بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

دانشکده پزشکی

پایان‌نامه دوره دکترای حرفه‌ای پزشکی

عنوان

بررسی اثر miR29a بر بیان گیرنده های استروژن در سلولهای سرطان پستان لاین MCF-7

دانشجو: مریم رهنما

اساتید راهنما

دکتر غلامرضا خمیسی پور و دکتر صمد اکبر زاده

اساتید مشاور

دکتربهروز نعیمی و دکتر محمدرضا روانبد

استاد مشاور آمار

دکتر نیلوفر معتمد

این طرح با تصویب و حمایت مالی حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر اجرا گردیده است.

آبان ۹۳

شکر و سپاس خدا را که بزرگترین امید و یاور در لحظه لحظه زندگیست

سپاس خدای را که هرچه دارم از اوست

به امید آنکه توفیق یابم جز خدمت به خلق او نکوشم

تقدیم به پدر بزرگوار و مادر مهربانم

آن دو فرشته ای که از خواسته هایشان گذشتند، سختی ها را به جان خریدند و خود را سپر بلای مشکلات و ناملایمات کردند تا من به جایگاهی که اکنون در آن ایستاده ام برسم.

ای پدر...

از تو هر چه می گویم باز هم کم می آورم

خورشیدی شدی و از روشنایی ات جان گرفتم و در ناامیدی ها نازم را کشیدی

و لبریزم کردی از شوق

اکنون حاصل دستان خسته ات رمز موفقیتم شد.

به خودم تبریک می گویم که تو را دارم و دنیا با همه بزرگیش مثل تو را ندارد.

و تو ای مادر...

ای شوق زیبای نفس کشیدن

ای روح مهربان، هستی ام

تو رنگ شادی هایم شدی و لحظه های تلخ را با تمام وجود از من دور کردی و

عمری خستگی ها را به جان خریدی تا اکنون توانستی طعم خوش

پیروزی را به من بچشانی

بوسه بر دستان پر مهرتان

تقدیم به برادر عزیز و مهربانم

که همواره در طول تحصیل متحمل زحماتم بود و تکیه گاه من در مواجهه با مشکلات و وجودش مایه دلگرمی من می باشد.

تقدیم به خواهر پاک و دوست داشتنی ام

که کاستن از دردهای او همواره انگیزه من برای تحصیل بود...

اکنون که این پایان‌نامه به پایان رسیده است، بر خود لازم می‌دانم تا از الطاف بی دریغ استاد گرانقدرم دکتر اکبرزاده که همواره با صبر و حوصله فراوان،راهنما و یاریگر من بوده‌اند و با راهنمایی‌های ارزنده، تلاش‌ها و کمک‌های مستمر خود اینجانب را یاری نموده‌اند، کمال تشکر و قدردانی را به عمل آورم.

همچنین از اساتید بزرگوارم، دکتر خمیسی پور،دکتر نعیمی و سرکار خانم دکتر معتمد و دکتر روانبد که در به ثمر رساندن این پایان نامه، زحمات فراوانی را متقبل شدند سپاسگزارم.

از کمک های بی دریغ جناب آقای دکتر شمسیان و آقای حسن پور که برای انجام آزمایش های این پایان نامه قبول زحمت کرده و مرا راهنمایی کردند، بی نهایت سپاسگزارم.

از معلمان بزرگ زندگیم،پدر عزیز و مادر مهربانم که همانا بهترین اساتید و دوستان من در طول زندگی بوده‌اند، بی‌نهایت سپاسگزارم.

از تمامی دوستان و عزیزانی که در این راه مرا راهنمایی و کمک نموده اند،کمال تشکر و قدردانی را دارم.

چکیده

زمینه و هدف:

سرطان پستان از شایع ترین سرطان های زنان در جهان محسوب می شود. مطالعات اخیر، افزایش microRNA-29a در سرم بیماران مبتلا به سرطان پستان را نشان داده که گویای نقش آن در پاتوژنز این بیماری است. MicroRNA ها در فرایندهایی مثل تکثیر و آپوپتوز نیز نقش دارند. با توجه به نقش استروژن و گیرنده استروژن در پیشرفت سرطان پستان و همچنین رشد و تکثیر سلولهای پستان، هدف در این مطالعه بررسی اثر مهاری microRNA-29a بوسیله anti-microRNA-29a، روی بیان ER-α در سلولهای لاین سرطان پستان MCF-7 می باشد.

روش بررسی:

سلولهای MCF-7 در محیط RPMI1640 با FBS ۱۰٪ کشت داده شدند. گروه های مورد مطالعه شامل (شاهد و تیمار شده با Anti mir-29a ، Anti mir-29a + Taxol ، Taxol) که پس از استخراج total RNA و سنتز cDNA ، از نظرتغییرات بیان ERα توسط RT PCR بررسی شدند.

