دانشگاه علوم پزشکی

وخدمات بهداشتی درمانی کرمان

دانشکده پزشکی

پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی بالینی

عنوان:

بررسی اثر عصاره ی آبی برگ های گیاه داتوره اینوکسیا بر بیان ژن های آپاپتوزی (Bax، Bcl-2، کاسپاز ۳ و کاسپاز ۹) در سلول های سرطانی K562

توسط:

ستاره جوانشیر گیو

اساتید راهنما:

دکتر غلامعباس محمدی | دکتر الهام چمنی

استاد مشاور:

دکتر کاظم دستجردی

شماره پایان نامه: **۵۸۳** **سال تحصیلی: بهار۱۳۹۹**

بسمه تعالی

تاریخ ۹۸/۱۰/۲۸

شماره ۹۹۲۰۵۸۳

کد اخلاق.....

صورتجلسه دفاع از پایان نامه

دانشگاه علوم پزشکی کرمان

تحصیلات تکمیلی دانشگاه

جلسه دفاعیه پایان نامه تحصیلی **خانم ستاره جوانشیر** دانشجوی کارشناسی ارشد رشته **بیوشیمی بالینی** دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان تحت عنوان " **بررسی اثر عصاره ی آبی برگ های گیاه تاتوره اینوکسیا بر بیان ژن های آپاپیتوزی Bcl-2,Bax ، کاسپاز۳ و کاسپاز۹) در سلول های سرطانی K562**" در ساعت ۱۰روز **شنبه مورخ ۹۸/۱۰/۲۸** حضور اعضای محترم هیات داوران متشکل از:

سمت	نام و نام خانوادگی	امضا
الف:استادان راهنما	**جناب آقای دکتر غلامعباس محمدی** **سرکارخانم دکتر الهام چمنی**	
ب: استادان مشاور	**جناب آقای دکتر کاظم دستجردی**	
ج: عضو هیات داوران (داخلی)	**جناب آقای دکترمحمد هادی نعمت اللهی**	
د :عضو هیات داوران (خارجی)	**جناب آقای دکتر شهریار دبیری**	
ه :نماینده تحصیلات تکمیلی	**سرکار خانم دکتر آسیه صادقی**	

تشکیل گردید و ضمن ارزیابی به شرح پیوست با درجه .....عالی..... و نمره .....۱۸.۸۱..... مورد تأیید قرار گرفت.

مهر و امضاء معاون آموزشی

دانشگاه علوم پزشکی کرمان
دانشکده پزشکی افضلی پور

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و اهداف

۱-۱ بیان مسئله و اهمیت موضوع ..... **Error! Bookmark not defined.**

۱-۲ هدف اصلی طرح ..... **Error! Bookmark not defined.**

۱-۳ اهداف فرعی طرح ..... **Error! Bookmark not defined.**

۱-۴ اهداف کاربردی طرح ..... **Error! Bookmark not defined.**

۱-۵ فرضیات یا سؤالات پژوهش ..... **Error! Bookmark not defined.**

فصل دوم: بررسی متون

۲-۱ سرطان..... **Error! Bookmark not defined.**

۲-۱-۱ اساس ژنتیکی سرطان..... **Error! Bookmark not defined.**

۲-۱-۱-۱ نقش اونکوژن ها در ایجاد سرطان ..... **Error! Bookmark not defined.**

۲-۱-۱-۲ نقش ژن‌های سرکوبگر تومور در ایجاد سرطان..... **Error! Bookmark not defined.**

۲-۲ لوسمی میلوئیدی مزمن ..... **Error! Bookmark not defined.**

۲-۲-۱ نقش کروموزوم فیلادلفیا در ایجاد لوسمی میلوئیدی مزمن ..... **Error! Bookmark not defined.**

۲-۲-۲ رده‌ی سلولی سرطانی K562 ..... **Error! Bookmark not defined.**

۲-۲-۲-۱ مورفولوژی سلول‌های K562..... **Error! Bookmark not defined.**

۲-۳ درمان‌های رایج لوسمی میلوئیدی مزمن ..... **Error! Bookmark not defined.**

۲-۳-۱ درمان لوسمی با روش پیوند سلول بنیادی آلوژنیک ..... **Error! Bookmark not defined.**

