دانشکده‌ی علوم

گروه آموزشی زیست شناسی

پایان‌نامه برای دریافت درجه‌ی کارشناسی ارشد
در رشته‌ی زیست شناسی گرایش علوم سلولی و مولکولی

عنوان:
بررسی اثر حفاظتی پروپولیس در مقابل پرتوهای X بر روی رده سلولی MCF-7

استاد راهنما:
دکتر صابر زهری

استاد مشاور:
دکتر فرهاد ذوالفقارپور

پژوهشگر:
حمید عزیزی

زمستان ۹۵

نام خانوادگی دانشجو: عزیزی بنه کاغی **نام:** حمید

عنوان پایان‌نامه: بررسی اثر حفاظتی پروپولیس در مقابل پرتوهای X بر روی رده سلولی MCF-7

استاد راهنما: دکتر صابر زهری

استاد مشاور: دکتر فرهاد ذوالفقار پور

مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد **رشته**: زیست شناسی

گرایش: علوم سلولی و مولکولی **دانشگاه**: **محقق اردبیلی**

دانشکده: علوم **تاریخ دفاع:** ۹۵/۱۱/۲۵ **تعداد صفحات:** ۶۰

چکیده:

سرطان پستان یک مشکل عمده بهداشتی برای زنان در سراسر جهان است. دومین سرطان شایع بعد از سرطان ریه و شایع ترین علت مرگ ناشی از سرطان در میان زنان را تشکیل می دهند. پروپولیس حاوی فلاونوئیدها و پلی فنل هاست که اثر آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی و ضد میکروبی قابل توجهی است. هدف این تحقیق ، بررسی اثر حفاظتی پروپولیس در مقابل پرتوهای X بر روی رده سلولی MCF-7 می باشد. روش بررسی: نمونه های پروپولیس با اتانول ۹۶درصد عصاره گیری شد. سلول های MCF-7 در محیط کشت RPMI کشت داده شد. عصاره EEP در DMSO حل و برای تیمار سلولی استفاده شد. اثرات آنتی اکسیدانی بره موم بر سلول های MCF-7 با آزمون سنجش MTT بررسی شد. اثرات پرتوی X توام با تیمار عصاره از طریق بررسی میزان بقاء ،آپوپتوز سلولی و روش های مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج: نتایج نشان دادکه تیمار عصاره بره موم در غلظت های پایین اثرکشندگی قابل توجه ای نشان نداد. و همچنین تیمار پرتو ایکس با دوز ۱ گری اثر کشندگی موثری نداشت در حالی که تیمار توام عصاره و پرتو ایکس اثر کشندگی قابل توجه ای نشان داد . Ic_{50} تیمار توام عصاره بره موم و پرتو ایکس برابر ۱۴ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد. در این تحقیق برای بررسی رویداد آپوپتوز درسلول های تحت تیمار از تستAO/EB و آزمون AnnexinV/PI استفاده شد. نتیجه این که میزان آپوپتوز در تیمار عصاره ۱۵میکروگرم بر میلی لیتر توام با پرتو ایکس در مقایسه با گروه شاهد به طور قابل توجه‌ی افزایش یافت. نتیجه گیری و بحث: این یافته ها پشنهاد می کند که بره موم درغلظت‌های پایین اثر سایتوتوکسیتی قوی ندارد. این در حالی است که تیمار توام عصاره با ترکیبات دیگر که در این تحقیق پرتو ایکس بود اثر سایتوتوکسیتی قابل توجه ای نشان داد.

کلید واژه‌ها:آپوپتوز ، اشعه X ، بره موم ،MCF-7 ،MTT

فهرست مطالب

شماره و عنوان مطالب **صفحه**

فصل اول: مقدمه و کلیات پژوهش

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۲- چرخه سلولی ۳

۱-۲-۱- تنظیم چرخه سلولی ۴

۱-۲-۲- مهارکننده های کیناز وابسته به CKIs ۶

۱-۳- سرطان ۷

۱-۳-۱- سرطان سینه ۷

۱-۳-۲-مدلی از مراحل گسترش سرطان سینه ۸

۱-۳-۳- دسته بندی سرطان سینه ۹

۱-۳-۴- میزان وقوع سرطان ۹

۱-۳-۵- مرگ و میر سرطان سینه ۱۱

۱-۳-۶- درمان ۱۱

۱-۴- آسیب شناسی سرطان سینه ۱۲

۱-۴-۱- مسیر PI3K/AKT/MTORC در سرطان سینه ۱۲

۱-۴-۲- ساختار PI3K و عملکرد آن ۱۳

۱-۴-۳- PTEN به عنوان تنظیم کننده مسیر سیگنالی PI3K/AKT/MTORC ۱۴

۱-۴-۴- ساختار mTOR و عملکرد آن ۱۴

۱-۴-۵- ساختار AKT و عملکرد آن ۱۵

۱-۴-۶- اهمیت MTOR در سرطان سینه ۱۵

۱-۵- روش های نوین در درمان سرطان ۱۶

۱-۶- بره موم(Propolis) ۱۶

۱-۶-۱- ترکیبات شیمیایی بره موم ۱۶

۱-۶-۲- کافئیک اسید فنیل استر(CAPE) ۱۷

۱-۶-۳- کریسین ۱۸
۱-۷- تأثیری از پروپولیس و ترکیبات آنها بر فرآیند آپوپتوز در سلول های سرطانی..... ۱۹
۱-۸- آپوپتوز ۱۹
۱-۸-۱- آپوپتوز و نکروز ۲۰
۱-۹- پرتوی ایکس ۲۱
۱-۹-۱- تاریخچه پرتوی X ۲۱
۱-۹-۲- واحد اندازه گیری پرتوی X ۲۲
۱-۹-۳- اثرات زیست شناختی پرتوی X ۲۲
۱-۹-۳-۱- اثرات مستقیم پرتوی X ۲۲
۱-۹-۳-۲- اثرات غیر مستقیم پرتوی X ۲۳
۱-۹-۴- پرتو و سرطان ۲۳
۱-۹-۵- پرتوی X و آسیب DNA ۲۳
۱-۹-۶- پرتو و انواع آپوپتوز ۲۴
۱-۱۰- اهداف مطالعه ۲۵

فصل دوم:مواد و روش پژوهش

۲-۱- شمایی کلی از روش انجام تحقیق ۲۷
۲-۲-۱- ابزار و مواد مورد استفاده در تحقیق ۲۸
۲-۲- تهیه مواد و محلول های مورد استفاده ۲۹
۲-۲-۱- تهیه بافر سالین فسفات(PBS) ۲۹
۲-۲-۲- آماده سازی محیط کشت ۲۹
۲-۲-۳- کشت سلول ها ۲۹
۲-۲-۴- آنتی بیوتیک ها ۳۰
۲-۲-۵- آمفی تریپسین B ۳۰
۲-۲-۶- تریپان بلو ۳۰
۲-۲-۷ تهیه محلول MTT ۳۰
۲-۲-۸- تهیه عصاره اتانولی پروپولیس (EEP) ۳۱
۲-۲-۹- تهیه استوک ۱۰۰ میلی گرم از EEP (عصاره بره موم) ۳۱

۲-۳- پروتکل سلولی ۳۱
۲-۳-۱- تهیه سلول ۳۱
۲-۳-۲- روش تعویض محیط کشت ۳۱
۲-۳-۳- روش پاساژ دادن سلول ها ۳۱
۲-۳-۴- روش منجمد کردن سلول و ذخیره آن در ازت ۳۲
۲-۳-۵- روش ذوب کردن سلول ۳۳
۲-۳-۶ شمارش سلول ها با تریپان بلو ۳۳
۲-۳-۷- تست MTT و سنجش زنده مانی سلول ها ۳۳
۲-۳-۸- بررسی اثرات آنتی اکسیدانی عصاره بره موم ۳۴
۲-۳-۹- بررسی اثر سیتوتوکسیتی عصاره بره موم و پرتو X بر رده سلولی MCF-7 با تست MTT ۳۴
۲-۳-۱۰- روش رنگ آمیزی آکریدین اورنج-اتیدیوم برماید ۳۵
۲-۳-۱۱- تست لاکتات دهیدروژناز (LDH) ۳۵
۲-۳-۱۲- آزمون آنکسین۵-پروپیدیم یداید جهت سنجش آپوپتوز ۳۶

فصل سوم: نتایج و یافته‌های پژوهش

۳-۱- نتایج بررسی عصاره بره موم و اشعه X بر زیستایی سلول های MCF-7 ..... ۳۸
۳-۱-۱- نتایج اثر غلظت های الکلی بره موم و پرتو X بر زیستایی MCF-7 ..... ۳۸
۳-۱-۲- نتایج حاصل از بررسی تغییرات مورفولوژیکی حاصل از تیمار در سلول های MCF-7 ..... ۴۰
۳-۱-۳- اندازه گیری فعالیت انتی اکسیدانی عصاره بره موم با DPPH ۴۱
۳-۱-۳-۱- نتایج حاصل از تست DPPH ۴۱
۳-۱-۴- نتایج سلول های آپوپتوزیافته با رنگ آمیزی آکریدین اورنج-اتیدیوم بروماید ۴۲
۳-۱-۵- نتایج سلول های آپوپتوزیافته با آزمون LDH ۴۳
۳-۱-۶- نتایج آپوپتوزی سلول های MCF-7 با آزمون Annexin V/PI ۴۴

