دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

عنوان پایان‌نامه:

بررسی اثرات آویپرین و آویپرین ۳-O-گلوکوزید در القاء مرگ برنامه‌ریزی شده در رده سلول سرطانی پروستات انسان

اساتید را هنما:

دکتر صابر زهری

دکتر سید مهدی رضوی

استاد مشاور:

مهندس فرشاد حسن زاده

توسط:

زهرا معتمد

زمستان ۱۳۸۸

نام خانوادگی دانشجو : معتمد **نام** : زهرا

عنوان پایان نامه : بررسی اثر آویپرین و آویپرین ۳-O-گلیکوزید مشتق از گیاه *Prangos uloptera* در القاء مرگ برنامه‌ریزی شده در رده سلولی سرطانی انسان

اساتید راهنما : دکتر صابر زهری و دکتر سید مهدی رضوی

استاد مشاور : مهندس فرشاد حسن‌زاده

مقطع تحصیلی: کارشناسی‌ارشد **رشته**: زیست‌شناسی **گرایش**: علوم جانوری

دانشگاه : محقق اردبیلی **دانشکده** : علوم **تاریخ فارغ التحصیلی**: ۱۳۵۸۸/۱۱/۲۰ **تعداد صفحه** : ۸۷

کلید واژه ها : آپوپتوزیس، سیتوتوکسیسیتی ، HeLa ، LNCaP ، آویپرین ، آویپرین‌گلیکوزید

چکیده : بر اساس تحقیقات صورت گرفته، ترکیبات گیاهی دارای اثرات فارماکولوژی و دارویی فراوانی هستند. در این تحقیق، پودر ریشه گیاه *Prangos uloptera* با دستگاه سوکسیله، توسط حلال‌های n-hexan، dichloromethan و methanol عصاره‌گیری شد. عصاره متانولی درفشارپایین ودردمای ۴۵° سانتی‌گراد قرارگرفت تانهایتا یک ماده صمغی شکل مشاهده شد. بخشی از این ماده به وسیله کارتریج SPE-C 18 و با استفاده از محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف متانول و آب فراکسیونه شد. فراکسیون‌ها با تست analytical و با استفاده از preparative HPLC بایک برنامه‌ریزی مشخص مورد تجزیه قرارگرفتند. آنالیزHPLC منجر به شناسایی آویپرین وآویپرین‌گلیکوزید شد. قدرت آنتی‌اکسیدانی این دو ترکیب به وسیله آزمون DPPH مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که آویپرین قدرت آنتی‌اکسیدانی قوی و آویپرین‌گلیکوزید قدرت آنتی‌اکسیدانی ضعیفی داشت. همچنین اثر سیتوتوکسیک و ضدتکثیری این ترکیبات توسط آزمون‌های MTT و تریپان‌بلو مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بعداز تیمار ۱۶ ساعته، آویپرین سلول‌های سرطانی LNCaP وHeLa را با IC50 برابر با ۰/۴۱ و۰/۲۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مهار کرد. از طرف دیگر آویپرین‌گلیکوزیدبر روی سلول‌های سرطانی LNCaP هیچ تاثیری نداشت؛ درحالیکه، این ترکیب سلول‌های HeLa را با IC50 برابر با ۰/۳۳mg/ml مهار کرد. علاوه براین، بررسی DNA سلول‌های تیمار شده بر روی ژل آگاروز حاکی‌از آن بود که، آویپرین در غلظت ۰/۴ mg/ml قادر به ایجاد DNA fragmentation بوده است. در حالی‌که این ترکیب به مقدارجزئی موجب القاء DNA fragmentation در سلول‌های HeLa شد. همچنین آویپرین‌گلیکوزید ، به مقدار جزئی موجب القاء DNA fragmentation در سلول‌های HeLa گردید. مطالعات بیشتر سلول‌های HeLa، تیمار شده با آویپرین و آویپرین-گلیکوزید، به وسیله رنگ‌آمیزی باآکریدین‌اورنج نیز نتایج بررسی ژل آگاروز را تایید نمود.

فهرست مطالب :