یافته ها:

یافته ها نشان داد، antimir29a ۲۷٪، تاکسول ٤۲٪ و antimir29a+taxol ٥٤٪ بیان ER-α را کاهش دادند. بین تمامی گروه های مورد مطالعه، تفاوت معنی داری (p value<0.05) وجود داشت.

نتیجه گیری :

نتایج نشان داد، ممکن است با به کارگیری مهارکنندهmiR29a بتوان با دوز کمتر شیمی درمانی با تاکسول بیماران مبتلا به سرطان پستان را درمان کرد.

کلمات کلیدی: سرطان پستان، microRNA-29a ، گیرنده استروژن، آپوپتوز، تاکسول

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

چکیده فارسی

فصل اول – مقدمه

بخش اول:بیان مسئله ۱

بخش دوم: اهداف و فرضیات مطالعه..... ۵

بخش سوم:کلیات..... ۷

فصل دوم – مروری بر متون

مروری بر تحقیقات گذشته ٤٤

فصل سوم – مواد و روش کار

مواد و روش کار..... ٥٦

فصل چهارم – نتایج

نتایج..... ۸۲

فصل پنجم – بحث و نتیجه گیری

بحث ۹۳

نتیجه گیری و پیشنهادات ۹۸

منابع و مآخذ..... ۱۰۰

چکیده انگلیسی ۱۱۵

فهرست جداول

جدول ۱-۱ – آنزیمهای بیوسنتز miRNA ۲۰
جدول ۱-۲- میزان شیوع ابتلا به سرطان پستان درگرو ه های مختلف سنی در زنان ۳٤
جدول ۲ – ۱- مقایسه microRNA ها در دو بافت سرطانی و غیر سرطانی ۵۱
جدول ۳-۱- ویژگی های سلولهای MCF – 7 ..... ۵۸
جدول ۳-۲- ساخت Master mix برای ترانس فکشن ٦۷
جدول ۳-۳- معرفی گروه های مورد مطالعه ومحتویات آنها برحسب میکرولیتر ٦۷
جدول ۳-٤- مشخصات پرایمرهای استفاده شده برای سنتز cDNA ۷۳
جدول۳-۵- تهیه Master mix برای سنتز cDNA با پرایمراختصاصی mir 29a و
U6 snRNA ۷۳
جدول ۳-٦- برنامه دمایی سنتز cDNA با پرایمر اختصاصی ۷٤
جدول ۳-۷- مواد مورد استفاده برای سنتز cDNA با پرایمرعمومی ۷۵
جدول ۳-۸- برنامه دمایی سنتز cDNA با پرایمر عمومی ۷۵
جدول ۳-۹- مشخصات پرایمرهای استفاده شده در Realtime ۷۸
جدول ۳-۱۰- مواد مصرفی در مخلوط Realtime PCR برای miR-29a و
U6 snRNA ۷۹
جدول ۳-۱۱- برنامه حـرارتی Realtime PCR برای miR-29a و U6 snRNA ۸۰
جدول ۳-۱۲- مواد مصرفی در مخلوط Realtime PCR برای ژن HPRT و ER-α ۸۱
جدول ۳-۱۳- برنامه حرارتی Realtime PCR برای ژن HPRT و ER-α ۸۱
جدول ٤-۱- مقادیر Ct ژن miR-29a و U6 snRNA ۸۳
جدول ٤-۲- نسبت تغییرات بیان ژن miR-29a در گروههای تیمار شده به کالیبراتور با

روش فافل ۸۵
جدول ٤-۳- مقادیر Ct ژن ER-α و HPRT.....۸۷
جدول ٤-٤- نسبت تغییرات بیان ژنER-α در گروههای تیمار شده به کالیبراتور با
روش فافل ۸۹
جدول ٤-٥- مقایسه مقادیر تغییرات بیانER-α پس از تیمار با Anti miR-29a ،
Taxol و Antimir29a+Taxol ۹۰
جدول ٤-٦- مقادیر میانگین و انحراف معیار تغییرات بیانER-αپس از تیمار با
Anti miR-29a، Taxol و Antimir29a+Taxol.....۹۱

فهرست تصاویر

شکل ۱-۱- مقایسه سلولهای سالم و سرطانی.....۱۰
شکل ۱-۲- انتقال اپیتلیال –مزانشیمال و کاهش بیان کادهرین ۱۱
شکل ۱-۳- متاستاز در کارسینومای پستان.....۱۳
شکل ۱-٤- منشا های احتمالی ایجاد سلول های بنیادی سرطانی ۱٦
شکل ۱-۵- بیوسنتز miRNA ۲۱
شکل ۱-٦- قسمتهای تشکیل دهنده ی غدد پستانی سرطانی.....۳٦
شکل ۱-۷- مراحل چهارگانه سرطان پستان ۳۸
شکل ۳-۱- تصویر الکتروفورز total RNA استخراج شده روی ژل آگارز ۲٪ ۷۱
شکل ٤-۱- منحنی PCR مربوط به گروه های کالیبراتور و تیمار شده.....۸٤
شکل ٤-۲- نمودار منحنی ذوب برای گروههای کالیبراتور و تیمار شده ۸٤
شکل ٤-۳- منحنی PCR مربوط به گروه های کالیبراتور و تیمار شده با Anti miR-29a
Taxol و Antimir29a+Taxol ۸٦
شکل ٤-٤- نمودار منحنی ذوب برای گروههای کنترل و تیمار شده با Anti miR-29a ،
Taxol و Antimir29a+Taxol ۸۷
شکل ٤-۵- نمودار ستونی تغییرات بیانER-α پس از تیمار با Anti miR-29a ،
Taxol و Antimir29a+Taxol ۹۰

