترمیم کننده DNA . این تغییرات ژنتیکی ممکن است از طریق جهش نقطه ای ،ازدیاد ژنی ،باز آرایی ژنی ،یا تغییرات اپی ژنیک نظیر تغییر متیلاسیون ژن رخ دهند(۵) .

در سلولهای بدخیم ،کینتیکهای رشد مشابه سلولهای طبیعی است ولی فاقد نظم و ترتیب است . سرطان از نظر بالینی هنگامی تشخیص داده می شود که توده توموری بزرگ ولی رشد آن کاهش یافته است . یعنی باافزایش توده تومور ، زمان دو برابر شدن سلول به تدریج طولانی می گردد و درصد سلولهای تقسیم شونده به علت نرسیدن ماده غذایی لازم برای رشد، کاهش پیدا می کند و به این ترتیب حساسیت به داروهای شیمیایی کاهش می یابد .

در تومورهای مختلف درصد سلولهایی که در حال تقسیم هستند فرق دارد به طوریکه در تومورهای جامد (توپر) ۲۵ ٪ سلولها و در تومورهای مایع حدود ۷۰٪ سلولها در حال تقسیم هستند و بقیه در فاز G0 یا استراحت می باشند . متاسفانه رشد تومور قبل از رسیدن آن به یک حجم کشنده ،معمولا" به طور کامل متوقف نمی شود(۵و۳) .

۱-۴- سیکل سلولهای سرطانی

سلولهای سرطانی همان مراحل چرخه سلولی را طی می کنند که در چرخه سلولهای طبیعی دیده می شود :G1 (دوره آماده سازی برای سنتز DNA) S (سنتزو دوبرابر شدن DNA) G2 (فاز تتراپلوئیدی قبل از میتوز که در آن سلامت و یکپارچگی همانندسازی DNA ارزیابی می شودو سلول، RNA نیز

می سازد) ، وM (میتوز). بعضی از سلولهایی که وارد این چرخه نمی شوند ،ممکن است برای مدتهای طولانی در مرحله G0 یا استراحت باقی بمانند .در سرطانهای گوناگون انسانی، طول مدت سنتز (S) حدوداً یکسان و از ۱۰ تا۲۴ ساعت ،طول مدت تولید سلولی یا میتوز از ۱۲ ساعت تا ۵ روز و زمان دو برابر شدن از ۱۰ روز تا هزار روز متغیر است . بعضی از داروهای شیمی درمانی مخصوص سلولهایی هستند که در مراحل خاصی از چرخه سلولی قرار دارند ،این واقعیت در طراحی رژیم های شیمی درمانی موثر ،اهمیت زیادی دارد . داروهای شیمی درمانی بر حسب نوع دارو و نوع تومور می توانند زمان تولید سلولی و درصد سلولهای در حال تولید را تغییر دهند (۵و۳) .

۱-۵- تغییرات سرطان

متعاقب عفونت با یک ویروس اونکوژن و وقوع ترانسفورماسیون بدخیم، تغییراتی در سلولها ایجاد می شود که عبارتند از :

- تغییرات مورفولوژی : سلولهای تغییر یافته اغلب شکل گرد تری نسبت به سلولهای کنترل دارند.
- افزایش تراکم سلولی : سلولهای تغییر یافته اغلب به صورت چند لایه وجود دارند ، در حالی که سلولهای کنترل یک لایه ای هستند .
- سلولهای تغییر یافته می توانند بدون چسبیدن به سطح ظرف کشت و بر روی هم رشد کنند ،در حالیکه سلولهای طبیعی به محض تماس یافتن به هم ،رشد خود را متوقف می کنند .

- تغییرات بیوشیمیایی : شامل افزایش میزان گلیکولیز ،تغییر در محتوای گلیکوپروتئینها یا گلیکو اسفنگو لیپیدها و ترشح پروتئاز های خاص
- تغییرات در اسکلت سلولی : نظیر فیلامان های اکتین
- کاهش نیاز به فاکتور های رشد و افزایش ترشح انواع خاصی از فاکتور های رشد به محیط اطراف (۵)

سلول های سرطانی با سه ویژگی زیر مشخص می گردند :

۱- افزایش رشد لجام گسیخته ۲ – تهاجم به بافت های موضعی ۳-انتشار یا متاستاز به سایر قسمت های بدن . (۶)

۱-۶- عوامل موثر در ایجاد سرطان

عواملی که ایجاد سرطان می نمایند ، در سه گروه وسیع جای می گیرند : انرژی تشعشعی ،ترکیبات شیمیایی و ویروسها .