فصل اول : مقدمه و تاریخچه

۱- مقدمه ۱

۱-۱- سرطان ۱

۱-۱-۱- عوامل موثر در رشد بدخیمی..... ۲

۲-۱-۱- زیست شناسی سرطان ۲

۳-۱-۱- اصول ژنتیکی سرطان ۳

٤-۱-۱- ژن‌ها و جهش‌های موثر در بروز رشد سرطانی ۳

۱-٤-۱-۱- انکوژن‌ها ٤

۲-٤-۱-۱- ژن‌های مهار کننده تومور ۵

۵-۱-۱- بررسی سرطان پروستات از دیدگاه پزشکی ٦

٦-۱-۱- بررسی سرطان پروستات از دیدگاه ژنتیکی ۷

۲-۱- مرگ سلولی آپوپتوزیس و نکروزیس ۸

۱-۲-۱- عملکرد فیزیولوژیکی آپوپتوزیس ۹

۲-۲-۱- آپوپتوزیس در بیماری ۱۰

۳-۲-۱- مشخصات عمومی سلول‌های آپوپتوتیک..... ۱۱

٤-۲-۱- مسیر آپوپتوزیس..... ۱۲

۱-٤-۲-۱- مسیر خارجی آپوپتوزیس..... ۱٤

۲-٤-۲-۱- مسیر داخلی آپوپتوزیس..... ۱٤

۵-۲-۱- تنظیم مسیرداخلی از طریق پروتئین‌های خانواده Bcl2..... ۱۵

٦-۲-۱- نقش رسپتورهای مرگ سطح سلول در فعال کردن مسیر خارجی آپوپتوزیس..... ۱۹

۷-۲-۱- نقش کاسپازها در آپوپتوزیس..... ۲۱

۸-۲-۱- نقش پروتئین‌های مهارکننده آپوپتوز بر عملکرد کاسپازها..... ۲۲

۳-۱- مشخصات و خواص کومارین‌ها..... ۲۲

۱-۳-۱- درمان با کومارین‌ها و فلاونوئیدها..... ۲۳

۲-۳-۱- تقسیم‌بندی کومارین‌ها..... ۲٤

٤-۱- مشخصات گیاه *Prangos uloptera*..... ۲٦

۱-٤-۱- مشخصات گیاه‌شناسی و جغرافیایی..... ۲٦

۲-٤-۱- اثرات دارویی جاشیر..... ۲٦

۵-۱- مروری بر تحقیقات گذشته..... ۲۸

فصل دوم : مواد و روش‌ها

۲- مواد و روش‌ها..... ۳۷
۱-۲- ابزار مورد استفاده..... ۳۷
۲-۲- رده سلولی..... ۳۷
۳-۲- مواد مورد استفاده..... ۳۷
۱-۳-۲- بافر PBS..... ۳۷
۲-۳-۲- محیط کشت RPMI 1640..... ۳۷
۳-۳-۲- آنتی‌بیوتیک..... ۳۸
٤-۳-۲- محیط کشت فریزینگ..... ۳۸
۵-۳-۲- تریپان‌بلو..... ۳۸
٦-۳-۲-MTT..... ۳۸
۷-۳-۲- بافر گلایسین..... ۳۸
۸-۳-۲- محلول EDTA (۰/۵ مولار)..... ۳۹
۹-۳-۲- بافر TBE 5X..... ۳۹
٤-۲- روش‌ها..... ۳۹
۱-٤-۲- تعویض محیط کشت..... ۳۹
۲-٤-۲- کشت مجدد سلول‌ها..... ۳۹
۳-٤-۲- ذخیره و نگهداری بلند مدت سلول‌ها..... ٤۰
٤-٤-۲- حیات مجدد سلول‌ها..... ٤۲
۵-٤-۲- شمارش سلول‌ها با تریپان‌بلو..... ٤۳
٦-٤-۲- بررسی اثر سیتوتوکسیسیتی آویپرین و آویپرین‌گلیکوزید بر روی رده سلولی LNCaP و HeLa به وسیله شمارش سلول‌ها با تریپان‌بلو..... ٤۳
۷-٤-۲-سنجش حیات سلول‌ها با آزمون MTT..... ٤٤
۸-٤-۲- بررسی اثر سیتوتوکسیسیتی آویپرین و آویپرین‌گلیکوزید برروی رده سلولی LNCaP و HeLa با آزمون MTT..... ٤٤
۹-٤-۲- بررسی DNA fragmentation ٤۵
۱-۹-٤-۲- استخراج DNA..... ٤۵
۲-۹-٤-۲- الکتروفورزDNA برروی ژل آگاروز..... ٤٦
۳-۹-٤-۲- روش‌های آشکارسازی DNA..... ٤٦
۱۰-٤-۲- بررسی اثرآنتی‌اکسیدانی آویپرین و آویپرین‌گلیکوزید..... ٤۷
۱۱-٤-۲- بررسی تغییرات سلول‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی فلورسنت..... ٤۸

۱۲-٤-۲- استخراج و تشخیص آویپرین و آویپرین‌گلیکوزید.....٤۸
فصل سوم : نتایج
۳- نتایج.....۵۰
۱-۳- بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی آویپرین وآویپرین‌گلیکوزید.....۵۰
۲-۳- بررسی اثرات سیتوتوکسیسیتی و ضدتکثیری آویپرین‌گلیکوزید بر روی لاین سلولی HeLa LNCaP.....۵۱
۱-۲-۳- بررسی کسر ماندگاری سلول‌ها با آزمونMTT.....۵۱
۱-۱-۲-۳- نتایج حاصل از آزمونMTT توسط تاثیر آویپرین بر روی لاین‌های سلولی LNCaP و HeLa.....۵۲
۲-۱-۲-۳- نتایج حاصل از تاثیر آویپرین‌گلیکوزید توسط آزمونMTT بر روی دودمان‌های سلولیLNCaP و HeLa.....۵٦
۲-۲-۳- بررسی حیات سلول‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو.....٦۰
۱-۲-۲-۳- نتایج حاصل از تاثیر آویپرین توسط رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو بر روی دودمان‌های سلولیLNCaP و HeLa.....٦۱
۲-۲-۲-۳- نتایج حاصل از تاثیر آویپرین‌گلیکوزید توسط رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو بر روی دودمان‌های سلولیLNCaP و HeLa.....٦۳
۳-۲-۳- مطالعات مورفولوژیکی سلول‌های تیمار شده بااستفاده از میکروسکوپ فلورسنت اینورت.....٦۵
۳-۳- مطالعه القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی توسط آویپرین و آویپرین‌گلیکوزید.....٦۹
۱-۳-۳- بررسیDNA سلول‌ها برروی ژل آگاروز.....۷۰
۲-۳-۳- رنگ‌آمیزی سلول‌هایHeLa با آکریدین اورنج و مشاهده تغییرات هسته با میکروسکوپ فلورسنت.....۷۱
٤-۳- بررسی اثرات سیتوتوکسیسیتی و ضدتکثیری Prangenin بر روی رده سلولی HeLa ۷۳
۱-٤-۳- بررسی کسر ماندگاری سلول‌ها با استفاده از آزمونMTT ۷۳
۲-٤-۳- بررسی تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ اینورت ۷٤
فصل چهارم : بحث
٤- بحث.....۷۵
۵- منابع.....۸۰