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

۴-۱-مقدمه ۴۸
۴-۱-۱- بحث و نتیجه گیری از بررسی عصاره الکلی بره موم بر سلول های MCF-7 ..... ۴۸
۴-۱-۲- بحث و نتیجه گیری تغییرات مورفولوژیکی سلول های MCF-7 در اثر تیمار با عصاره بره موم ۴۹
۴-۱-۳- بحث و نتیجه گیری از بررسی اثر پرتو X بر سلول های MCF-7 ..... ۵۰
۴-۱-۴- نتیجه گیری کلی ۵۰
پیشنهادات ۵۰
فهرست منابع ۵۱

فهرست جدول‌ها

شماره و عنوان جدول **صفحه**

جدول ۲-۱- ابزار و دستگاه های مورد استفاده ۲۸
جدول ۲-۲ مواد مورد نیاز برای کشت و نگهداری سلول ها در تحقیق ۲۸
جدول ۲-۳ مواد و میزان مورد استفاده در تهیه بافر سالین فسفات (PBS) ۲۹
جدول ۲-۴ وسایل و مواد مورد نیاز برای منجمد شدن سلول ها..... ۳۲

فهرست شکل‌ها

شماره و عنوان شکل **صفحه**

شکل ۱-۱ فازهای مستقل و وابسته به میتوژن در چرخه سلول.....۳

شکل ۱-۲ سایکلین های D سنسور فاکتورهای رشد.....۵

شکل ۱-۳ تأثیر مهارکننده‌های CDKها.....۶

شکل ۱-۴- مراحل گسترش سرطان سینه.....۸

شکل ۱-۵- سرعت‌های بروز جهانی سرطان سینه.....۱۰

شکل ۱-۶- مسیر سیگنالی PI3K/AKT/mTOR.....۱۳

شکل ۱-۷- ساختار شیمیایی کافئیک اسید فنیل استر.....۱۷

شکل ۱-۸- ساختار شیمیایی کریسین.....۱۸

شکل ۱-۹- رویداد آپوپتوز و نکروز از سلول طبیعی.....۲۰

نمودار ۳-۱ نمودار میانگین اثر مقدار عصاره EEP و پرتوی ایکس بر روی MCF.....۳۹

نمودار ۳-۲- نمودار رگرسیون خطی اثر مقدار عصاره EEP و پرتوی ایکس روی MCF-7.....۳۹

نمودار ۳-۳- نمودار رگرسیون خطی اثر غلظت های مختلف بره موم بر سلول های MCF-7.....۴۰

شکل ۳-۴- تصاویر میکروسکوپی سلول‌های MCF-7 تیمار شده با بره موم و پرتو.....۴۱

نمودار ۳-۵- نمودار DPPH بررسی خاصیت انتی اکسیدانی عصاره بره موم.....۴۲

شکل ۳-۶-تصاویر مورفولوژیکی رنگ آمیزی آکریدین اورنج – اتیدیوم بروماید.....۴۳

نمودار ۳-۷- انتشار LDH نشان دهنده سمیت سلولی تیمار شده توأم با عصاره بره موم و پرتو.....۴۴

نمودار ۳-۸- انتشار LDH نشان دهنده سمیت سلولی تیمار شده با عصاره بره موم.....۴۴

نمودار ۳-۹- انتشار LDH نشان دهنده سمیت سلولی تیمار شده با پرتو ایکس.....۴۴

نمودار ۳-۱۰-۱-گروه کنترل،در حدود ۹۲ درصد سلول ها سالم بودند از نظر Annexin وPI منفی.....۴۵

نمودار ۳-۱۰- ۲-گروه تیمار با پرتو۱ گری اشعه X.....۴۶

نمودار ۳-۱۰-۳-گروه تیمار با عصاره ۱۵ میکروگرم بر میلی لیتر.....۴۶

نمودار ۳-۱۰-۴-گروه تیمار با عصاره ۱۵ میکروگرم وپرتودهی ۱ گری اشعه X.....۴۷

Abbreviations:

Abbreviations	Definition
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
CDK	Cyclin Dependent Kinase
CKI	Cyclin Kinase inhibitor
DMSO	Dimethyl solfoxide
EDTA	EthyleneDiamineTetraAcetic acid
EEP	Ethanolic extract of propolis
FBS	Fetal bovine serum
FSC	Forward scatter
IC_{50}	Half maximal inhibitory concentration
LDH	Lactate dehydrogenase
MAPK	Mitogen-activated protein Kinase
MCF-7	Michigan cancer Foundation-7
mTORC	Mammalian target of rapamycin complexes
MTT	3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
PBS	Phosphate buffer saline
PTEN	Tumour suppressor phosphatase with tensin homology
RC_{50}	Radical scavenging capacity
RPMI	Rosewell park memorial institute
SSC	Side scatter

فصل اول:

مقدمه پژوهش

۱-۱-مقدمه

سرطان گروهی از بیماری ها را شامل می شود که مشخصه آنها رشد تنظیم نشده و تهاجم و انتشار سلول ها از جایگاه اصلی یا مکان اولیه به دیگر نقاط بدن می باشد. هر بافت منشا و ویژگی های اختصاصی و متمایزی را به سرطان آن ناحیه می بخشد. (Network, 2012) سرطان سینه در حدود یک‌سوم از کل سرطان، را در بین زنان تشکیل می دهد .سرطان سینه دومین سرطان شایع بعد از سرطان ریه و شایع‌ترین علت مرگ ناشی از سرطان سینه در میان زنان را تشکیل می‌دهد. و بروز این سرطان در میان زنان ایرانی در حال افزایش است. در ایران با افزایش سن در زنان در سال های اخیر انتظار می‌رود بروز سرطان در سال‌های آینده افزایش خواهد یافت. (Clemons & Goss, 2001) هدف از این تحقیق در زمینه ی سلولی سرطان سینه[1] MCF-7 توسعه روش های جدید و غیر سمی ترکیبات گیاهی در درمان سرطان سینه می باشد. از این رو در این تحقیق از اثرات عصاره بره موم که یکی از ترکیبات جانبی زنبور عسل می باشد و اثرات ضد سرطانی دارد استفاده شد. در این بررسی اثرات حفاظتی بره موم روی رده سلولی سرطانی MCF-7 از طریق میزان بقاء ، آپوپتوز سلولی و آزمون[2] LDH و فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت . نتایج نشان داد که بره موم اثر حفاظتی بر روی رده سلولی سرطانی در مقابل پرتوی ایکس ندارد . عصاره الکلی بره موم با فعال کردن مسیرهای آپوپتوز و متوقف کردن چرخه سلولی سرطان موجب القاءی آپوپتوز یا مرگ سلولی می‌شود

۱-۲- چرخه سلولی

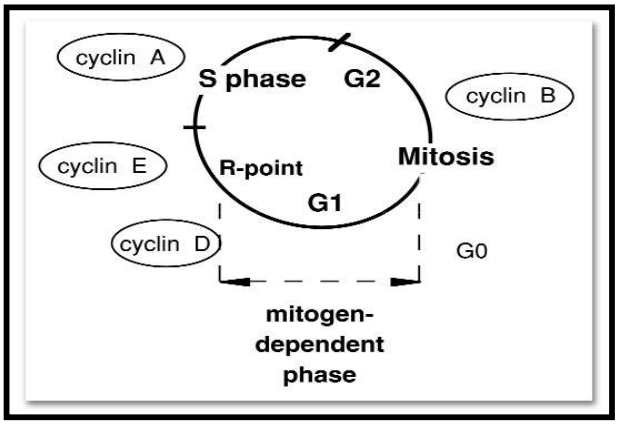
تقسیم یک‌سلول نرمال‌وخود تکثیری تحت تأثیر سیگنالینگ خارج سلولی است. پس از شروع تقسیم، تکثیر DNA باید تمام شود. بنابراین، سیگنال‌های خارج سلولی ازجمله فاکتورهای رشد [3](GF) نباید پیشرفت فاز S (فاز تکثیر) را متوقف کنند. بعد از این که سنتز DNA کامل می شود. سلول‌ها جهت آماده‌سازی برای میتوز وارد فاز G2می‌شوند. اکثرسلول‌های پستانداران‌دیپلوئیدهستند. بنابراین پس‌از تکثیر DNA سلول نیز باید تقسیم شود. بنابراین،کنترل در فاز G2 توسط فاکتور رشد (GF) غیرضروری است. این نقاط کنترلی برای رویداد سیگنالینگ داخل‌سلول‌ضروری‌است.مرحله‌میتوزتوسط‌مسیرهای‌سیگنالی‌کنترل‌شده‌است.که‌می‌تواندبریکپارچگی‌عملکردمیکروتو بول نظارت داشته باشد، برای اطمینان از این‌که تفکیک کروموزوم بطورکامل انجام می‌شود. میتوز یک مرحله مستقل ازGF از چرخه سلولی است. درحالی‌که سلول از چرخه میتوز خارج‌شود، چرخه سلولی تنظیم مجدد پیدا می‌کند. اجازه می‌دهد یک سلول جدید ایجاد شود. درحالی‌که منطق حکم می‌کند، شروع فاز G1 تنها بخشی از چرخه سلولی است که می‌تواند وابسته به GF باشد.(شکل ۱-۱)

---

[1]- Michigan Cancer Foundation-7

[2]- آنزیم لاکتات دهیدروژناز

[3]- Groth Factor



شکل ۱-۱- فازهای مستقل و وابسته به میتوژن در چرخه سلول

فاکتورهای‌رشد (GF) برای‌انتقال سلول ازمرحله G1 به فاز S درچرخه‌سلولی ضروری‌هستند. مرحله G1 دراغلب سلول ها اتفاق می افتد. این مرحله از پایان تقسیم سلولی شروع شده تا رسیدن به مرحله فازS ادامه دارد. در این مرحله نقاط کنترلی خاصی به نام نقاط وارسی وجود دارد. (Pardee, 1974) نقاط وارسی به طورگذرا در حدود ۲-۳ ساعت قبل از شروع مرحله S (سنتز DNA) قرار دارد. انتقال سلول از نقاط وارسی‌با تجمع یک پروتئین حساس (ناپایدار) به نام R-پروتئین ها انجام می شود.(Zetterberg & Larsson, 1985Pardee, 1974 ;) R-پروتئین در واقع یک‌پروتئین تنظیمی کوتاه عمراست، پروتئینی که به فاکتورهای رشد حساس است، بایستی قبل از اینکه یک سلول از نقاط وارسی عبور کند و به سمت سنتز DNA پیش رود R- پروتئین سنتز می‌شود. (Campisi, Medrano, Morreo, & Pardee, 1982).