فصل اول

مقدمه

مقدمه

سرطان پستان یکی از سرطان های بسیار شایع بین زنان در جهان می باشد. آمار جهانی نشان می دهد، شیوع سالانه سرطان پستان در حال افزایش می باشد ودر کشورهای با میزان شیوع سرطان پستان پایین، به سرعت در حال افزایش می باشد(۱و۲). به نقل از گزارشات سالانه، بیش از۱/۵میلیون زن در جهان تشخیص داده می شوند و حدود٤٦٠ هزار نفر درسال۲۰۰۸ از این بیماری مرده اند(۳). در ایران میزان این بیماری در حال افزایش است وبیماران در مراحل پیشرفته خودشان را بروز می دهندو سن ابتلا به این بیماری، حدود ۱۰ سال جوانتر از همتایان غربی است(٤) ومیانگین سنی بروز آن، حدود ٤٧ سال است (٥). در اغلب موارد، درمان سرطان به دلیل ایجاد مقاومت دارویی با مشکل مواجه می گردد. بررسی های اخیر نشان دهنده دخالت RNAهای غیر کدکننده تحت عنوان microRNA در ایجاد سرطان و نقش احتمالی آنها در مقاومت دارویی می باشند. microRNA ها، RNAهای غیر کدکننده دارای ۱۸ تا۲۲نوکلئوتید هستند که بیان ژن را به طور اختصاصی از طریق متوقف ساختن ترجمه پروتئین یا ازبین بردنRNAی مربوطه کاهش می دهند (٦و۷). miRNA ها فرایندهای سلولی گوناگونی را تنظیم می کنند؛ از جمله، پیشبرد چرخه سلولی، تکثیر،آپوپتوز ورشد (۸). ثابت شده است miRNAها هم به عنوان انکو ژنها و هم به عنوان ژنهای سرکوبگر تومور عمل می کنند(٦). هم چنان که miRNA های مختص سرطان برای اساس و پایه مولکولی سرطان مهم هستند،miRNA هایی که در خون وجود دارند، به عنوان یک نشانگر بیولوژیکی می توانند برای جداسازی زودهنگام، تشخیص و پیگیری بیماران سرطانی بسیار حیاتی باشند(۹). در بسیاری از سرطان ها بیان miRNA به طور کلی کاهش یافته است، به صورتی که بسیاری از آنها به عنوان مهار گر

تومور عمل می کنند (۱۰). به علاوه، تومورهای با تمایز پایین نسبت بـه تومورهـای بـا تمـایز بـالا، سـطح miRNA پایین تری دارند که نشان می دهد، تغییرات کلی در بیان miRNA، می تواند نشان دهنده درجـه تمایزسلولی باشد (۱۱). یکی از این miRNA ها،miR29a می باشد که به طور متمایزی در انواع مختلفـی از سرطان ها وجود دارد وعملکردهای اختصاصی بافتی دارد (۱۲). Lorio و همکارانش (۱۳) در آنالیزشان از ۷٦ نمونه بیمار سرطان پستان و ۳٤ نمونه سالم، miRNA-29a را شناسایی کردند که در بافت سرطانی پستان در مقایسه با بافت نرمال بیان متفاوتی داشـتند و عـلاوه بـر آن، مجموعـه ای از پـانزده miRNA را مشخص نمودند که بین بافت توموری و نرمال متمایز هستند. از بررسی سرم بیماران مبتلا به سرطان پستان، افزایش ۱۵ برابری mir-29a نسبت به افراد سالم گزارش شده است (۱٤) . Bcl-2و Mcl-1، هدف های مستقیم mir-29 می باشند وعمل آنتی آپوپتوتیک را از طریق مسیر پیام دهی میتوکنـدریایی بـه کـار مـی گیرند. به جز mir- 29a، دو مورد دیگر mir- 29b و mir- 29c خانواده mir-29 را تشکیل می دهند که پتانسیل عمل سرکوبی تومورا دارند. تابه امروز چندین آنکوژن شامل مولکول های وابسـته بـه آپوپتـوز مثل(Mcl -1) [1]،(TCL-1) [2]، (CDC42) [3] و(PIK3R1) [4] به عنوان هدف هـای خـانواده mir-29 مشخص شده انـد. اخیـرا مشـخص شـده اسـت کـه mir- 29a، mir- 29b و mir -29c، ژن P53 را ازطریق هدف قراردادن P85α و CDC42 تنظیم می کنند و موجب آپوپتوز درژن P53 مربوطه، درلاین های سلول سرطان پستان وکولو رکتال می شوند (۱۵و۱٦). mir-29 پروتئین هـای چنـد گانـه ای را مـورد