فهرست شکل‌ها :

شکل ۱–۱ : مقایسه‌ای شماتیک از آپوپتوزیس ونکروزیس ۹
شکل ۱–۲ : آپوپتوزیس در بیماری‌های انسانی..... ۱۰
شکل ۱–۳ : مسیرهای داخلی و خارجی سلولی که منجر به آپوپتوزیس می‌شوند. ۱۳
شکل ۱–٤– مسیر درون سلولی آپوپتوزیس..... ۱۵
شکل ۱–۵ : نقش پروتئین‌های پروآپوپتوتیک (BH(1-2-3 در مسیر داخلی آپوپتوزیس..... ۱۷
شکل ۱–٦ : فعال شدن مسیر داخلی آپوپتوزیس..... ۱۸
شکل ۱–۷ : فعال شدن مسیر خارجی آپوپتوزیس از طریقFas death receptors..... ۲۰
شکل ۱–۸ : تقسیم‌بندی بنزوپیرون‌ها بر اساس ساختار شیمیایی..... ۲٤
شکل ۲–۱ : ساختمان اتیدیوم‌بروماید ونحوه اتصال آن بهDNA ٤۷
شکل ۳–۱ : بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی آویپرین و آویپرین‌گلیکوزید..... ۵۱
شکل ۳–۲ : بررسی غلظت‌های ۰، ۰/۰۵ ، ۰/۱ ، ۰/۲ و ۰/٤ میلی‌گرم درمیلی‌لیترآویپرین بر روی لاین سلولی LNCaP ۵۲
شکل ۳–۳ : بررسی غلظت‌های ۰، ۰/۰۵ ، ۰/۱ ، ۰/۲ و ۰/٤ میلی‌گرم درمیلی‌لیترآویپرین بر روی لاین سلولی LNCaP ۵۳
شکل ۳–٤ : بررسی غلظت‌های ۰، ۰/۰۵ ، ۰/۱ ، ۰/۲ و ۰/٤ میلی‌گرم درمیلی‌لیترآویپرین بر روی لاین سلولی HeLa.....٥٤
شکل ۳–۵ : بررسی غلظت‌های ۰، ۰/۰۵ ، ۰/۱ ، ۰/۲ و ۰/٤ میلی‌گرم درمیلی‌لیترآویپرین بر روی لاین سلولی HeLa ٥٤
شکل ۳–٦ : بررسی مقایسه‌ای اثر غلظت‌های ۰ ،۰/۰۵ ،۰/۱ ، ۰/۲ و ۰/٤میلی‌گرم در میلی‌لیتر آویپرین برروی لاین‌های سلولی LNCaP و HeLa ۵۵
شکل ۳–۷ : بررسی غلظت‌های ۰، ۰/۰۵ ، ۰/۱ ، ۰/۲ و ۰/٤ میلی‌گرم درمیلی‌لیترآویپرین‌گلیگوزید بر روی لاین سلولی LNCaP ۵۷
شکل ۳–۸ : بررسی غلظت‌های ۰، ۰/۰۵ ، ۰/۱ ، ۰/۲ و ۰/٤ میلی‌گرم درمیلی‌لیترآویپرین‌گلیگوزید بر روی لاین سلولی LNCaP ۵۷
شکل ۳–۹ : بررسی غلظت‌های ۰، ۰/۰۵ ، ۰/۱ ، ۰/۲ و ۰/٤ میلی‌گرم درمیلی‌لیترآویپرین‌گلیکوزید بر روی لاین سلولی HeLa ۵۸
شکل ۳–۱۰ : بررسی غلظت‌های ۰، ۰/۰۵ ، ۰/۱ ، ۰/۲ و ۰/٤ میلی‌گرم درمیلی‌لیترآویپرین‌گلیکوزید بر روی لاین سلولی HeLa ۵۹
شکل ۳–۱۱ : بررسی مقایسه‌ای اثر غلظت‌های ۰ ،۰/۰۵ ،۰/۱ ، ۰/۲ و ۰/٤میلی‌گرم در میلی‌لیتر آویپرین‌گلیکوزید بر روی برروی لاین‌های سلولیLNCaP و HeLa ۵۹
شکل ۳–۱۲ : بررسی غلظت‌های ۰، ۰/۰۵ ، ۰/۱ ، ۰/۲ و ۰/٤ میلی‌گرم درمیلی‌لیترآویپرین بر روی لاین سلولی LNCaP..٦۱
شکل ۳–۱۳ : بررسی غلظت‌های ۰، ۰/۰۵ ، ۰/۱ ، ۰/۲ و ۰/٤ میلی‌گرم درمیلی‌لیترآویپرین بر روی لاین سلولی HeLa.....٦۲
شکل ۳–۱٤ : بررسی غلظت‌های ۰، ۰/۰۵ ، ۰/۱ ، ۰/۲ و ۰/٤ میلی‌گرم درمیلی‌لیترآویپرین‌گلیکوزید بر روی لاین سلولی LNCaP.....٦۳