چرخه سلولی به چهار فاز تقسیم می‌شود. دو فاز اصلی در چرخه سلولی دیده می شود. این دو فاز شامل فرایند میتوز و فرایند سیتوکینز می‌شود. وقتی هسته‌ها تقسیم می‌شود فرایند میتوز رخ می‌دهد. زمانی که سلول تقسیم می شود فرایند سیتوکینز انجام می شود. این دو فرایند روی هم فاز M را تشکیل می‌دهند. فاصله بین یک فاز M و فاز بعدی ،اینترفاز نامیده می‌شود. اینترفاز یک زمان پرکاربرد برای سلول است و شامل سه فاز باقی مانده چرخه سلولی است. سلول در فاز S (فاز سنتز) ، DNA هسته را همانندسازی می‌کند که یک پیش نیاز ضروری برای تقسیم سلول است. فاز G1 (gap1) فاصله بین دو فاز M و شروع فاز S است. فاز G2 (gap2) ،فاصله بین انتهای فاز S و شروع فاز M است. در طول این فازها (فازهای gap) سلول ها خودشان را برای انتقال به فازهای S و M آماده می‌کنند. هنگامی که تکثیر سلول ها به دلیل سیگنا های آنتی میتوژن های خاص متوقف می‌شود سلول ها از چرخه سلول خارج و وارد مرحله ساکن به نام فاز G0 می‌شود.

۱-۲-۱-تنظیم چرخه سلولی

برخی مولکول‌هایی‌که رویدادهای اولیه از چرخه سلولی را بطورگسترده کنترل می‌کنند شناخته‌شده است. کینازهای وابسته به سایکلین [۴](CDKs) ،یک گروه از کینازهای ترئونین/سرین است که شکل فعال آن هیدرودایمر که به زیر واحد تنظیمی سایکلین‌ها متصل‌می‌شود .(Zetterberg & Croy & Pardee, 1983 ; Larsson, 1985). چندین CDKs وجودارد که به‌طور عمده شامل: CDK4، CDK6، CDK2 و احتمالاً CDK3 در تحریک سلول‌ها از فاز G1 به فاز S مشارکت می‌کنند. CD4 وCD6 در فاز ابتدایی G1 درگیر هستند. درحالی‌که CD2 برای تکمیل G1 و شروع فاز S موردنیاز است.CD4 وCD6 با سایکلین نوع D کمپلکس فعال تشکیل می‌دهد. (سایکلین های نوع D1 , D2 , D3). این کینازها بسیار مرتبط به هم هستند که از نظر ساختاری مشابه ولی از نظر فعالیت از یگدیگر متمایز هستند. (Matsushime, Roussel, Lew, Dulić, & Reed, 1991 ; Ashmun, & Sherr, 1991). CDK2 توسط سایکلین نوع E فعال می‌شود. سایکلین E1 وE2 در طول انتقال G/ S و سایکلین نوع A – سایکلین A1 وA2 در طول فاز S کمپلکس تشکیل می‌دهد.(Zetterberg & Larsson, 1985). نقش CDK3 هنوز به دلیل سطوح بیان کم مبهم است. علاوه بر این، این آنزیم (CDK3) کوتاه عمر، و احتمالاً غیرفعال است، در چندین گونه از نژاد موش خالص برای چرخه سلول غیرضروری به نظر می‌رسد.(Norbury & Nurse, 1992). تنظیم‌کننده‌های CDK. با کنترل سطح فعالیت CDK ها، می‌توانند فعالیت چرخه سلولی را کنترل کنند. آن‌ها شامل سایکلین ها ، و مهارکننده ها هستند، که به‌طور عام مهارکننده‌های کینازCDK مشهور است(CKIs). CDKs توسط فسفریله شدن تنظیم می‌شود.(Croy & Pardee, 1983; Sherr & Roberts, 1999). آن‌ها (CDKs) بر روی رزیدو تریونین فسفریله می‌شود (T172 در CDK4 و T160 در CDK2). این عمل توسط کمپلکس سایکلین CDK7-H که یک کیناز ترئونین /سرین است انجام می‌شود و همچنین در رونویسی و تعمیر DNA درگیر است.

سایکلین نوع D. سایکلین های نوع D برای سیگنالینگ میتوژن حائز اهمیت است , سنتز آن‌ها یکی از نقاط پایان اصلی مسیر RAS/RAF/MAPK است.(Won, Xiong, Beach, & Gilman, 1992). درحالی‌که مقدار کافی از سایکلین‌های نوع D در دسترس باشد به سلول اجازه می‌دهد از نقطه R (Restriction Point) عبور کند. سایکلین نوع D مولکول ناپایداری است و از هسته به سیتوپلاسم منتقل می‌شود. خروج از هسته به‌واسطه‌ی کیناز سنتاز گلیکوژن ۳ –بتا انجام می‌شود،که یک‌کینازی است که توسط مسیر RAS/PI3K/AKT (GSK-3B) مهار می‌شود.(Filmus et al., 1994; Winston, Coats, Wang, & Pledger, 1996). بنابراین،سایکلین D1 توسط مسیرهای متوژنیگ RAS/RAF/MAPK (سنتز سایکلین D1) و RAS/PI3K/AKT (پایداری سایکلین D1) همچنین فعالیت GSK-3B و SCF (تجزیه سایکلین D1) کنترل می‌شود. به‌طور قابل‌توجه ، سلول‌های فاقد سایکلین D1 می‌توانند تکثیر یابند که نشان می‌دهد این مولکول‌ها برای فاز G1 اکیداً لازم نیستند.(Aktas, Cai, & Cooper, 1997; Lavoie, L'Allemain, Brunet, Müller, & Pouysségur, 1996). درحالی‌که سایکلین ها

[4] - Cyclin Dependent Kinase

نوع D دارای توالی همولوگ بالاتری هستند که در بیشتر بافت‌ها باهم بیان می‌شود. بیان بیش‌ازحد سایکلین D1 عبور سلول را از فاز G1 تسهیل و تکثیر سلول را بالا می‌برد. فاکتورهای رشد سایکلین D1 را توسط ۴ مکانیسم تنظیم می‌کند.

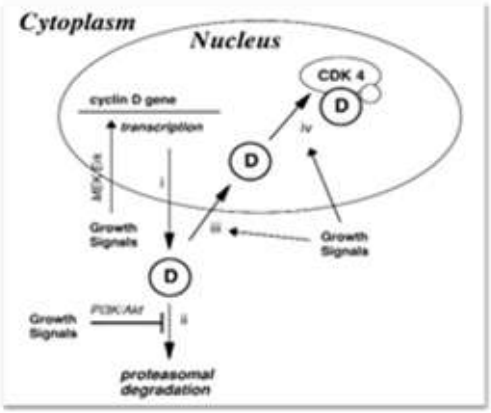
۱- القای رونویسی

۲- پایداری پروتئین

۳- انتقال آن به هسته

۴-اتصال به بخش کاتالیتکی , CDK4 و CDk6

در شکل زیر تنظیم سایکلین D توسط فاکتور های رشد آورده شده است:(شکل ۱-۲)



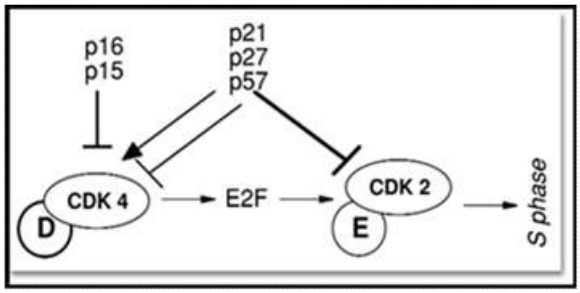
شکل۱- ۲- سایکلین های D سنسور فاکتورهای رشد

القای رونویسی سایکلین نوع D1 توسط فاکتور های رشد وابسته به مسیر Ras/Raf-1/MeK/ERK انجام می شود. (; Filmus et al., 1994Aktas et al., 1997). پروتئین سایکلین D1 کوتاه عمر است. (Koepp, Harper, & Elledge, 1999) عملکرد سایکلین D1 توسط یوبی کوئیتینه شدن و کمپلکس آنزیمی پروتئوزوم به واسطه فسفریله شدن رزیدو ترئونین ۲۸۶ توسط گلیکوژن سنتاز کیناز ۳-بتا کنترل می شود. (Diehl, Cheng, Diehl, Zindy, & Sherr, 1997Roussel, & Sherr, 1998 ;). این فسفوریلاسیون از طریق مسیر سیگنالی که پروتئین های RAS، PI3K ، و AKT (پروتئین کیناز B) را درگیر می کند مهار می‌شود. (Diehl et al., 1998) ثابت شده است که فعال سازی اولیه مسیر MEK/ERK/MAPK با فعال سازی ثانویه PI3K به پیشرفت فاز G1/S توسط فاکتور رشد مورد نیاز است.(Jones & Kazlauskas, 2001) این می تواند توضیح داده شود که مسیر MEK/ERK باعث سنتز سایکلین D1 و مسیر PI3K از تخریب آن جلوگیری می کند (Cheng, Sexl, Sherr, & Roussel, 1998)