[1] myeloid cell leukemia sequence- 1
2 T cell leukemia/lymphoma- 1
3 cell division cycle
[4] phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit-1

هدف قرار می دهد که ممکن است درفرآیندهای مختلف سلولی شامل رشد، مـرگ وتمایزسـلول همکـاری کنند (۱۷-۲۲) .

در سال ۲۰۰۸،breast cancer fund، شواهد جامعی در مورد ریسک فاکتور های شناخته شده مـرتبط بـا سرطان پستان منتشر کرد و به نقش استروژن در پیشرفت سرطان پستان تاکید کرد (۲۳-۲۵). این هورمون و سایر ترکیبات مشابه، به گیرنده های استروژنی داخل سلولی متصل می شوند و آبشاری از فرآیندها که منجر به تکثیر سلولی می شود را شروع می کنند. این فرآیند، منجـر بـه افـزایش انـدازه پسـتان در دوران بلـوغ و حاملگی می شود؛ هر چند می تواند منجر به جهش سلولی هم شود (۲٦). تحقیقات صورت گرفتـه کـه بـر روی مکانیسم مولکولی تنظیم و ترجمه ژن های هدف توسط گیرنده های استروئیدی کـار مـی کنـد، شـبکه بسیار پیچیده ارتباطات پروتئین-پروتئین، علاوه بر ارتباطات پروتئین-DNA را آشکار کرده است که بـرای عملکرد درست هورمون های استروئیدی لازم است. بی نظمی در این مکانیسم تنظیم شده پیچیده، می تواند پیام دهی گیرنده های استروئید را به هم بزند. مخصوصا، جهش در گیرنده استروژن که بیـان ایـن گیرنـده را تغییر می دهدو در سرطان پستان شناخته شده است، با پیشرفت سـرطان و مقاومـت هورمـونی ارتبـاط دارد (۲۷و۲۸).

بسیاری از تومورهای پستان، گیرنده های ER-αوER-β را بیان می کنند که در نمـو و تمـایز سـلول هـای پستانی اثر برعکس هم دارند. ER-α تکثیر سلول ها را زیاد می کند، در صورتی که ER-β آن را مهار می کند (۲۹). مطالعات بسیاری، MicroRNA هایی را نشان داده اند که بـه وسـیله اسـتروژن در سـلول هـای

سرطانی تنظیم می شوند که شامل miR-17~92 و miR-106a~363 می باشد که توسط استروژن در سلول های MCF-7 تنظیم افزایشی[1] می شوند و به عنوان تنظیم کننده های منفی گیرنده های استروژن و فعال کننده های همراه آن یعنی AIB1(۳۰)و miR-21و Let-7(۳۱) فعالیت می کنند. Maillot وهمکارانش در سال ۲۰۰۹، نظرات ضد و نقیضی در رابطه با این دارند که استروژن در سلول های MCF-[2] 7، MicroRNAها را فقط تنظیم کاهشی[3] می کند، داشتند (۳۲). مخصوصا miR-26aو miR-181a، با قدرت زیاد، تکثیر تحریک شده توسط استروژن را مهار می کنند و به طور مستقیم گیرنده پروژسترون را مورد هدف قرار داده و مهار می کنند. از سوی دیگر MicroRNAهایی که ER-α را تنظیم می کنند، از جمله miR-206 و miR-221/222(۳۳)، با این یافته که miR-221/222 در سلول های مقاوم به تاموکسیفن ،تنظیم افزایشی می شود،همخوانی دارد.

با توجه به اثر شناخته شده miR29a در سرطان پستان وهم چنین نقش گیرنده های استروژن در درمان و پیشرفت سرطان، لذا بر آن شدیم تا اثر مهاری miR29a را روی بیان ژن گیرنده استروژن در سلول های لاین سرطان پستان MCF7 بررسی کنیم و از نتایج آن در درمان موثرتر سرطان پستان استفاده کنیم.

[1] Upregulate
[2] Michigan Cancer Foundasion – 7
[3] downregulate

اهداف اصلی طرح

- تعیین اثر miR29a بر بیان گیرنده های استروژن در سلول های سرطان پستان لاین MCF7

اهداف فرعی طرح

- مقایسه اثر taxol بر بیان گیرنده های استروژن در سلول های سرطان پستان لاین MCF7 با اثر miR29a بر بیان گیرنده های استروژن.