شکل ۳-۱۵ : بررسی غلظت‌های ۰ ،۰/۰۵ ، ۰/۱ ، ۰/۲ و ۰/٤ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آویپرین‌گلیکوزید برروی لاین سلولی HeLa ٦٤
شکل ۳-۱٦ : بررسی مقایسه‌ای اثر غلظت‌های ۰ ،۰/۰۵ ،۰/۱ ، ۰/۲ و ۰/٤میلی‌گرم در میلی‌لیتر آویپرین‌گلیکوزید بر روی برروی لاین‌های سلولیLNCaP و HeLa ٦٥
شکل ۳-۱۷ : تصاویر مورفولوژیکی تاثیرغلظت‌های مختلف آویپرین برروی لاین سلولیLNCaP ٦٦
شکل ۳-۱۸ : تصاویر مورفولوژیکی تاثیر غلظت‌های مختلف آویپرین برروی لاین سلولیHeLa ٦٧
شکل ۳-۱۹ : تصاویر مورفولوژیکی تاثیرغلظت‌های مختلف آویپرین‌گلیکوزید برروی لاین سلولیLNCaP ٦٨
شکل ۳-۲۰ : تصاویر مورفولوژیکی تاثیرغلظت‌های مختلف آویپرین‌گلیکوزید برروی لاین سلولیHeLa ٦٩
شکل ۳-۲۱ : بررسی الگوی DNA ۷۰
شکل ۳-۲۲ : بررسی الگوی DNA ۷۱
شکل ۳-۲۳ : بررسی تصاویر میکروسکوپی رنگ‌آمیزی سلول‌های HeLa تیمار شده با آویپرین توسط آکریدین‌اورنج ...۷۲
شکل ۳-۲٤ : بررسی تصاویر میکروسکوپی رنگ‌آمیزی سلول‌های HeLa تیمار شده با آویپرین‌گلیکوزید توسط آکریدین‌اورنج ۷۲
شکل ۳-۲۵: بررسی غلظت‌های ۰، ۰/۰۵ ، ۰/۱ ، ۰/۲ و ۰/٤ میلی‌گرم درمیلی‌لیتر پرانژنین بر روی لاین سلولی HeLa ۷۳
شکل ۳-۲٦ : بررسی غلظت‌های ۰، ۰/۰۵ ، ۰/۱ ، ۰/۲ و ۰/٤ میلی‌گرم درمیلی‌لیترآویپرین‌گلیکوزید بر روی لاین سلولی HeLa ۷٤

فهرست جداول :

جدول ۳-۱ : نتایج مربوط به آزمونMTT . بررسی تاثیر آویپرین بر روی سلول‌های LNCaP و HeLa.....۵۶
جدول ۳-۲ : نتایج مربوط به آزمونMTT . بررسی تاثیر آویپرین‌گلیکوزید بر روی سلول‌های LNCaP و HeLa ۶۰

:

۱- مقدمه

امروزه بیماری سرطان به عنوان یکی از عوامل اصلی مرگ و میر انسان‌ها در جوامع می‌باشد. حضور آلاینده‌های محیطی و زمینه‌های ژنتیکی، باعث اختلال در چرخه سلولی شده و آسیب در Checkpoint های چرخه مذکور می‌تواند عواقب وخیمی از لحاظ تنظیم چرخه تکثیر به جای گذارد. روش‌های مختلفی جهت غلبه بر این رویداد زیست شناختی مفروض است:

۱- توقف چرخه سلولی در سلول‌های آسیب دیده که چرخه تکثیر مداوم دارند.

۲- حذف سلول‌هایی که علایم تکثیر بدخیم رانشان می‌دهند.

روش دوم بیشترین کاربرد را داشته است. استفاده از عمل جراحی پاسخگوی کافی در حذف بدخیمی نیست. زیرا، سلول‌های بدخیم دارای خاصیت متاستاز بوده و در سایر بافت‌ها منتشر می‌شوند. لذا اگر بتوان به روشی موثر در ایجاد مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول‌های بدخیم دست‌یافت، می‌توان به آینده مهار این سلول‌ها امیدوار بود.

با گسترش روزافزون توجه به ترکیبات طبیعی در مهار تکثیر سلولی، بررسی ویژگی‌های سیتوتوکسیک برخی از ترکیبات گیاهی ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این تحقیق، بررسی اثر سیتوتوکسیک و ضدتکثیری دو ترکیب فورانوکومارینی آویپرین و آویپرین ۳-O-گلیکوزید تهیه شده از گیاه *Prangos uloptera*، بر روی سلول‌های سرطانی پروستات LNCaP و سلول‌های سرطانی دهانه رحم HeLa می‌باشد.

۱-۱- سرطان

سرطان اختلال ژنتیکی است که در آن کنترل طبیعی تکثیر سلولی از بین می‌رود. مکانیسم اساسی در تمام سرطان‌ها، جهش در سلول‌ها می‌باشد. در مورد فرآیند ژنتیکی سرطان و عوامل محیطی که می‌توانند با تغییر DNA منجر به بدخیمی شوند هنوز نکات زیادی وجود دارد که باید معلوم شوند. از ویژگی‌های مهم سلول-های سرطانی که در شرایط in vivo و in vitro مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، فقدان کنترل تکثیر سلولی است. تکثیر سلولی به وسیله شبکه پیچیده‌ای از سیگنال‌ها و پیام‌ها شامل فاکتورهای رشد، سیتوکین‌ها و هورمون‌ها تنظیم می‌شود که بروز جهش در این شبکه و تجمع جهش‌ها باعث تکثیر فزآینده سلولی و در نتیجه ایجاد سرطان خواهد شد (۱).