سایکلین های نوع E وA فاکتور E2F-1 را ترانس اکتیو (بیان بیش‌ازحد) می‌کنند.(Bartek, Bartkova, & Lukas, 1996). سایکلین E با CDK2 کمپلکس تشکیل می‌دهد و با سایکلین D-CDK برای کامل کردن فسفریله شدن Rb مشارکت می‌کند. سایکلین E-CDK2 ویژگی گسترده‌ای نسبت به سایکلین D-CDK4/6 دارد. برای مثال ، سایکلین E-CDK2 مهارکننده CDK ، p27 را فسفریله می‌کند که منجر به تخریب p27 می‌شود. (Sheaff, Groudine, Gordon, Roberts, & Clurman, 1997). هر دو پروتئین سایکلین E و کیناز پروتئین در ارتباط با آن (کمپلکس سایکلین E-CDk2) در فازهای G1 انتهایی و S ابتدایی در بالاترین حد فعال می‌شود. (Dulic, Lees, & Reed, 1992). بیان آستانه از سایکلین E از مشخصه سلول‌های نرمال و تومور که وارد فاز S می‌شود است. (J Gong, Traganos, & Darzynkiewicz, 1995). بنابراین ،عبور از نقاط وارسی پیش‌نیازش تجمع سایکلین E است. ازاین‌رو، تجمع سایکلین E بین نقاط وارسی و فاز S است. (Ekholm, Zickert, Reed, & J Gong et al., 1995Zetterberg, 2001 ;). سایکلین E/CDK2 فسفریله شدن RB را کامل می‌کند. تغییر سایکلین D-CDK4 به سایکلین E-CDK2 برای از دست دادن وابستگی به فاکتور رشد صورت می‌گیرد. هر دو کیناز های فعال‌کننده سایکلین E وD برای فسفریله شدن Rb باهم مشارکت می‌کنند. سایکلین نوع A نیز توسط فاکتور E2F تنظیم می شود. این سایکلین در فاز عبوری از فاز G1 به S تجمع می یابد (Schulze et al., 1995) این سایکلین در فاز S با CDK2 و CDK1 همراه است. فعالیت کینازی این سایکلین برای ورود سلول به فاز S، اتمام مرحله S ، ورود به مرحله M ضروری است. (Girard, Strausfeld, Fernandez, & Lamb, 1991) سایکلین A در سنتز DNA و جلوگیری از همانندسازی اضافی DNA نقش بازی می کند (Nurse, 2000)

۱-۲-۲-مهارکننده‌های کیناز وابسته به سایکلین (CKIs)

CKI ها دو نوع هستند. (Sherr & Roberts, 1999).که شامل ۴ نوع از خانواده JNK4 – p16, p15, p18, p19 است. این مهارکننده‌ها فعالیت مهاری‌شان را از طریق اتصال به کیناز های CDK4 وCDK6 انجام می‌دهند و از پیوستگی سایکلین های نوع D جلوگیری می‌کنند. سه عضو از خانواده WAF/KIP –WAF1(پروتئین p21) ، KIP1(پروتئین p27)، KIP2(پروتئین p57) که با G1/S-CDKs کمپلکس هترودایمر تشکیل می‌دهند. بااین‌حال ، در مقادیر استوکیومتری ، آن‌ها فعالیت کینازی کمپلکس سایکلین E-CDK2 را مهار می‌کنند.CKIها به فرایند متنوع سلولی پاسخ می‌دهند. (Zetterberg & Larsson, 1985) برای مثال ، پروتئین p21 یکی از عوامل مؤثر در ژن p53 است که یک سرکوب‌کننده تومور در پاسخ به آسیب DNA عمل می‌کند .یک فرایند بسیار مهم برای سرطان انسانی است.(شکل۱- ۳)



شکل۱- ۳- تأثیر مهارکننده‌های CDKها

پروتئین P(۱۹) می‌تواند با حفاظت از $p_{۵۳}$ موجب توقف چرخه سلولی در مرحله فاز G_1 شود. اختلال در میزان بیان و فعالیت این پروتئین‌ها با مشکلاتی ازجمله سرطان همراه خواهد بود. نه تنها مسیر های فعال کننده آسیب DNA برای اریست فاز G1 استفاده می شود بلکه از آنتی میتوژن[5] های دیگر تحت تاثیر نقاط وارسی برای مرگ سلولی بکار می رود. خانواده‌ی از مهار کننده ها مانند:Cip/Kip وINK4 ممکن است باعث مرگ فیزیولوژیکی سلول شوند. (Swarbrick, Lee, Sutherland, & Musgrove, 2000) اتصال مهارکننده می تواند باعث تحریک پروتئین p27 شود. (Polyak et al., 1994) مهاری از سایکلین های D یا E وابسته به کینازها یک مکانیسمی از فعالیت آنتی میتوژن های فیزیولوژیکی است. (Li, Suardet, & Little, 1995) بسیاری از مهارکننده های دارویی سلول ها را در نقاط وارسی متوقف می کنند. برای مثال ، Staurosporin (نوعی آنتی بیوتیک جداشده از باکتری) مهار کننده پروتئین کیناز چرخه سلول را در نقاط وارسی از سایکلین D قبل از سایکلین E متوقف می کند. (Jianping Gong, Traganos, & Darzynkiewicz, 1994).

۱-۳-سرطان

سرطان یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مشاهده‌شده در طب بالینی است که در صورت عدم درمان کشنده است و پس از بیماری‌های قلبی –عروقی دومین علت شایع مرگ‌ومیر در جهان محسوب می‌شود.ریسک ابتلا به بیماری سرطان علیرغم پیشرفت علم بشر در جنبه‌های بیولوژیکی و پزشکی، همواره رو به افزون است. به‌طور عادی،تکثیر و تمایز سلول‌ها توسط یک مکانیسم کاملاً" حساب‌شده و در پاسخ به نیازهای مختلف انجام می‌شود.در طول نمو طبیعی،گروه‌های ژنتیکی پیچیده تبادل بین تکثیر و مرگ سلولی را در پاسخ به سیگنال‌های آپیتوز کنترل می‌کنند. به‌هرحال در مواردی مشاهده می‌شود که سلول‌ها از بین کنترل منظم و دقیق خارج‌شده و منجر به اختلالاتی می‌گردند که نتیجه آن ایجاد سرطان است.در اروپا و امریکای شمالی از هر ۴ نفر بر اثر سرطان جان خود را از دست می‌دهند. هدف از تحقیق درزمینه‌ی سرطان توسعه‌ی روش‌های جدید و مؤثر غیر سمی در درمان سرطان است. با توجه به تفاوت مکانیسم‌های مولکولی درگیر در سرطان‌زایی که در هر نوع سلول سرطانی وجود دارد درمان‌های متفاوتی نیز باید به کار گرفته شود.

۱-۳-۱-سرطان سینه

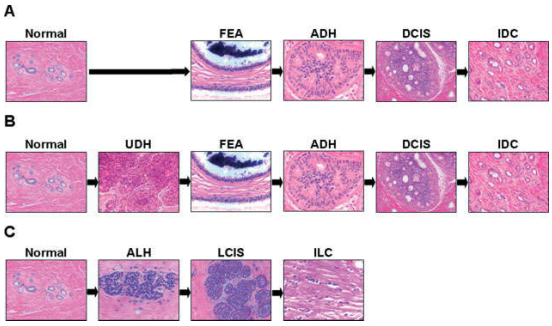
سرطان پستان یک مشکل عمده بهداشتی برای زنان در سراسر جهان است، ازجمله کشور ما که هرسال بیش از ۵۰۲۰۰۰ زن به دلیل خطر ابتلا به این سرطان جان خود را ازدست‌داده است. سرطان پستان حدود یک‌سوم از کل سرطان در زنان، دومین سرطان شایع بعد از سرطان ریه و شایع‌ترین علت مرگ ناشی از سرطان در میان زنان را تشکیل می‌دهند. و بروز این بیماری در میان زنان ایرانی افزایش‌یافته است. با افزایش عمر امید به زندگی و پیر شدن جمعیت در ایران انتظار می‌رود بروز سرطان در سال‌های آینده افزایش خواهد یافت. این بیماری علیرغم پیشرفت‌های مهم در تشخیص و درمان از معضلات شایع زنان است.

[5] Mitogen

اگرچه وجود داروهای مؤثری مانند تاموکسیفن[6] و رالوکسیفن[7] و یا داروهای ضد توموری آناسترازول[8] که به همراه اشعه درمانی و یا ادجوانت[9] های (ترکیبات شیمیایی یا بیولوژیک باعث تحریک غیر اختصاصی سیستم ایمنی می شود) درمانی در طی ۳۰ سال گذشته جان بسیاری از زنان مبتلا را نجات داده است . بااین‌وجود، معایب مختلفی ازجمله عود بیماری ناشی از متاستاز در چند ماه پس از درمان، اثرات ناشی از متاستاز در چند ماه پس از درمان، اثر تنشی از مصرف داروها بر روی متابولیسم گلوکوکورتیکوئیدها و خطرات سرطان بعد از شیمی درمانی سرطان پستان، سبب محدودیت استفاده از این سیستم‌های درمانی شده است. یکی از سازوکارهای عملکردی داروهای ضد سرطانی القاء آپوپتوز است که موجب مرگ سلول‌های سرطانی می‌شود.