اهداف کاربردی

- درصورت دستیابی به نتایج مثبت این طرح تحقیقاتی، می توان پس ازآزمایش در فازحیوانی ، از antimir29a در درمان موثرتر سرطان پستان به جای رژیم شیمی درمانی معمول و کاهش رشد سلول های سرطانی استفاده کرد.

فرضیات یا سوالات پژوهش با توجه به اهداف طرح

- کاهش mir29a با بیان گیرنده های استروژن در سلول های سرطان پستان لاین MCF7 ارتباط مستقیم دارد.
- تاثیرmir29a بر بیان گیرنده های استروژنی قابل مقایسه با اثر داروی تاکسول می باشد.

کلیات

۱-۱- سرطان و مکانیسم سلولی و ملکولی آن

به طور اساسی سرطان یک بیماری ژنتیکی است. تغییراتی که در ماده ژنتیکی رخ می دهد و آسیبی که به DNA وارد می شود، علت اولیه سرطان می باشد. تغییرات ژنتیکی بر اثر جهش هایی رخ می دهند که رفتار سلولی را تغییر داده و منجر به رشد غیرقابل کنترل و بیش از حد سلولها می شوند(۳٤). بروز این بیماری نیازمند تجمع جهش های متعددی در سطح ژنوم است. جهش های چند گانه در ژن ها یی رخ می دهند که نقش های حیاتی در تقسیم سلولی، آپوپتوز، رشد و تمایز سلولی دارند(۳۵و۳٦).

در سرطان، تغییراتی در مکانیسم های سلولی و ملکولی رخ می دهند که منجر به نقص در سیستمی می شوند که به طور معمول، رشد و تکثیر سلول را کنترل می کند. تغییرات سلولی که در سرطان رخ می دهند شامل قدرت همانند سازی نامحدود، خودکفایی در سیگنالهای رشد، تهاجم بافتی، متاستاز، افزایش رگزایی، گریز از آپوپتوز و عدم حساسیت به پیامهای مهار کننده رشدمی باشد که باعث می شود سلولهای سرطانی بتوانند در محیط رشد لازم برای تومور زنده بمانند. سلولهای توموری برای زنده ماندن و رشد باید تغذیه شوند که طی فرایندی به نام رگزایی[1] ابتدا غشای پایه[2] ای که مویرگ مجاورش را در برگرفته، تجزیه می شوند. سپس سلولهای آندوتلیال آستر کننده مویرگ، به داخل تومور مهاجرت کرده و

[1] Angiogenesis
[2] Basement membrane

با تقسیم این سلولهای اندوتلیال و تشکیل یک غشای پایه جدید در اطراف مویرگ جدید، رگزایی ایجاد می شود(۳۷).

فرایندهای ملکولی تنظیمی نیز همچون همانندسازی کروموزومی و تقسیم سلولی، برای رشد و تکامل بسیار حیاتی اند. فقدان چنین کنترلی در نهایت می تواند موجب سرطان شود.بدین ترتیب می توان گفت سرطان بیماری نقص چرخه سلولی و از تنظیم خارج شدن آن می باشد که در اثر ایجاد نقص در مسیرهای پیام دهی آپوپتوز و پروتئینهای آنتی آپوپتوتیک مانند Bcl-2 حاصل می شود(۳۸).

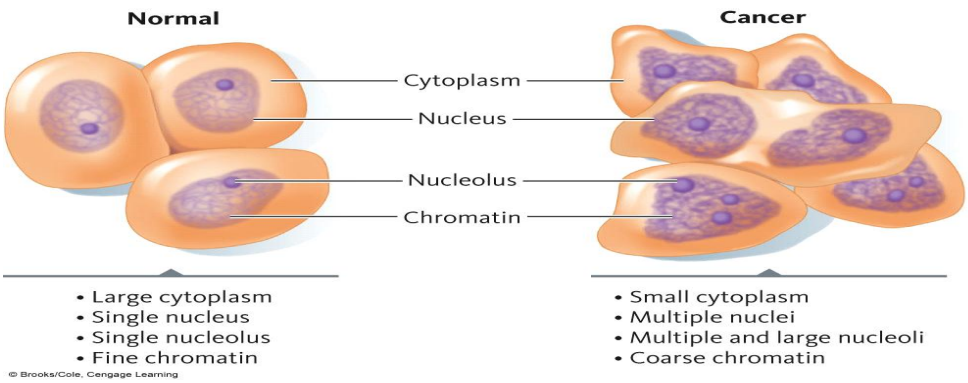
کارسینوژن ها شامل عوامل فیزیکی و شیمیایی از جمله اشعه ایکس، اشعه ماوراء بنفش، دود سیگار، حشره کشها و ویروس ها هستند که به صورت مستقیم یاغیرمستقیم با ایجاد جهش هایی در شکل گیری تومور دخیل هستند. اگر تومور حاصل، در یک جا ساکن بماند و اندازه کوچکی داشته باشد خوش خیم است. سلولهای تشکیل دهنده تومورهای خوش خیم بسیار شبیه سلولهای عادی هستند و معمولا" یک کپسول رشته ای، حد و مرز یک تومور خوش خیم را مشخص می کند؛ اما تومور بدخیم یا سرطان، بسیار سریعتر از یک سلول عادی رشد می کند، تقسیم می شود و منجر به تهاجم درون بافتهای مجاور می شود. البته برخی از تومورهای بدخیم، از قبیل آنهایی که تخمدان و یا پستان را درگیر می کنند، برای مدت زمان کوتاهی در جای خود ساکن می مانند و درون یک کپسول قرار می گیرند. زمانی که این تومورها به رشد پیشرونده خود ادامه می دهند، سلولها به بافتهای اطراف حمله کرده و سبب متاستاز می شوند. اغلب سلولهای بدخیم سرانجام توانایی متاستاز را به دست می آورند(۳۹).