اشعه ماورای بنفش ،اشعه X و اشعه گاما همگی موتاژن و سرطانزا هستند . این اشعه ها به طرق مختلف به DNA آسیب می رسانند . اشعه ماورای بنفش ممکن است موجب تشکیل دیمر های پیریمیدین گردد ،یا با حذف باز های خاص ، محل های فاقد پورین و پیریمیدین تشکیل گردد و یا اینکه شکست های یک و دو رشته ای یا اتصال متقاطع DNA دیده شود . اشعه X و اشعه گاما علاوه بر اثرات مستقیم بر روی DNA ،موجب تشکیل رادیکال های آزاد در بافت ها می شوند . OH ،سوپر اکساید و سایر رادیکال های حاصله می توانند با DNA و سایر ماکرو مولکولها واکنش دهند و منجر به آسیب مولکولی گردند و بدین طریق به اثرات سرطانزایی انرژی تشعشعی کمک نمایند(۶) .

همچنین انواع زیادی از ترکیبات شیمیایی سرطانزا هستند . ۸۰ ٪ از سرطان های انسانی به وسیله عوامل محیطی به خصوص مواد شیمیایی به وجود می آیند . تماس با این ترکیبات می تواند به علل زیر باشد :

اقتضای شغلی (تماس با بنزن آزبست)، نوع تغذیه (آفلاتوکسین B1 ،که توسط قارچ آسپر ژیلوس فلاووس تولید می شود گاهی به عنوان آلوده کننده بادام زمینی و سایر مواد غذایی عمل می کند) شیوه زندگی (استعمال سیگار و مصرف بعضی داروها)

اکثر مواد شیمیایی سرطان زا ، موتاژن نیز هستند . این موضوع با استفاده از روش اندازه گیری Ames و سایر تستها ثابت شده است(۶) .

در اعضای خاصی نظیر پوست و کبد ، روند سرطانزایی حداقل به دو مرحله تقسیم می شود :

۱) مرحله شروع – این مرحله سریع و غیر قابل برگشت است که منجر به تغییر غیر قابل برگشت در DNA و سپس یک یا چند موتاسیون می شود .
۲) مرحله پیش برنده – این مرحله کند است و ماه ها و سالها طول می کشد .

ثابت شده است اگر نواحی یکسانی از پوست گروهی از موشها را یکبار با بنزو پیرن رنگ آمیزی کنند و متعاقب آن ماده دیگری مورد استفاده قرار نگیرد تومور پوستی بوجود نخواهد آمد . ولی اگر پس از استعمال بنزو پیرن چندین بار روغن کروتون (croton) استفاده شود ،تومور پدید خواهد آمد .

همچنین استعمال روغن (croton) به تنهایی (بدون تجویز بنزو پیرن) نیز تومور پوستی ایجاد نمی کند(۶) .

تعداد زیادی از ترکیبات شامل فنوبار بیتال و ساخارین ، می توانند در اعضای مختلف بدن به عنوان ماده پیش برنده عمل کنند . ماده فعال موجود در روغن croton ،مخلوطی از استرهای فوربول است . فعال ترین استر فوربول ،ماده ای به نام ۱۲–۰– تترا دکانوایل فوربول –۱۳–استات (TPA) است که اثرات متعددی دارد . جالب ترین یافته آن است که پروتئین کیناز C (PKC) به عنوان گیرنده ای برای TPA عمل می کند و منجر به فسفوریلاسیون تعدادی از پروتئین های غشایی شده و این سیگنال های غشایی موجب اثراتی بر روی پیش برنده های توموری می شوند و احتمالا" این پیش برنده ها از طریق ایجاد تغییر در بروز ژن ، سلول توموری ایجاد می کنند و DNA ، ماکرو مولکول حیاتی در روند سرطانزایی است(۶) .

بعضی از DNA و RNA ویروسها ،سرطانزا هستند . ویروسهای اونکوژن ،دارای ژنومی از نوع DNA و RNA هستند . پولیوما ویروس و ویروس های SV40 که هر دو کوچک و دارای ژنومی در حدود ۵ Kb می باشندو ژنوم شبکه ای آنها تنها در حدود ۶– ۵ پروتئین را کد می کند، تحت شرایط خاصی ،پس از ایجاد عفونت در سلولهای مناسب می تواند با دخالت پروتئین های اختصاصی (که اغلب آنتی ژن نامیده می شوند) و اتصال محکم آنها به DNA ، ترانسفورماسیون بد خیم ایجاد کنند .به ژنها یی از ویروسها که مولد تومور می باشند ،اونکوژن های ویروسی می گویند و پروتو اونکوژن ها توسط مکانیزم های خاص فعال شده و به اونکوژن ها تبدیل می گردند(۶) .