۱-۱-۱- عوامل موثر در رشد بدخیمی

محیط و عوامل بیوشیمیایی نقش مهمی در ایجاد سرطان دارند. خطر ابتلا به سرطان در میان جمعیت‌های متفاوت و در یک جمعیت و محیط‌های متفاوت گوناگونی زیادی نشان می‌دهد، مثلاً: میزان شیوع سرطان معده در بین ژاپنی‌های ساکن ژاپن در مقایسه با ژاپنی‌های ساکن آمریکا و هاوایی حدود سه برابر بیشتر است. بنابراین به نظر می‌رسد که بخش قابل توجهی از خطر ابتلا، به وجود مواد سرطانزای محیطی بستگی دارد. طبیعت سرطانزای محیطی، ارزیابی خطر اضافی ناشی از مواجهه با این مواد و راه‌های حفاظت جمعیت در برابر این چنین آسیب‌ها، از مواردی است که بسیار مورد توجه عموم است. با آن که بر ژنتیکی بودن سرطان تأکید فراوانی می‌شود، ولی در نظر گرفتن نقش محیط درسرطان با این امر تناقض ندارد. عوامل محیطی مانند مواد جهش‌زا عمل می‌کنند و موجب جهش‌های سوماتیک می‌شوند، جهش‌های سوماتیک نیز به نوبهٔ خود عامل سرطان‌زایی هستند. طبق برخی از برآوردها، به نظر می‌رسد که ۷۵ درصد خطر ابتلا به سرطان منشأ محیطی دارد (۲).

عامل‌های بیوشیمیایی می‌توانند حساسیت به سرطان‌زاهای محیطی را رقم زنند. مثلا فعالیت گلوتاتیون ـs ـ ترانسفراز موجب افزایش خطر ابتلا به سرطان ریه در سیگاری‌ها می‌شود (۳).

۱ـ۱ـ۲ـ زیست‌شناسی سرطان

سرطان بیماری واحدی نیست بلکه بیشتر نامی است که برای انواع بسیار نئوپلازی‌ها[1] به کار می‌رود. فرآیند بیماری که با تکثیر کنترل نشده سلولی منجر به توده یا تومور می‌شود، برای اینکه سرطان تلقی شود باید بدخیم[2] باشد، یعنی تومور قدرت تهاجم و متاستاز به بافت‌های مجاور و گسترش به نواحی دورتر را داشته باشد. تومورهایی که متاستاز نمی‌دهند سرطانی نیستند ولی به عنوان تومور خوش‌خیم[3] تلقی می‌شوند، اگر چه اندازه و محل قرارگیری آن ممکن است دردناک باشد (۲).

سرطان سه شکل عمده دارد که عبارتند از:

(۱) سارکوم‌ها، که در آن‌ها تومور از بافت‌های مزانشیم پدید می‌آید مثل استخوان، عضله و بافت همبند.

(۲) کارسینوم‌ها، که از بافت‌های اپی تلیال (پوششی) منشاء می‌گیرند، مثل سلول‌های پوشاننده روده، برونش و مجاری پستان.

(۳) بدخیمی‌های مربوط به سیستم‌های خون‌ساز و لنفوئیدی مثل لوسمی‌ها و لنفوم‌ها که در سرتاسر مغز استخوان، سیستم‌لنفی و خون محیطی گسترش می‌یابند (۲).

۳-۱-۱- اصول ژنتیکی سرطان

فرآیند تقسیم سلولی و مرگ سلولی توسط طیف وسیعی از ژن‌ها تنظیم می‌شود. تحقیقات نشان داده است که وقوع جهش در ژن‌های کنترل‌کننده تکثیر و مرگ سلول، مسئول سرطان می‌باشد. در اغلب سرطان‌ها، جهش در یک سلول سوماتیک منفرد رخ می‌دهد که سپس تقسیم شده و به سوی ایجاد سرطان پیش می‌رود. به طور نادرتر، سرطان به عنوان بخشی از یک سندروم سرطان ارثی بروز می‌نماید. در این شرایط، جهش‌های سرطان‌زای اولیه از طریق رده‌های سلولی بنیادی به ارث می‌رسد و بنابراین قبلاً در تمام سلول‌های بدن وجود دارد. از آنجا که شروع سرطان همراه با جهش و آسیب در ژن‌های مسئول ترمیم DNA

---

[1]neoplasia [2]malignant [1] benign

است بنابراین بسته به میزان آسیب به ژن‌های ترمیم کننده DNA، تومورهای ایجادکننده از نظر درجه بدخیمی متفاوت هستند. بسته به نوع بدخیمی، تومورها حامل جهش‌هایی هستند که با دیگری متفاوت بوده ولی با جهش‌های منتقل شده در زیر رده‌های دیگر هم‌پوشانی دارند (۲).