در دسته بندی تومورهای بدخیم برحسب منبع جنینی، با توجه به اینکه از کدام یک از بافتهای اپیتلیـومی از قبیل اندودرم ،اکتودرم و مزودرم منشا گرفته باشند، نام گذاری متفاوتی دارنـد. بـه طـوری کـه اگـر از اپیتلیوم دستگاه گوارش، پوست یا عصب منشاء گرفته باشند، تحت عنوان کارسـینوما و اگـر از مـزودرم ماهیچه،خون و پیش سازهای بافت پیوندی منشا گرفته باشند، سارکوما نامیده مـی شـوند. کارسـینوماها، شایع ترین انواع تومورهای بدخیم هستند و بیش از۹۰درصد سرطانهای انسانی را شامل می شوند(٤٠).

۱-۲- تغییرات سلولی سرطان

قبل از بروز علایم کلینیکی در بیماران سرطانی، تغییرات فراوانی در سلول‌های توموری بوجود می‌آید که اغلب آنها را می توان توسط بررسی های میکروسکوپی از سلول های سالم تشـخیص داد. ایـن سـلولها اغلب نسبت به سلولهای سالم یا سلولهای تومور خوش خیم، تمایز یافتگی کمتری دارند. در یک بافـت خاص، سلولهای بدخیم معمولا" نشانه هایی از رشد سریع سلولی را نشان می دهند که در ایـن سـلولها نسبت هسته به سیتوپلاسم بالاست، هستکها متعدد، بزرگتر و بطور برجسته ای قابـل تشـخیص هسـتند. کروماتین ضخیم شده [1]، دفعات تقسیم میتوز افزایش یافته و به طور محسوسی، ساختار آنها تمایز یافتگی کمی دارند. وجود چنین سلولهای مهاجمی با ویژگی های مذکور در هـر قسـمتی از یـک بافـت، بـرای تشخیص یک سرطان بدخیم بکار می رود(٤١). (شکل۱-۱)

[1] Coarse chromatin



شکل۱-۱- مقایسه سلولهای سالم و سرطانی(٤١)

سلول های سرطانی برای تکثیر شدن نیازی به پیام های القاگر خارج سلولی ندارند. این سلولها پیام های حسی را که سبب مهار تقسیم سلولی می شوند، رد کرده و در مقابل مرگ سلولی مقاوم می شوند. توانایی اتصال آنها به سلول‌های دیگر کاهش یافته است؛ به طوری که ارتباطشان با سلولهای مجاور یا ماتریکس خارج سلولی قطع شده و از جای خود حرکت کرده، تومور را پخش کرده و متاستاز را افزایش می دهند(٤١).

اتصال سلول – سلول

کادهرین[1] ها یک گروه از پروتئین های درگیر دراتصالات سلولی هستند که نقش مهمی در طی تمایز بافتی ایفا می کنند. کادهرین ها انواع مختلفی دارند که هر کدام از آنها دارای یک توزیع بافتی معینی می باشند. مقدار یا ماهیت کادهرین های سطح سلول در دوره تمایز، تغییر کرده و بر روی مهاجرت سلولی وهمچنین بر بسیاری از جنبه های اتصال سلول – سلول موثر می باشند. دراغلب موارد، تبدیل سلولهای اپیتلیال ثابت به سلولهای پیش ساز متحرک ، در طی اندام زایی برای بافتها ی سلول های مزانشیمی رخ می دهد. می توان گفت در واقع انتقال اپیتلیال – مزانشیمال (EMT) در سلول های سرطانی یکی از

[1] Cadherin

مکانیسم هایی است که تحرک و قدرت تهاجم سلول را افزایش می دهد و از راه کاهش در میـزان بیـان پروتئین های درگیر در اتصالات سلول به سلول از جمله E – کادهرین مشخص می شود(٤٢). (شـکل a و b ١-٢)

مهار E – کادهرین توسط تنظیم کننده های رونویسی نیز انجام می شودکه برخی از تنظیم کننـده هـای رونویســـــی شـــــامل l snail, zinc-finger E-box-binding homeobox1 (ZEB1/TCF8/_EF1), ZEB2/SIP1 می باشند.