۲-۳-۲ درمان لوسمی با بهره گیری از مهار کننده‌های تیروزین کینازی .. **Error! Bookmark not defined.**

۲-۳-۳ نقش شیمی درمانی در درمان لوسمی میلوئیدی مزمن ..... **Error! Bookmark not defined.**

۲-۴ محدودیت‌ها و عوارض جانبی شیوه‌های درمانی مدرن در درمان لوسمی **Error! Bookmark not defined.**

۲-۵ نقش طب سنتی در درمان و طراحی داروهای ضد سرطان..... **Error! Bookmark not defined.**

۲-۶ فعالیت ضدتکثیری ترکیبات گیاهی..... **Error! Bookmark not defined.**

۲-۶-۱ میانکنش متابولیت های گیاهی با DNA، کروماتین و پروتئین‌های هیستونی . Error! Bookmark not defined.

۲-۶-۱-۱ تنظیم در سطح ساختار DNA ..... Error! Bookmark not defined.

۲-۶-۱-۲ میانکنش متابولیت های گیاهی با کروماتین و هیستون ها .. Error! Bookmark not defined.

۲-۶-۲ اتصال متابولیت های گیاهی به ساختارهای تلومری و اثر مهار کنندگی آنزیم تلومراز ..... Error! Bookmark not defined.

۲-۶-۳ نقش متابولیت های گیاهی در مهار مسیرهای انتقال پیام داخل سلولی .. Error! Bookmark not defined.

۲-۶-۴ اثر متابولیت های گیاهی بر پیشرفت چرخه‌ی سلولی ..... Error! Bookmark not defined.

۲-۶-۵ ویژگی‌های آنتی اکسیدانی متابولیت های گیاهی ..... Error! Bookmark not defined.

۲-۷ تأثیر متابولیت های گیاهی بر القای آپاپتوز ..... Error! Bookmark not defined.

۲-۷-۱ تعریف آپاپتوز ..... Error! Bookmark not defined.

۲-۷-۲ کاسپازها به عنوان مولکول‌های اجرایی آپاپتوز ..... Error! Bookmark not defined.

۲-۷-۳ انواع کاسپازها..... Error! Bookmark not defined.

۲-۷-۳-۱ کاسپازهای آغازگر آپاپتوز ..... Error! Bookmark not defined.

۲-۷-۳-۲ کاسپازهای اجرایی آپاپتوز..... Error! Bookmark not defined.

۲-۷-۴ مسیرهای اصلی فعال سازی پرو-کاسپازها ..... Error! Bookmark not defined.

۲-۷-۴-۱ مسیر فعال سازی پرو-کاسپاز ها با واسطه‌ی رسپتورهای مرگ (آپاپتوز خارجی) ..... Error! Bookmark not defined.

۲-۷-۴-۲ مسیر فعال سازی پرو-کاسپازها با واسطه‌ی میتوکندری (آپاپتوز داخلی). Error! Bookmark not defined.

۲-۸ خانواده‌ی پروتئینی Bcl-2 ..... Error! Bookmark not defined.

۲-۸-۱ زیرخانواده ی چند دومین آنتی آپاپتوزی ..... Error! Bookmark not defined.

۲-۸-۲ زیرخانواده ی چند دومین پرو-آپاپتوزی ..... Error! Bookmark not defined.

۲-۹ گونه‌ی گیاهی داتوره ..... Error! Bookmark not defined.

۲-۹-۱ ویژگی‌های گیاه شناسی داتوره اینوکسیا ..... Error! Bookmark not defined.

۲-۹-۲ متابولیت های ثانویه‌ی داتوره اینوکسیا و اهداف درمانی آن ها... Error! Bookmark not defined.

۲-۹-۳ سمیت داتوره و تروپان آلکالوئیدها ..... Error! Bookmark not defined.