٤-۱-۱- ژن‌ها و جهش‌های موثر در بروز رشد سرطانی

ایجاد سرطان از ویژگی‌های وراثتی سلول‌ها و نتیجه تغییرات ژنتیکی می‌باشد. تغییرات ژنتیکی متعددی برای تغییر شکل سلول‌ها از حالت طبیعی به حالت سرطانی و نهایتا برای متاستاز سلول‌ها لازم می‌باشد. ژن‌های دخیل در سرطان به دو گروه عمده تقسیم می‌شوند:

(۱) انکوژن‌ها[٤]

(۲) ژن‌های مهار کننده تومور[٥]

جهش‌ها همیشه در طی تقسیم سلولی رخ می‌دهند. انکوژن‌ها و ژن‌های مهارکننده تومور به طور ارثی نسبت به ژن‌های دیگر قابلیت جهش بیشتری ندارند. آنچه که جهش‌های سرطانی را از سایر انواع جهش‌ها متمایز می‌سازد نقش این جهش‌ها در تشدید تکثیر سلولی و افزایش توان بقای آن می‌باشد (۳). **۱-۱-٤-۱- انکوژن‌ها**

انکوژن‌ها شکل‌های تغییر یافته ژن‌های طبیعی (پروتوانکوژن‌ها) هستند که در رشد سلولی و مسیرهای تمایزی نقش کلیدی و محوری دارند. در سلول‌های طبیعی پستانداران، توالی‌های بازی از DNA وجود دارد که هم‌ساخت انکوژن‌های ویروسی هستند و همین ژن‌ها به نام پروتوانکوژن یا انکوژن‌های سلولی نامیده می‌شوند. اگرچه واژه‌های پروتوانکوژن یا انکوژن‌های سلولی استفاده یکسانی دارند ولی در واقع پروتوانکوژن برای ژن‌های طبیعی و انکوژن سلولی یا C- onc برای یک ژن جهش یافته پروتوانکوژن به کار می‌رود که دارای نشانه‌هایی شبیه انکوژن‌های ویروسی یا V-onc هستند. تاکنون در حدود ۳۰ انکوژن شناسایی شده است (۳و٤).

---

[4]Oncogenes [2] Tumor suppressor genes

سرطان دارای ویژگی‌هایی است که نشان می دهد در سطح سلولی، ازدست دادن کارکرد طبیعی فرآورده‌های انکوژن با نقش کنترل در تکثیر سلولی و تمایز در فرآیندی که به نام انتقال پیام خوانده می‌شود، سازگار است. انتقال پیام یک مسیر چند مرحله‌ای پیچیده از غشای سلولی به سیتوپلاسم و از آنجا به هسته سلول است که در خلال آن انواعی از فرآورده‌های پروتوانکوژن برای تکثیر و تمایز صحیح سلولی ضروری است. پروتوانکوژن‌ها در خلال تکامل زیستی به شدت حفظ و ابقاء شده‌اند و در انواع وسیعی از گونه‌های متفاوت حضور دارند. این امر نمایانگر آن است که فرآورده‌های پروتئینی آنها، احتمالاً واجد کارکردهای زیستی ضروری هستند (۳).

در فرآیند انتقال پیام، پروتوانکوژن‌ها درسه مسیر عمده ایفای نقش می‌کنند. نخستین مسیر، از طریق فسفوریلاسیون آمینواسیدهای سرین، ترئونین و تیروزین متعلق به پروتئین‌ها است که با انتقال گروه‌های فسفات از ATP صورت می‌گیرد. این امر، موجبات فعال کردن فعالیت کینازی این پروتئین‌ها و ایجاد جایگاه‌های مربوط برای پروتئین‌های هدف را فراهم آورده و به انتقال پیام می‌انجامد. از پیش انکوژن‌ها خانواده RAS مثالی از مسیر نوع دوم است که GTP آزی بوده و کارکرد آن به مثابه مولکولی است که در خلال چرخه GDP/GTP میانجیگری می‌کنند و انتقال پیام را از تیروزین کینازهای مجتمع با غشاء به سرین ترئونین کینازها، تقویت می‌کنند. مسیر سوم در قلمرو پروتئین‌هایی است که در هسته قرار دارند و در خلال چرخه سلولی؛ پیشرفت همانندسازی و بیان ژن‌ها را کنترل می‌کنند (۳).

۲-٤-۱-۱- ژن‌های مهارکننده تومور

در حالی‌که پروتئین‌های رمزگذاری شده توسط انکوژن‌ها، سرطان را معمولاً از طریق جهش‌های افزایش عملکرد یا به صورت بیان افزوده آلل یک ژن، به جلو می‌برند، ژن‌های متعدد دیگری وجود دارند که در آنها وقوع جهش با مکانیسم دیگری، یعنی به صورت کاهش عملکرد هردو آلل ژن، بر سرطان تأثیر می‌گذارند. این ژن‌ها به نام ژن‌های بازدارنده تومور معروفند. ژن‌های بازدارنده تومور بسیار ناهمگن هستند. بعضی از آن‌ها بازدارنده واقعی تومور هستند، یعنی مستقیماً در تنظیم چرخه سلولی یا در مهار رشد از راه تماس سلول

به سلول دخیل می‌باشند. بازدارنده‌های تومور به این صورت به عنوان دروازه‌بان[6] معروفند چرا که رشد سلول را به طور مستقیم تنظیم می‌نمایند. بعضی دیگر در ترمیم آسیب DNA و حفظ سلامت ژنومی دخالت دارند. از دست رفتن هر دو آلل ژن‌هایی که درترمیم آسیب DNA یا شکستگی کروموزوم دخالت دارند به طور غیرمستقیم توسط جهش‌های ثانوی دیگر جهت انباشت در پروتوانکوژن‌ها یا ژن‌های بازدارنده تومور دیگر باعث سرطان می‌شوند. چون ژن‌های بازدارنده تومور و فرآورده‌های آنها ماهیتاً نقش حفاظتی در برابر سرطان دارند، امید است که شناخت آنها در نهایت روش‌های درمانی ضد سرطان را بهبود بخشد. از جمله این ژن‌ها می‌توان به p53، RB، BRCA1 و BRCA2 اشاره نمود. این ژن‌ها در تنظیم تکثیر سلولی و ترمیم DNA نقش بسزایی دارند (۳).