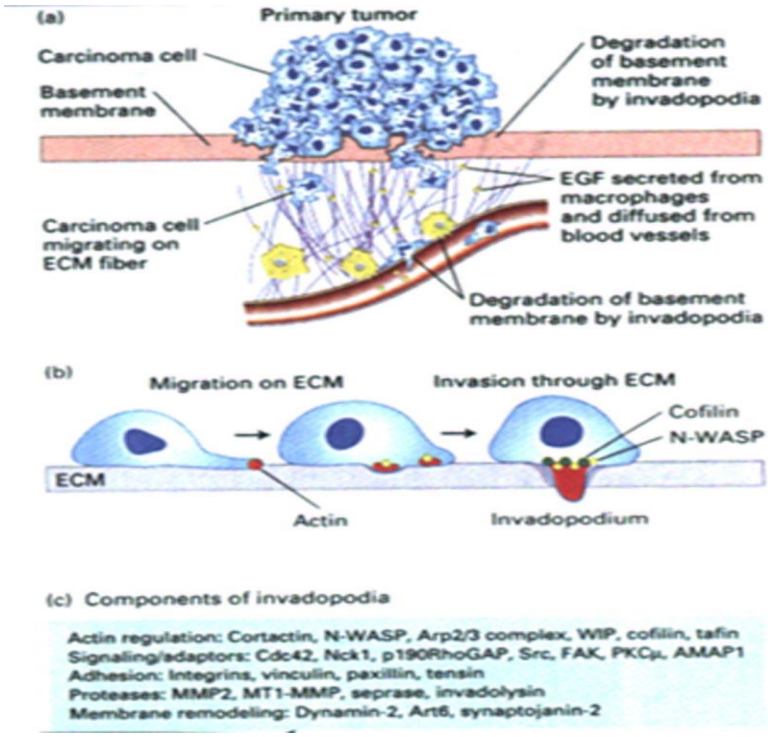
تبدیل سلول های اپی تلیال به سلولهای سرطانی بدخیم، از قبیل تومورهای مجاری پستان یا سرطان ارثی منتشره دستگاه گوارش، (شکلc ١- ٢) نیز به واسطه کاهش در فعالیـت E – کـادهرین مشـخص مـی گردد.

شکل ١-٢- انتقال اپیتلیال –مزانشیمال و کاهش بیان کادهرین (٤٣)

اتصال سلول – ماتریکس خارج سلولی (ECM)[1]

ارتباط پیچیده ای بین سلول های سرطانی با غشای پایه و ماتریکس خارج سلولی وجود دارد. غشای پایه توسط این سلولها، تجزیه شده تا بتوانند به داخل آن نفوذ کنند و متاستاز دهند. گاهی نیز سلول های سرطانی در امتداد غشا حرکت کرده و به داخل خون وارد می شوند. نفوذ سلول های سرطانی به داخل ماتریکس، از طریق یک پیش رفتگی سلولی به نام اینوادوپودیوم[2] انجام می شود که این پیش رفتگی، آرایشی مشابه اکتین در اسکلت سلولی دارد(٤٤). (شکل a و b ١-٣) جهت هضم غشای پایه، یک پروتئین ویژه فعال کننده پلاسمینوژن، توسط سلول های سرطانی ترشح می شود که سبب تبدیل پروتئین پلاسمینوژن سرم به پروتئاز فعال پلاسمین می شود. افزایش فعالیت پلاسمین به همراه فعالیت سایر پروتئازها، منجر به هضم غشای پایه و شروع متاستاز می شود. در متاستاز، سلولها تومور اولیه را ترک می کنند؛ اما کمتر از ١ در ١٠٠٠٠ سلول هایی که تومور اولیه را ترک میکنند، زنده می مانند تا در بافتهای دیگر کلونی تشکیل دهند و یک تومور ثانویه متاستازی ایجاد کنند. در طی تشکیل سلول توموری و متاستاز، تغییرات موثری نیز در اسکلت سلولی رخ می دهد. این تغییرات ممکن است در نتیجه تغییر در بیان ژنهای کد کننده Rho[3] و سایر GTPase های کوچکی که اکتین موجود در اسکلت سلولی را تنظیم می کنند، ایجاد گردند. ژن Rho C که توسط سلولهای سرطانی به میزان زیادی بیان می شود، پروتئینی را بیان می کند که شروع انقباض اکتین /میوزین در سلولها را بر عهده دارد و این افزایش در فعالیت Rho C ، متاستاز را تحریک می کند(٤٤). (شکل ١-٣)

[1] Extracellular matrix (ECM)
[2] Invadopodium
[3] Ras homolog gene family



شکل ۱-۳- متاستاز در کارسینومای پستان(٤٤)