۱-۳-۲- مدلی ازمراحل گسترش سرطان سینه

زیر گروهای لوبولار و داکتال اکثریت تمام سرطان سینه را در سراسر جهان تشکیل می دهد. در ۴۰-۷۵٪ تشخیص بیماری سرطان سینه در زنان از نوع زیر گروه داکتال می باشد. (Walker, 2005Rakha et al., 2006 ;) مشاهدات مورفولوژیکی سرطان سینه منجر به تدوین چندین مدل خطی از شروع، تحول و پیشرفت، سرطان پستان شده است. مدلی از پیشرفت سرطان سینه در شکل (۱-۴) آورده شده است ، که به توضیح آن می پردازیم.



شکل ۱-۴- مراحل گسترش سرطان سینه

اولین مدل داکتال که توسط ویلینگز و همکاران پشنهاد شد ، شامل مراحل :آتیپیا (atypia) اپیتیلیال مسطح (FEA) ، هاپیر پلازی داکتال آتیپیکال (ADH) ، و کارسینوما داکتال درجا (DCIS) که این مراحل به عنوان پیش ساز های کارسینوما داکتال متاستاز و تهاجمی غیر ضروری است. (Wellings & Lerwill, 2008 ; Jensen, 1973) . دومین مدل داکتال که توسط مطالعات اپیدمیولوژیک پیشنهاد شده است، این است که هایپرپلازی داکتال اپیتلیال (UDH) به عنوان یک مرحله میانی از پیشرفت سرطان بین مرحله FEA و DCIS مطرح است. (Page, 1986Dupont & Page, 1985 ;) ایمونوهیستوشیمی وشواهد بیولوژیکی مولکولی به شدت پیشنهاد می کند که UDH یک مرحله پیش ساز به ADH نیست و اینکه احتمالا دومین مدل از پیشرفت سرطان سینه نامعتبر باشد. (Kusama et al., 2000Boecker et al., 2002 ;)

---

[6] Tamoxiphen
[7] Raloxiphen
[8] Anastazol
[9] Adjuvant

۱-۳-۳- دسته بندی سرطان سینه (MCF-7)

سرطان پستان یک بیماری منفرد نیست، بلکه شامل بسیاری از اثرات بیولوژیکی مختلف با ویژگی‌های متمایز پاتولوژی و پیامدهای بالینی مختلف است. شواهد نشان می‌دهد که سرطان پستان دارای فعالیت های بیولوژیکی و هیستوپاتولوژیکی که رفتارهای متمایزی در پاسخ به درمان نشان می‌دهد. و بایستی استراتژیکی درمانی متفاوتی داشته باشد. بنابراین، گروه‌بندی دقیق از سرطان سینه به زیرگروه‌های بالینی مربوطه از اهمیت ویژه‌ای برای تصمیم‌گیری درمانی دارد. سرطان پستان[10] ازنظر ویژگی بالینی, به سه رده تقسیم می‌شود: **۱)** کارسینوم لپکی[11] در جا که نوعی تکثیر سلول‌های کوچک است که از واحد مجرایی –لپکی انتهایی منشأ می‌گیرد. در پی این ضایعه خطر سرطان پستان به شکل دوسویه افزایش می‌یابد که بروز آن در زنان پس از ئایستگی نیز در حال افزایش است.

۲) کارسینوم مجرایی درجا که نوعی تکثیر سلول‌های اپیتلیال مجرایی پستانی با ظاهر بدخیم ، بدون وجود شواهدی از تهاجم به ورای غشای پایه است. حدود ۱۵ تا ۳۰ درصد سرطان‌های یافت شده در برنامه‌های پرتونگاری پستانی برای غربالگری این رده هستند و بیشترین افزایش در بروز این نوع سرطان در زنان ۴۹ تا ۶۹ سال گزارش‌شده است. **۳)** کارسینوم مهاجم پستان نیز شامل گروه ناهمگنی از ضایعات هستند که بر اساس تظاهرات بالینی , ویژگی‌های پرتونگاری , مشخصات آسیب‌شناختی و رفتار زیستی باهم متفاوت‌اند. عقیده بر این است که منشأ بیشتر سرطان‌های مهاجم پستان از واحد لپکی مجرای انتهایی (terminal duct lobular unit) است .سرطان مجرایی نفوذکننده یا مهاجم رایج‌ترین نوع بافت‌شناسی سرطان پستان است که ۷۰ تا ۸۰ درصد موارد را دربرمی گیرد.

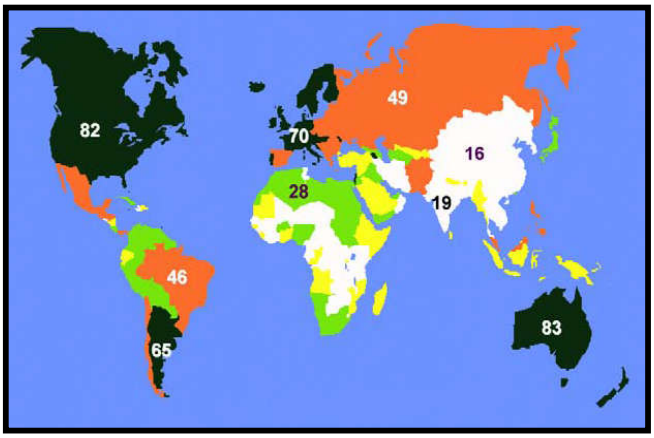
۱-۳-۴-میزان وقوع سرطان سینه

سرطان مهاجم پستان سرطان شایع در زنان است. آن ۲۲ درصد از سرطان‌های زنان را شامل می‌شود، ۲۶ درصد در کشورهای پر مرفه است که بیش از دو برابر وقوع سرطان در زنان در این کشورها رخ می‌دهد. مناطقی از جمعیت پر مرفه شمال امریکا، اروپا و استرالیا که در آن ۶ درصد از زنان مبتلا به سرطان پستان مهاجم دارند قبل از سن ۷۵ سالگی مبتلا می‌شوند. خطر ابتلا به سرطان پستان در مناطق کمتر توسعه‌یافته از کشورهای جنوب صحرای آفریقا و جنوب و شرق آسیا کمتر است، ازجمله ژاپن، که در آن احتمال ابتلا به سرطان پستان در ۷۵ سالگی یک‌سوم کشورهای ثروتمند است. سرعت ابتلا درجاهای دیگر متوسط است. ژاپن تنها کشوری غنی است که در سال ۲۰۰۰ هنوز سرعت انتشار سرطان سینه به میزان کم نشان داد. پیشگیری این بیماری بسیار خوب است اگر در مراحل اولیه تشخیص داده شود. پیشرفت‌های قابل‌توجهی در زنده ماندن سرطان سینه در کشورهای غربی ثبت‌شده است. اما پیشرفت‌های تکان‌دهنده در قرن ۱۹۹۰ منجر به اثر ترکیبی از غربالگری

---

[10] - Breast Cancer
[11] - Lopoki

جمعیت و درمان هورمونی شده است. درنتیجه، افزایش روند مرگ‌ومیر تا قرن ۱۹۸۰ در چند کشور با ریسک بالا در معرض خطر به سرطان به‌عنوان‌مثال، ایالات‌متحده آمریکا (USA)، انگلستان و هلند کاهش نشان می‌دهد. خطر ابتلا به این بیماری تا اوایل قرن ۱۹۸۰ در کشورهای توسعه‌یافته و کشورهای درحال‌توسعه افزایش‌یافته است و همچنین به‌ویژه در کشورهای درحال‌توسعه رو به افزایش است. بروز سرطان سینه، به‌سرعت باسن افراد در حال افزایش است.



شکل ۱-۵ -سرعت‌های بروز جهانی سرطان سینه(به ازای ۱۰۰۰۰۰جمعیت)

سرعت بروز سرطان سینه متناسب با سن برای سه جمعیت انتخابی با سرعت انتشار کم (ژاپن)، متوسط (اسلوونی) و سرعت بروز بالا (USA)، قبل از غربالگری انجام‌شده نشان می‌دهد. در سال ۱۹۹۰، بروز سرطان پستان در سراسر جهان متفاوت است ، تفاوت‌های مهم در توزیع اصولی علل بروز سرطان سینه تغییرات جغرافیایی، روند زمان، و مطالعات جمعیت مهاجر در معرض خطر ابتلا به سرطان است .(شکل۱- ۵)

مجموع مبتلایان به سرطان سینه در ایران ۴۰ هزار نفر است و سالانه بیش از هفت هزار بیمار به این بیمار افزوده می شود. هر چند ایران یکی از کشور هایی است که میزان بروز سرطان سینه کمتری نسبت به کشور های دیگر نشان می دهد، اما در سال های اخیر ،این بیماری رایج ترین بیماری بدخیمی در میان زنان ایرانی نشان داده است. بروز این بیماری در ایران حدود یک دهه قبا از کشور های توسعه یافته است و بیش از ۳۰ درصد بیماران زیر ۵۰ سال سن دارند. (Mousavi et al., 2007) تقریبا ۷۰ درصد زنان ایرانی در زمان مراجعه برای درمان در مراحل پیشرفت بیماری است که در این شرایط ،کاری از عوامل درمان بر نمی‌آید. (Behjati et al., 2005)