۵-۱-۱- بررسی سرطان پروستات از دیدگاه پزشکی

سرطان پروستات نوعی بیماری است که در آن سلول‌های بدخیم از بافت‌های پروستات نشأت می‌گیرند و به طورنامنظم و فزآینده‌ای، تکثیر و منجر به افزایش حجم در هر یک از اجزای سلولی غده پروستات می‌شود. اطلاعات آماری و علائم بالینی میزان مرگ ومیرناشی از سرطان پروستات، مبین سه طیف گسترده روند رشد این بیماری است. سرطان پروستات می‌تواند دارای رشد آهسته بوده و زمانی طولانی تا بروز علائم بالینی آن داشته باشد. در مواردی دیگر تومور به سرعت رشد کرده و تهاجم تومور به بافت‌های دیگر امکان‌پذیر می‌شود. بین این دو طیف رشد، تومورهایی وجود دارند که سرعت روند رشد آن‌ها در حد متوسط است (۵ و٦).

علل ابتلا به سرطان هنوز ناشناخته است، اما تحقیقات آماری، روند بدخیمی بیماری سرطان پروستات را به این عوامل ارتباط می‌دهند:

(۱) سن

(۲) عوامل ژنتیکی

---

[6] gatekeeper

(۳) عوامل هورمونی

(٤) تغذیه

(۵) مواد شیمیایی

روش‌های درمانی که در مورد سرطان پروستات به کار می‌رود شامل:

(۱) جراحی و برداشتن کامل غده[۷]

(۲) کرایوتراپی

(۳) شیمی درمانی

(٤) رادیوتراپی

(۵) هورمون درمانی. از آنجا که هورمون تستوسترون موجب رشد سرطان غده پروستات می‌شود. برای درمان از داروهای ضد تستوسترون استفاده می‌شود که عمدتاً شامل تجویز قرص‌های حاوی استروژن می‌باشد (۵ و٦).

٦-۱-۱- بررسی سرطان پروستات از دیدگاه ژنتیکی

سرطان پروستات یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در میان مردان است. خطرابتلا به سرطان در طول زندگی مردان ۱۰ درصد واحتمال مرگ مبتلایان ۳ درصد می باشد. پژوهش‌های صورت گرفته روی تاریخچه خانوادگی در مردان مبتلا به سرطان پروستات نسبت قابل توجهی (حدود ۱۵ درصد) را در خویشاوندان درجه اول نشان داده است. مطالعات در سطح خانواده نشان داده است که خویشاوندان درجه اول یک مرد مبتلا به این سرطان، در مقایسه با جمعیت، دو تا پنج برابر بیشتر درمعرض ابتلا به این سرطان هستند. تجزیه و تحلیل موارد توموری سرطان پروستات، رخداد LOH [۸] را در محل‌های متعدد کروموزومی نشان داده

---

[7]prostatectomy

[8] Loss of hetrozygosity [2] locus [3] RNASE L

است. مطالعات قبلی پیشنهاد نموده است که یک جایگاه ژنی[9] سهمی معادل ۹ درصد از تمام سرطان‌های پروستات و تا ٤٠ درصد از سرطان‌های پروستات زود هنگام (زودتر از ۵۵ سالگی) را بر عهده دارد (۳).

مطالعات مرتبط با تحلیل پیوستگی، دو جایگاه مستعدکننده عمده را شناسایی کرده است که به نام‌های HPC1 و HPC2 شناخته شده است. علاوه بر این شماری از جایگاه‌های مستعدکننده نسبی دیگر نیز گزارش شده است. اخیراً در دو خانواده جهش‌هایی در ژن ریبونوکلئازL [10] شناسایی شده‌اند که با جایگاهHPC1 واقع در 1q11 پیوستگی نشان داده‌اند. جهش‌های شناخته شده در ژن ELAC2 در 17p11، جایگاه HPC2 و به ندرت، جهش‌هایی در سه ژنPTEN، MXI1 و KAI1 دراقلیتی از خانواده‌های مبتلا به سرطان پروستات خانوادگی نیز تعیین هویت شده‌اند. نسبت کوچکی از سرطان پروستات خانوادگی با BRCA1 یا BRCA2 مجتمع و همراه هستند. مردانی که حامل جهش‌هایی در BRCA1 یا BRCA2 می‌باشند دارای خطر بیشتری برای ابتلا به سرطان پروستات هستند (۳).

اگرچه اکثریت سرطان‌های پروستات در مردان پس از ٦۵ سالگی رخ می‌دهد، اما افرادی که دارای تاریخچه خانوادگی در ابتلا به سرطان پروستات هستند، خطر ابتلا به این سرطان در آن‌ها به طور قابل-ملاحظه‌ای در سنین کمتر از ۵۵ سالگی وجود دارد (۳).