۲-۹-۴ خواص آنتی اکسیدانی و فلاوونوئیدها ..... Error! Bookmark not defined.

۲-۹-۵ مهار آنژیوژنز و ویتانولیدها ..... Error! Bookmark not defined.

۲-۹-۶ سایر مصارف طبی ترکیبات داتوره اینوکسیا ..... Error! Bookmark not defined.

فصل سوم: مواد و روش ها

۳-۱ مواد و تجهیزات مورد استفاده ..... Error! Bookmark not defined.

۳-۱-۱ وسایل و مواد مصرفی ..... Error! Bookmark not defined.

۳-۱-۲ تجهیزات مورد استفاده ..... Error! Bookmark not defined.

۳-۲ محیط مطالعه ..... Error! Bookmark not defined.

۳-۳ نوع مطالعه..... Error! Bookmark not defined.

۳-۴ جامعه مورد مطالعه..... Error! Bookmark not defined.

۳-۵ روش اجرای مطالعه ..... Error! Bookmark not defined.

۳-۵-۱ تهیه عصاره‌ی آبی برگ‌های داتوره ..... Error! Bookmark not defined.

۳-۵-۲ تهیه غلظت‌های مورد نیاز برای انجام تست‌ها ..... Error! Bookmark not defined.

۳-۵-۳ روش کشت و شمارش رده سلولی K562..... Error! Bookmark not defined.

۳-۵-۳-۱ پاساژ سلول‌ها ..... Error! Bookmark not defined.

۳-۵-۳-۲ فریز سلول‌ها ..... Error! Bookmark not defined.

۳-۵-۳-۳ ذوب سلول‌ها..... Error! Bookmark not defined.

۳-۵-۴ تعیین درصد سلول‌های زنده در سوسپانسیون سلولی (Viability test)... Error! Bookmark not defined.

۳-۶ آزمون کمی سنجش متابولیکی تکثیر سلولی و قابلیت زیست پذیری سلول (MTT Assay)..... Error! Bookmark not defined.

۳-۷ سنجش آپاپتوز با بهره گیری از روش فلوسایتومتری ..... Error! Bookmark not defined.
۳-۸ بررسی بیان ژن در سطح mRNA به روش Real-Time PCR..... Error! Bookmark not defined.
۳-۸-۱ تیمار سلول‌های K562 با عصاره‌ی داتوره ..... Error! Bookmark not defined.
۳-۸-۲ استخراج RNA تام با استفاده از معرف ترایزول ..... Error! Bookmark not defined.
۳-۸-۲-۱ بررسی کیفیت RNA استخراج شده ..... Error! Bookmark not defined.
۳-۸-۲-۲ ارزیابی کمی RNA تام استخراج شده ..... Error! Bookmark not defined.
۳-۸-۲-۳ تیمار با آنزیم DNase I..... Error! Bookmark not defined.
۳-۸-۳ سنتز cDNA و واکنش رونویسی معکوس..... Error! Bookmark not defined.
۳-۸-۳-۱ مراحل طراحی، تهیه و آماده سازی پرایمرها ..... Error! Bookmark not defined.
۳-۸-۴ Real-Time PCR..... Error! Bookmark not defined.
۳-۸-۴-۱ روش انجام کار ..... Error! Bookmark not defined.
۳-۸-۵ نمودار ذوب..... Error! Bookmark not defined.
۳-۹ آنالیز آماری ..... Error! Bookmark not defined.
۳-۱۰ مشکلات و محدودیت‌ها..... Error! Bookmark not defined.