۱-۳-۵- مرگ‌ومیر سرطان سینه

از آغاز دهه ۹۰ میلادی , میزان استاندارد شده سنی مرگ‌ومیر سرطان سینه در زنان در بیشتر کشورهای توسعه‌یافته کاهش‌یافته است . و این کاهش در گروه‌های سنی ۳۶ تا ۶۴ سال مشهودتر است. در بریتانیا و سویس میزان مرگ‌ومیر سرطان سینه از سال ۱۹۹۰ تا ۲۰۰۶ به میزان ۳۰ درصد کاهش‌یافته است. (Islami, Kamangar, et al., 2009). اما میزان کاهش در شمال، جنوب، و غرب اروپا بین ۱۵ درصد تا ۲۵ درصد بوده است و در شرق اروپا میزان کاهش اندک بوده و یا در سطح مشخصی ثابت باقی‌مانده است. (Islami, Kamangar, et al., 2009; Islami, Pourshams, et al., 2009). در مقابل روسیه شاهد روند افزایشی بوده(Bray, Guilloux, Sankila, & Parkin, 2002)، که این روند تا سال ۲۰۰۴ ادامه داشته و سپس شروع به کاهش کرده است. بر اساس اطلاعات منتشرشده سازمان بهداشت جهانی[۱۲](WHO) بین سال‌های ۱۹۹۰ تا ۲۰۰۶ مرگ‌ومیر حاصل از سرطان سینه در کشورهای ژاپن ، هنگ‌کنگ، و کره از کشورهای غربی پایین‌ترین میزان را داشته است.در این میان‌کره نسبت به دیگر کشورهای آسیایی پایین‌ترین میزان مرگ‌ومیر به علت ابتلا به این سرطان را نشان می‌دهد و انگلیس نیز در میان کشورهای غربی بیشترین میزان مرگ‌ومیر به این سرطان را نشان می‌دهد .ایران در غرب آسیا قرارگرفته است، منطقه‌ای که در آن ابتلا به سرطان سینه پر شیوع است، (Izquierdo, Gispert, Saladie, & Espinàs, 2008). بروز این سرطان در ایران رو به افزایش است. بیماری در مراحل پیشرفته شناسایی می‌شود و اکثر بیماران در مقایسه با بیماران در کشورهای غربی جوان‌تر هستند. به نظر می‌رسد که سرطان سینه در ایران یک دهه زودتر از کشورهای غربی تحت تأثیر قرار می‌دهد که میانگین سنی این ابتلا بین ۴۷/۱ تا ۴۸/۸ سال است. و ۳۶ درصد موارد تومور در زنان زیر ۴۰ سال مشاهده‌شده است.(Choi, Kim, Park, Shin, & Yoo, 2016). تشخیص زودرس سرطان سینه یکی از عوامل مؤثر در کاهش موارد مرگ‌ومیر است.(Mousavi et al., 2009)

۱-۳-۶-درمان

در درمان سرطان به‌صورت موضعی ممکن است زخم‌های سیستماتیک محلی وجود داشته باشد. برای مثال سرطان سینه ,سرطانی است که شیمی‌درمانی آن در سراسر بدن پخش می‌شود. برخی از عوامل، به‌ویژه آدریامایسین[۱۳]، برای منطقه تزریق خیلی سمی است ، از یک دوز مناسب برای تزریق استفاده می‌شود. مزیت اصلی شیمی‌درمانی القایی با تزریق داخل شریانی در حال حاضر در بسیاری از مرکز درمان سرطان به‌طور وسیع استفاده می‌شود. در حال حاضر در پزشکی، جراحی، رادیولوژی، ارتوپدی، زنان و زایمان، ارولوژی، دستگاه گوارش و درمانگاه مغز و اعصاب در بسیاری از کشورها انجام‌شده است.

[12] World Health Organization
[13] Adriomycin

۱-۴ – آسیب‌شناسی سرطان سینه (MCF-7)

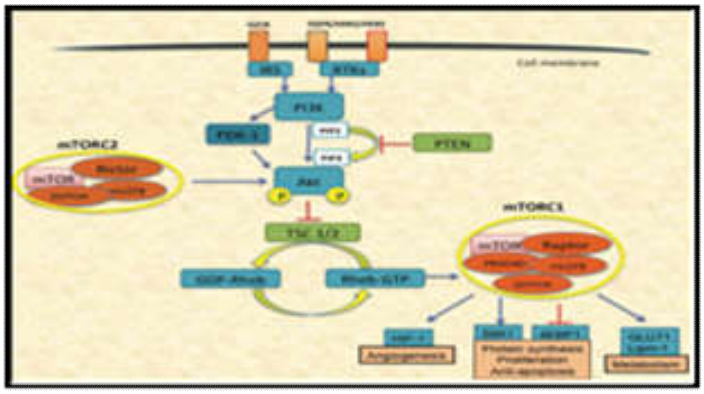
HER-2 یک مولکولی است که آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی سینه تنظیم می‌کند. (Alaoui-Jamali, Paterson, Al Moustafa, & Yen, 1997). به‌طور تقریبی ۲۵-۳۰ درصد از سرطان‌های سینه با بیان HER-2 یا ژن HER-2/neu افزایش می‌یابد. (Slamon et al., 1989). خانواده ERBB/HER پروتئینی است که شامل چهار تیروزین کیناز, رسپتور های متصل به غشاء(HER-4) و بیش از ۱۳ پلی پپتید لیگاند خارج سلولی است.(Klapper LN.Glathes , &et al ,1999) درحالی‌که فعالیت کینازی HER-3 ناقص است.(Guy PM. Plat K JV, & et al ,1994) باوجود عدم توانایی HER-3 به‌طور مستقل برای پاسخ به یک لیگاند، هر دو HER-2 و HER3 به‌صورت مجتمع هترودایمر تشکیل می‌دهد که باعث تولید سیگنال‌های سلولی قوی در سلول می‌گردد. هترودایمرهای متشکل از HER-2 چسبندگی بالایی دارند و ویژگی وسیع برای لیگاندهای مختلف نسبت به سایر کمپلکس‌های رسپتور دایمری نشان می‌دهد و در تفکیک لیگاند سرعت پایینی دارند. همچنین، هترودایمرهای حاوی HER-2 سرعت پایینی از آندوسیتوز و سرعت بالایی از برگشت دوباره چرخه به سطح سلول نشان می‌دهد. این ویژگی به سیگنال‌های ضد آپوپتوز و میتوژن های بالقوه ترجمه می‌شود. (Pinkas-Kramarski et al., 1996). سیگنالینگ HER-2 توسط چندین پروتئین کیناز به‌طور متوالی که شامل (ERK, JNK p38 MAPK) متعلق به خانواده بزرگ کیناز پروتئین فعال‌کننده میتوژن هستند (MAPK) فعال می‌شوند.(Ballif & Blenis, 2001) ترکیب دیگری در سیگنال داخل سلولی توسط خانواده ERBB/HER فعال می‌شود ، رسپتور های PI3K وابسته به AKT (McCubrey et al., 2006).و سیگنال آپوپتوتیک وابسته به BCL-2 (FADEEL, ZHIVOTOVSKY, & ORRENIUS, 1999).و خانواده پروتئینی مهارکننده اپوپتوز (IAP) را درگیر می‌کند.(Reed, 2001).

۱-۴-۱- مسیر PI3K/AKT/MTORC در سرطان سینه (MCF-7)

برآورد شده است که از هشت زن یک نفر به سرطان سینه مبتلا می‌شود. باوجود پیشرفت در شیمی‌درمانی سیتوتوکسیک و درمان هدفمند در چند دهه گذشته بیش از ۴۰۰۰۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان سالانه در ایالات‌متحده آمریکامی‌میرند(Siegel, Naishadham, & Jemal, 2013).مسیر PI3K/AKT/MTORC در القاءی سرطانی شدن سرطانی سینه در ارتباط است. رسپتور فاکتور رشد اپیتیلیوم انسانی ۲ (HER-2) در درمان سایتوتوکسیک و مستقیم سرطان سینه نقش دارد. (Paplomata, Zelnak, & O'Regan, 2013Nahta, 2012 ;). مهارکننده‌های mTOR یا PI3K/AKT در سرطان سینه فعال هستند. مسیر PI3K/AKT/MTORC یک مسیر سلولی داخل سلولی است که مسئول رشد و تکثیر سلول‌های توموری است. در این مسیر نقش مرکزی را PI3K که هترودایمر است بازی می‌کند. این هترودایمر شامل دو زیر واحد است : زیر واحد تنظیمی (p85) و زیر واحد کاتالیکی (p110) که به محرک‌های بالادست توسط رسپتور فاکتور رشد تیروزین کیناز (RTKs) فعال می‌شود(Cantley, 2002). PI3K فسفاتیدیل اینوزیتول ۵,۴ - بیس فسفات (PIP2) را به فسفاتیدیل اینوزیتول ۴,۴,۳-تری فسفات(PIP3) فسفریله می‌کند که این عمل AKT که یک سرین / ترئونین کیناز است را فسفریله

می‌کند.که بر روی چرخه سلولی , بقا و رشد سلول‌های سرطانی تأثیرگذار است. (Zhao & Vogt, 2008). فسفاتاز و PTEN (همولوگ tensin حذف‌شده بر روی کروموزوم ۱۰) که سرکوبگر توموری مهمی هستند PIP3 را به PIP2 دفسفریله می‌کنند (Maehama & Dixon, 1998). فقدان PTEN و جهش‌های PIK3CA , اغلب اگزون های ۹ و۲۰ را درگیرمی کند. در میان انحرافات شایع‌ترین بدخیمی در انسان به‌ویژه سرطان سینه است. (Samuels & Velculescu, 2004). جهش‌های PIK3CA وابسته به AKT می‌توانند منجر به تومورزایی شوند. (; Zhang et al., 2012Bruhn, Pearson, Hannan, & Sheppard, 2013).