متالوپروتئازها و سایر پروتئازهای مربوط به ماتریکس، توسط سلول های کارسینومای پستان، ترشح شده تا راهی را برای خود باز کنند. این سلول ها، تومور اولیه را ترک کرده و به غشای پایه مـی چسـبند و از فیبرهای ماتریکس خارج سلولی (ECM) برای رسیدن به رگ های خونی استفاده مـی کننـد. در رگ های خونی، این سلول ها می توانند به لایه سلول های اندوتلیالی که دیواره عروق را تشکیل مـی دهنـد، نفوذ کرده و به داخل گردش خون وارد شوند(٤٤). سلول هایی که تومور های جدید را ایجاد می کننـد، با یک سلول آندوتلیال که یک مویرگ را آستر کرده است، اتصال برقرار کرده، بـه آن مـی چسـبند و در امتداد آن مهاجرت کنند و یا به داخل بافتی که در زیر این لایه آستری وجود دارد، نفوذ می کنند. لایـه

های بافتی چند گانه که سلولهای بدخیم را پوشانده اند، اغلب حاوی پروتئین های سطحی جدید یا تغییر یافته ای هستند که توسط سلول های توموری ساخته شده اند(٤٤). (شکل c ۱-۳)

۱-۲-۱- سلولهای بنیادی سرطان (CSCs)[1]

در هر توموری تنها سلول های خاصی وجود دارند که توانایی تقسیم شدن به طور کنترل نشده را دارا می باشند و تومورهای جدید را بوجود می آورند. چنین سلول هایی، سلولهای توموری بنیادی نام دارند. این سلولها حتی به تعداد کم نیز قادر به ایجاد تومور می باشند. آنها می توانند منبعی از سلولهای خود نگهدار با توانایی منحصر به فرد برای خود بازسازی و نگهداری تومور را تشکیل دهند(٤٥-٤٩). از بررسی سلولهای بنیادی سرطانی، می توان پی برد که در یک تومور خاص، حتی اگر از یک سلول مبدا منشا گرفته باشند، باز هم تمام سلول ها به هم شبیه نیستند. از طرفی می توان گفت تعداد کمی از سلول ها، ممکن است واقعا" خطرناک باشند و میزان رشد این سلولها نیز، بسته به شرایط اختصاصی محیط هر تومور، ممکن است سریع یا آهسته صورت گیرد. حاصل تقسیم سلول های توموری بنیادی، دو سلول دختری می باشد که یکی سلول توموری بنیادی و دیگری یک سلول با ظرفیت همانندسازی محدود است. سلول های توموری حاصل، زیاد تمایز یافته نیستند؛ اما نسبت به سلول های پیش سازشان تا حدی متمایز شده اند. تومورها می توانند ازسلول های بنیادی سالم نیز منشا یابند. به نظر می رسد برخی از انواع تومورها، خودشان سلول بنیادی هستند . بنابراین می توان گفت این سلول های توموری، قابلیت ایجاد یک تومور جدید را دارند. در برخی از آنها تقسیم متوقف شده است؛ اما رشد، همچنان به صورت سرطانی ادامه دارد. پس سلول های توموری متنوع هستند. شرایط محیطی سلول های

[1] Cancer stem cells

بستر یا همان سلول های آشیانه ای که سلول های بنیادی سرطانی در آن قرار دارند، در نوع رفتاری که آنها از خود بروز می دهند، بسیار موثر می باشد. به طوری که ممکن است برخی سلول های مجاور منجر به رشد بیشتر سلول های توموری بنیادی شوند. البته این وابستگی به آشیانه را در سلول بنیادی سالم نیز می توان دید. پیام های تولید شده توسط سلول های آشیانه باعث می شوند که سلول های بنیادی عادی، بتوانند هم خودشان و هم سلول هایی که تکثیر و تمایز می یابند را تولید کنند(٤٤). (شکل a ١-٤) بروز جهش و یا هر تغییری در شرایط طبیعی سلول، باعث می شود سلول بنیادی تکثیر یافته و سلول های جدید ایجاد شوند و سلول های سرطانی به طور قابل ملاحظه ای توسعه یابند(٥٠). (شکل b ١-٤) بدین ترتیب به جای سلول های آشیانه، سلول های بنیادی سرطان جایگزین شده و با دریافت پیام و افزایش رشد، به سمت متاستاز پیش می روند. (شکل c ١-٤) تغییرات ژنتیکی در سلول های بنیادی سرطانی، باعث شده است آنها از لحاظ رشد، مستقل از سلول های آشیانه شوند. به عبارتی، نیاز به دریافت پیام های حفاظتی سلول های نگهدارنده نداشته و تحت تاثیر پیام های خودشان می باشند(٤٤). (شکل d ١-٤) جهش ها باعث می شوند، سلول هایی که قابلیت خود بازیابی کوتاه مدت دارند، به سلول های سرطانی با قدرت بالای همانندسازی و خاصیت خود تجدید شوندگی در سلول های پیش ساز تبدیل شوند(٥٠). (شکل e١-٤)