۱ـ۲ـ مرگ سلولی آپوپتوزیس و نکروزیس

آپوپتوزیس یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، یک روند دقیق تنظیم شده برای از بین بردن سلول‌هایی با عملکرد ناقص و یا سلول‌هایی که بدن به آنها نیازی ندارد، می‌باشد. البته آپوپتوزیس می‌تواند سرانجام طبیعی برای یک سلول نیز باشد. اینکه سلول دچار آپوپتوز یا نکروز شود، بستگی به شدت آسیب وارده به سلول دارد. آپوپتوزیس یک فرآیند فعال بوده که به عنوان خودکشی سلول تعریف می‌شود و به وسیله انواع محرک‌های مختلف ایجاد می‌گردد. ازنشانه‌های مورفولوژیکی می‌توان به مواردی از قبیل: pyknosis هسته‌ای

، برجسته شدن[11] غشاء ، چروک خوردگی[12] و انقباض سیتوپلاسم ، شکستگی ژنوم سلولی و سرانجام ایجاد اجسام آپوپتوتیک اشاره کرد (شکل ۱-۱). برخلاف آپوپتوز، نکروز یک فرآیند غیرفعال تعریف می‌شود که به وسیله آسیب شدید سلولی ایجاد شده است. از نشانه‌هایی که برای نکروزیس می‌توان اشاره کرد، شامل: تورم هسته‌ای که منتهی به لیز شدن هسته می‌شود، از دست رفتن ساختار سیتوپلاسمی، بدشکلی و از هم گسیختگی اندامک‌های مختلف سلولی. علاوه براین در نکروز، آنزیم‌های سلولی نکروتیک آزاد می‌شود که منتهی به تخـریب و التهاب سلـول‌های اطراف می‌گردد (۷ و۸ و۹).

آپوپتوزیس روند بسیاردقیق و کنترل شده است واجزای سلولی تجزیه شده، درون غشای سلول نگهداری می‌شوند. سرانجام اجسام آپوپتوتیک قبل از اینکه به سلول‌های مجاور آسیب برسانند، توسط ماکروفاژها، فاگوسیته می‌شوند. بنابراین، فرآیند آپوپتوزیس از پاسخ های عفونی غیرضروری جلوگیری می‌کند. با توجه به این که، آپوپتوزیس بر روی سلول‌های بافت اطراف تأثیر نمی‌گذارد، به همین دلیل، تشخیص سلول‌های آپوپتوتیک در آزمایش‌های بافت شناسی سخت و دشوار است. در کل مرگ سلولی آپوپتوتیک، بدون اینکه تغییری در بافت اطراف ایجاد کند، روی می‌دهد. درحالی‌که، نکروز را می‌توان به وسیله تغییرات مورفولوژیکی و تجزیه کل گروه‌های سلولی یا یک بافت کامل تشخیص داد، که این تغییرات منتهی به التهاب و عفونت می‌شود (۱۰).

---

[11] blebbing [2] shrinkage

Surname: Moatamed **Name:** Zahra

Title of thesis: The study of Aviprin & Aviprin 3-O-Glucoside derivated from *Prangos uloptera* on apoptosis induction in the human cancerous cell lines

Supervisors: Dr. Zahri, Saber and Dr. Razavi, Seyed Mehdi
Advisor : Hasanzadeh, Farshad

Graduate Degree: MSc **major:** Biology **specialty:** Animal Science
University of Mohaghegh Ardabili **Faculty:** Science
graduation date: 9.2.2010 **Number of pages:** 87

Keywords: cytotoxicity, LNCaP, HeLa, Aviprin, Aviprin Glucosid

Abestract: Many researchers have shown that plant-derivated polyphenolic compounds are helpful nutraceuticals in restraining various disorders such as neoplastic disease. In the present study, using preparative HPLC, two linear furanocoumarins, aviprin and Aviprin-3-O-D- glucopyranoside (A3G), were isolated from methanol extract of *Prangos uloptera* roots on C18 solid phase extraction cartridge. The evaluation of free radical scavenging capacity of the compounds using DPPH assay showed that aviprin is a more effective antioxidant than A3G. The biological and antiproliferative activity of the furanocoumarins were examined using human cervical carcinoma HeLa cell line and LNCaP prostatic cell line. Cell membrane integrity and cell viability were evaluated by measuring trypan blue exclusion assay and reduction of the tetrazolium-blue compound, respectively. Treating the LNCaP cell line with various concentration of the furanocoumarins showed the IC50 of aviprin and A3G 0.4 and 6.6 mg/ml, whereas their CC50 were 0.7 and 11 mg/ml, respectively. These results indicated that A3G did not significantly affect the cell line proliferation, but a comparison of IC50 and CC50 of aviprin revealed that, in the concentrations of CC50 aviprin, at least 42.7% of LNCaP cells were not dead by necrosis. Treating the HeLa cells by the furanocoumarins showed that the IC50 and CC50 of aviprin were 0.26 and 0.36 mg/ml and those of A3G were 0.33 and 0.36 mg/ml, respectively. These data point to the greater sensitivity of HeLa cell line than the LNCaP cell line, and therefore, their inhibition by necrosis could be anticipated. A morphological analysis of aviprin treated cells revealed that LNCaP cells became fragmented, whereas HeLa cells became condensed. The study of DNA fragmentation provided further evidence for the efficient inhibition of the LNCaP cell line via apoptosis induction.

Faculty of science

Department of Biology

Title of thesis

Evaluation of Aviprin & Aviprin 3-O-Glocoside on apoptosis induction in the human cancerous prostate cell line

Supervisors:

Dr. Saber Zahri
Seyed Mehdi Rasavi Dr.

Advisor:

Farshad Hassanzadeh

By:

Zahra Moatamed

University of Mohaghegh Ardabili

2010, February