در شکل (۱-۶) مسیر سیگنالی PI3K/AKT/MTORC در سرطان سینه را آورده شده که به توضیح هر یک از اجزای اصلی این مسیر می پردازیم.



شکل ۱-۶- مسیر سیگنالی PI3K/AKT/mTOR

۱-۴-۲- ساختار PI3K و عملکرد آن

فسفاتیدیل اینوزیتول ۳- کیناز (PI3K) یک خانواده کیناز لیپیدی است که توانایی فسفریله کردن حلقه ۳-OH اینوزیتول در فسفولیپیدهای اینوزیتول را داراست. (Fruman, Meyers, & Cantley, 1998) کلاس I از PI3K هترودایمر هستند که از یک زیر واحد کاتالیکی (CAT) یعنی (P110) و یک زیر واحد تنظیمی/آداپتوری[14] (P85) تشکیل شده است. این کلاس از PI3K خودش به دو زیر کلاس تقسیم می شود: زیر کلاس IA (PI3Kα, β,δ) که توسط رسپتورها با فعالیت پروتئین تیروزین کیناز فعال می شود، و زیر کلاس IB (PI3Kγ) ، که توسط رسپتورها با اتصال به G- پروتئین ها فعال می شود. زمانی که رسپتور فاکتور رشد پروتئین تیروزین کیناز فعال می شود نتیجه آن فسفریله شدن خود به خودی رزیدوی تیروزین است. PI3K دوباره به غشای سلول به طور مستقیم از طریق دومین SH2 رزیدوهای فسفوتیروزین متصل می شود. این اتصال منجر به فعال شدن آلوستریک زیر واحد CAT در پروتئین PI3K می شود. در عرض چند ثانیه، فعال شدن PI3K منجر به تولید پیامبر ثانویه‌ی فسفاتیدیل اینوزیتول ۳-۴-۵- تری فسفات (PIP3) از سوبسترای فسفاتیدل اینوزیتول ۴-۴-بیس فسفات (PIP2) می‌شود. PIP3 سپس یک زیر مجموعه از پروتئین‌های سیگنالی را از طریق دومین همولوگ پلی

[14]- Regulated/Adaptor

اکسترین (PH) بکار می گیرد که پروتئین های سیگنالی سرین/ترئونین کیناز ۳-فسفواینوزیتول وابسته به کیناز-۱ (PDK1) و AKT / پروتئین کیناز B (PKB) را درگیر می کند. (Vara et al., 2004) . AKT/PKB به نوبه خود، در تنظیم فرایندهای سلولی از جمله بقای سلولی و پیشرفت چرخه سلولی نقش دارد. از آنجایی که بقای سلول حائز اهمیت است، AKT/PKB می تواند فاکتور های پروآپوپتوتیک مانند: Bad و پروکاسپاز-۹ را غیر فعال کند ، همچنین پروتئین کیناز B در بیان خانواده FOX – پروتئین که یک فاکتور رونویسی است و در رشد ، تکثیر، تمایز، و طول عمر سلول نقش دارد، نقش ایفا می‌کند. (Testa & Bellacosa, Pawson & Nash, 2000 ; 2001).

۱-۴-۳- PTEN به عنوان تنظیم کننده مسیر سیگنالی PI3K/AKT/MTORC

PTEN یک مولکول کلیدی در پایین دست مسیر PI3K/AKT قرار دارد. این فسفاتاز بر روی لیپیدها و پروتئین ها عملکرد دارد. به عنوان یک سرکوبگر تومور باعث مهار رشد سلول می شود. حساسیت سلول را به آپوپتوز از طریق اینتگرین های خارج سلولی افزایش می دهد. (Lu et al., 1999) فسفاتاز و همولوگ tensin (فسفوپروتئین سیتوپلاسمی) اغلب در چندین سرطان پیشرفته انسانی جهش یافته است. علاوه بر این، جهش در ژن PTEN باعث سندروم های ارثی نادر که به بیماری Cowdens مشهور است می شود. که با سرطان های مختلف از جمله سرطان سینه ، تیروئید، و سرطان های آندومتر در ارتباط است. (Simpson & Parsons, 2001) سوبسترای لیپیدی اصلی PTEN، PIP3 است که به عنوان تنظیم کننده منفی از سیگنالینگ PI3K/AKT عمل می کند. بنابراین، فقدان عملکرد PTEN منجر به فعال سازی دائمی مسیر PI3K/AKT می‌شود.

۱-۴-۴- ساختار mTOR و عملکرد آن

mTOR یک پروتئین کلیدی تکاملی است که جهش در دوران جنینی می‌تواند عامل کشندگی باشد.در سلول‌های نرمال فعالیت mTOR توسط تنظیم‌کننده‌های بالادست مثبت و منفی کنترل می‌شود. (Hay & Sonenberg, 2004). تنظیم‌کننده‌های مثبت شامل فاکتورهای رشد و رسپتورهای آن‌هاست مانند : فاکتور رشد شبیه انسولین -۱(IGF-1) و رسپتور های هم‌ریشه آن‌ها IFGR-1 ،عضوی از خانواده رسپتور فاکتور رشد اپیتلیال انسانی و لیگاندهای مرتبط آن‌ها, رسپتور های فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGFRs) و لیگاندهای آن‌ها ، که سیگنال‌های انتقالی به mTOR از طریق PI3K-AKT انجام می‌گیرد.تنظیم‌کننده‌های منفی فعالیت mTOR شامل فسفاتاز و PTEN ,که مهارکننده‌های سیگنال از طریق مسیرPI3K-AKT است. و کمپلکس اسکلروز ناهنجاری -۱ (TSC-1) و (TSC-2) نیز جزء این تنظیم‌کننده‌ها هستند. فسفریله شدن TSC-2 توسط AKT اثر مهاری بر mTOR و تنظیم بالادست بر فعالیت mTOR دارد. از تنظیم‌کننده‌های منفی دیگر ، LKB1 که یک مسیر حساس به انرژی از TSC است. (Shaw et al., 2004). فعالیت mTOR توسط دو کمپلکس مجزا انجام می‌شود:mTORC1 وmTORC2 . کمپلکس mTORc1 از mTOR، Raptor ، mLST8 ، و PRAS40 ساخته‌شده است.آن به‌طور گسترده به راپامایسین[۱۵] حساس است که یکی از مهارکننده‌های mTOR است.آن همچنین S6K

[15] - Rapamycin

را فعال و 4EBP1 را غیرفعال می‌کند که منجر به ترجمه پروتئین و رشد سلول می‌شود (Hay & Sonenberg, 2004).کمپلکس mTORC2 از mTOR ، Rictor ،SIN1 و mLST8 تشکیل‌شده است. آن به راپامایسین حساسیت کمتری دارد و نقش آن‌ها در عملکرد سلول‌های نرمال و انکوپن ها به‌طور آشکار مشخص نیست. اما آن به فعال کردن AKT شناخته‌شده است .ازاین‌رو در تکثیر و رشد سلول‌ها نقش ایفاء می‌کنند. مسیر فعالیت mTOR به سیگنال مشتق شده از متوژن از طریق PI3K/AKT وابسته است. اگرچه فعالیت غیر وابسته به – AKT از طریق مسیر RAS/MEK/ERK در حال هنوز شناخته‌شده است.(Memmott & Dennis, 2009). درمجموع , فعالیت‌های mTOR منجر به افزایش سنتز پروتئین‌های چندگانه می‌شود. این کمپلکس‌ها در چندین پاتولوژی از تومورهای مختلف برای مثال ، سایکلین D1 ،که به پیشرفت سلول‌ها از طریق چرخه سلول اجازه می‌دهد.(Grewe, Gansauge, Schmid, Adler, & Seufferlein, 1999).

۱-۴-۵- ساختار AKT و عملکرد آن

کیناز های AKT متعلق به خانواده AGC است , که به کیناز های AMP/GMP و کیناز پروتئین C مرتبط است. آنها از سه دومین حفاظتی تشکیل شده اند, یک دومین PH ان-ترمینال , دومین کیناز مرکزی CAT , و C- ترمینال خارجی (EXT) که شامل هتروفیلیک تنظیمی است .. منطقه لینگر(LINK) به دومین PH برای دومینCAT متصل است که بطور ضعیفی توسط ایزوفرم های AKT (۱۷-۴۶٪ یکسان)حفاظت می شود. دومین کانسین سوس CAT ۹۰٪ در بیشتر ایزوفرم های AKT یکسان است و با PKC , PKA , SGK و زیر خانواده S6 از خانواده کیناز AGC در ارتباط است. C- ترمینال خارجی EXT در حدود ۷۰٪ در بیشتر ایزوفرم های AKT یکسان است و با خانواده PKC در ارتباط است.(Kumar & Madison, 2005)

۱-۴-۶- اهمیت mTOR در سرطان سینه

مسیر mTOR یک مسیر کلیدی تنظیمی در مسیرهای سیگنالی سلولی است , که فاکتور های رشد ، مواد مغذی، انرژی، و استرس را در سلول ها یکپارچه سازی می کند.(Zoncu, Efeyan, & Sabatini, 2011) در سلول های سرطانی سینه , سیگنال mTOR از طریق فسفاتیدیل اینوزیتول ۳-کیناز (PI3K) و AKT / پروتئین کیناز B (PKB) به هم مرتبط هستند.(Vivanco & Sawyers, 2002) در لاین سلول سرطانی سینه MCF-7 , فعالیت mTOR مسئول فعالیت ساختاری AKT می باشد , و مهار کننده های فعالیت mTOR پاسخ به تاموکسی آنتی استروژن[16] را ترمیم می‌کنند.(Friedrichs et al., 2004) پیام رسان mTOR در بیشتر سرطان ها به ویژه سرطان سینه اغلب دچار اختلال می شود. موتانت در مسیر mTOR/PI3K/AKT و یا غیر فعال سازی سرکوب کننده های تومور از قبیل P53 , LKBP1 , PTEN و TSC1/TSC2 که از فعالیت mTOR به وسیله ی PI3K ممانعت می‌کنند می تواند تومورزایی را از طریق پیام رسان mTOR افزایش می دهد.

[16] Tamoxi Anti Estrogen

۲-۲-۱- ابزار و مواد مورد استفاده در تحقیق

جدول ۲-۱: ابزار و دستگاه های مورد استفاده

تجهیزات	شرکت سازنده	تجهیزات	شرکت سازنده
میکروسکوپ	CETI	فریزر ۸۰-	Jalteb
سمپلر آبی و زرد	Brand	ورتکس	Labtron
هود لامینار	Telstar	ترازوی دیجیتال	Sartorious
فریزر ۲۰-	پارس	سانتریفیوژ	Behdad
انکوباتور	Memert	اسپکتوفتومتر	Reyleigh
بن ماری	Behdad	میکروتیوپ	Orang scienific
تانک ازت	Lery france	پلیت ۶و۲۴و۹۶	Nest
اتوکلاو	UKAS	دستگاه اشعه ایکس	Leybold Didactic
فیلتر سرنگ	Orang scienific	لوله فالکون	Orang scienific
کرایوتیوپ	Orang scienific	فلاسک فیلتردار	Orang scienific

جدول ۲-۲: مواد مورد نیاز برای کشت و نگهداری سلول ها در تحقیق

نام ماده	شرکت سازنده	نام ماده	شرکت سازنده

Biowest	پن استرپ	Cigma	محیط کشت RPMI[1]
Gibco	تریپسین-EDTA	Biowest	FBS[2]
Merc	Na_2HPO_4	Merc	KH_2PO_4
Merc	NaOH	Merc	KCL
Atocel	MTT	Merc	NaCl
Merc	DMSO[3]	ایران	جنتامایسین
Bio-IDEL	تریپان بلو	Biowest	امفوتریسین B

۲-۲- تهیه مواد و محلول های مورد استفاده

محلول های به کار رفته در این پژوهش و نیز روش تهیه محلول هایی که نیاز به آماده سازی دارند در زیر آورده شده است.

۲-۲-۱- تهیه بافر سالین فسفات(PBS)

جدول ۲-۳- مواد و میزان مورد استفاده در تهیه بافر PBS

مواد	مقدار (گرم)	مواد	مقدار (گرم)
NaCl	۸	KCL	۰/۲
KH_2PO_4	۰/۲۴	$NA_2HPO_4.7H_2O$	۲/۶۸

این مواد را در ۸۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و PH محلول را بین ۷/۴-۷/۳ تنظیم و حجم محلول را به ۱۰۰۰ میلی لیتر می رسانیم پس از عبور این محلول از کاغذ صافی اتوکلاو شد.به منظور نگهداری طولانی مدت محلول PBS[4] , در یخچال ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

۲-۲-۲-آماده سازی محیط کشت

برای تهیه ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت RPMI از پودر آن , ۱/۰۴۳ گرم پودر محیط کشت RPMI و ۰/۲ گرم $NaHCO_3$, در ۸۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد. PH محیط روی ۷/۲ تنظیم شد و حجم محلول به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. به منظور نگهداری طولانی مدت محیط کشت در یخچال ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.برای کشت سلول های MCF-7 از محیط کشت آماده RPMI همراه با ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد پن استرپ

---

[1] -Rosewell park memorial institute
2-Fetal bovine serum
3-Dimethyl Solfoxide

[4] - Phosphate buffer saline
2- EthyleneDiamineTetraAcetic acid

استفاده شد. روش تهیه محیط کشت آماده (رشد) به این صورت بود که ۴۵ میلی لیتر از محیط کشت RPMI را به یک فالکون ۵۰ میلی لیتر منتقل می کنیم سپس ۵ میلی لیتر FBS حاوی ۵۰۰ میکرو لیتر پن استرپ (پنی سیلین –استرپتومایسین) به آن اضافه کردیم.(Kang et al).

۲-۲-۳- کشت سلول ها

رده سلولی MCF-7 در فلاسک T25 و در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد پنی سیلین-استرپتومایسین تحت شرایط انکوباتور (دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و CO_2 ۵ درصد و رطوبت ۹۰ درصد) کشت داده شد . سلول ها در تراکم ۸۰-۷۰ درصد هفته ای دوبار با استفاده از تریپسین-EDTA[۵] پاساژ داده شدند و در فاز لگاریتمی حفظ شدند (,Karangozlu 2010).

۲-۲-۴-آنتی بیوتیک ها

آنتی بیوتیک ها بایستی دارای ویژگی های زیر باشد:

۱-آنتی بیوتیک ها بایستی الودگی های میکروبی را از بین ببرد .

۲-آنتی بیوتیک ها نبایستی رشد و متابولیسم سلول های پستانداران را در کشت بافت مهار نکند.

۳-آنتی بیوتیک ها بایستی عامل حفاظت از سلول ها در یک دوره تجربی باشد.

۴-آنتی بیوتیک ها بایستی غیر سمی باشد.

۵-آنتی بیوتیک ها بایستی با سایر اجزای محیط کشت سازگار باشد.

جهت از بین بردن آلودگی محیط کشت سلول ها از آنتی بیوتیک پن استرپ (پنی سیلین –استرپتومایسین) استفاده شد. پنی سیلین جهت جلوگیری از رشد باکتری های گرم مثبت و استرپتومایسین جهت از بین بردن باکتری های گرم منفی استفاده می شوند.

۲

-۲-۵- آمفوتریپسین B

آمفوتریپسین B برای کنترل آلودگی های قارچی و مخمر مفید می باشد اما استفاده بیش از اندازه ممکن است برای سلول سمی باشد. برای هر ۵۰ میلی لیتر محیط کشت RPMI ۵۰۰ میکرو لیتر از آنتی بیوتیک آمفوتریپسین B استفاده می شود.

۲-۲-۶- تریپان بلو

تریپان بلو یک رنگ دی آزو است که بطور گسترده برای رنگ آمیزی سلول ها یا بافت های مرده بکار می رود.مکانیسم تریپان بلو طوری است که بر روی آن بار منفی وجود دارد و با سلول هایی تعامل می کند که غشای آن آسیب دیده باشد . تریپان بلو بطور معمول برای شمارش سلول ها در شرایط آزمایشگاهی استفاده می شود. در رنگ آمیزی با تریپان بلو سلول های زنده دارای سیتوپلاسم روشن در حالی که یک سلول مرده و بد شکل

Family name: Azizi Name: Hamid

Title of Thesis： The study of protective effects of propolis againist X-radiation on MCF-7 cell line

Supervisor(s): Saber Zahri (Ph. D)
Advisor(s): farhad zolfagharpour (Ph. D)

Graduate Degree **M.Sc.**
Major: Biology Specialty: Cell &Molecular Biology
University: **Mohaghegh Ardabili** Faculty: Faculty of Science
Graduation date: 2017-02-13 Number of pages: 60

Abstract:

Breast cancer is a major health problem for women all over the world .It is the second most common cancer after the lung cancer and the most common cause of cancer death among women. Propolis contains flavonoids and polyphenols that have notable antioxidant and anti-cancer and anti-microbial effects. The aim of this study was to investigate the protective effects of propolis against X-rays on the MCF-7 cell line. Analysis method: Propolis samples were extracted with 96% ethanol. MCF-7 cells were cultured in RPMI medium. EEP extract was dissolved in DMSO and used for cell treatment. The effect of propolis on viability of MCF-7 cells was determined by MTT assay. Effects of X-radiation along with extracts by assessment of the viability, cell apoptosis, and molecular methods were determined. Results: The results showed that propolis extracts in low concentrations had not significant lethal effect. As well as X-ray treatment had not lethal effect at the dose of 1 Gy, while the X-ray treatment with extracts showed significant cytotoxic effect. Ic50 of X-radiation and extract treatments was 14 micrograms/ml. In this study, AO / EB and Annexin-V / PI tests were used in order to search apoptosis in the treated cells. The rate of apoptosis in cells treated by X-ray along with 15 micrograms/ml of extract was significantly increased in compared with the control. Results and discussion: These findings suggested that propolis had not strong cytotoxicity effects in the low concentrations. However, the extract treatments along with the other compounds (X-ray) were the significantly cytotoxic.

Keywords: : Apoptosis , MCF-7, MTT assay, Propolis, X-ray

University of Mohaghegh Ardabili

Faculty of Science

Department of Cell & Molecular Biology

Thesis submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of M.Sc. in Biology

Title:

Thesis The Study of Protective Effects of Propolis Againist X-Radiation on MCF-7 Cell Line

Supervisor(s):

Dr. S.Zahri

Advisor(s):

Dr. F.Zolfagharpour

By:

Hamid Azizi

January – 2017