فصل چهارم: یافته‌ها و نتایج

۴-۱ نتایج مربوط به تست MTT..... Error! Bookmark not defined.
۴-۱-۱ نتایج مربوط به اثر مقادیر مختلف عصاره آبی داتوره اینوکسیا در زمان‌های ۴۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت بر زیست پذیری رده سلولی K562 ..... Error! Bookmark not defined.
۴-۲ بررسی غلظت مؤثر (IC50) عصاره آبی داتوره اینوکسیا بر روی سلول‌های K562 Error! Bookmark not defined.
۴-۳ نتایج مربوط به بررسی القای آپاپتوز و نکروز در رده سلولی K562 توسط تکنیک فلوسایتومتری .. Error! Bookmark not defined.
۴-۴ الکتروفورز RNA استخراج شده ..... Error! Bookmark not defined.
۴-۵ نمودار تکثیر ..... Error! Bookmark not defined.
۴-۶ نمودار ذوب ..... Error! Bookmark not defined.

۴-۷ بیان نسبی ژن‌های Bax، Bcl2، Caspase3، Caspase9 ..... Error! Bookmark not defined.

۴-۷-۱ بیان نسبی ژن Bax در سلول‌های K562 پس از تیمار ۲۴ ساعته با داتوره اینوکسیا ..... Error! Bookmark not defined.

۴-۷-۲ بیان نسبی ژن Bax در سلول‌های K562 پس از تیمار ۴۸ ساعته با داتوره اینوکسیا ..... Error! Bookmark not defined.

۴-۷-۳ بیان نسبی ژن Bax در سلول‌های K562 پس از تیمار ۷۲ ساعته با داتوره اینوکسیا ..... Error! Bookmark not defined.

۴-۷-۴ مقایسه بیان نسبی ژن Bax در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف داتوره در ۳ زمان مورد مطالعه ..... Error! Bookmark not defined.

۴-۷-۵ بیان نسبی ژن Bcl2 در سلول‌های K562 پس از تیمار ۲۴ ساعته با داتوره اینوکسیا ..... Error! Bookmark not defined.

۴-۷-۶ بیان نسبی ژن Bcl2 در سلول‌های K562 پس از تیمار ۴۸ ساعته با داتوره اینوکسیا ..... Error! Bookmark not defined.

۴-۷-۷ بیان نسبی ژن Bcl2 در سلول‌های K562 پس از تیمار ۷۲ ساعته با داتوره اینوکسیا ..... Error! Bookmark not defined.

۴-۷-۸ مقایسه بیان نسبی ژن Bcl2 در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف داتوره در ۳ زمان مورد مطالعه ..... Error! Bookmark not defined.

۴-۷-۹ بیان نسبی ژن Caspase 3 در سلول‌های K562 پس از تیمار ۲۴ ساعته با داتوره اینوکسیا ..... Error! Bookmark not defined.

۴-۷-۱۰ بیان نسبی ژن Caspase 3 در سلول‌های K562 پس از تیمار ۴۸ ساعته با داتوره اینوکسیا ..... Error! Bookmark not defined.

۴-۷-۱۱ بیان نسبی ژن Caspase 3 در سلول‌های K562 پس از تیمار ۷۲ ساعته با داتوره اینوکسیا ..... Error! Bookmark not defined.

۴-۷-۱۲ مقایسه بیان نسبی ژن Caspase 3 در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف داتوره در سه زمان مطالعه ..... Error! Bookmark not defined.

۴-۷-۱۳ بیان نسبی ژن Caspase 9 در سلول‌های K562 پس از تیمار ۲۴ ساعته با داتوره اینوکسیا
Error! Bookmark not defined.....

۴-۷-۱۴ بیان نسبی ژن Caspase 9 در سلول‌های K562 پس از تیمار ۴۸ ساعته با داتوره اینوکسیا
Error! Bookmark not defined.....

۴-۷-۱۵ بیان نسبی ژن Caspase 9 در سلول‌های K562 پس از تیمار ۷۲ ساعته با داتوره اینوکسیا Error! Bookmark not defined.

۴-۷-۱۶ مقایسه بیان نسبی ژن Caspase 9 در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف داتوره در سه زمان مورد مطالعه .....Error! Bookmark not defined.

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

۵-۱ بحث ۸۶

۵-۲ نتیجه گیری .....Error! Bookmark not defined.

۵-۳ پیشنهادات .....Error! Bookmark not defined.

منابع.....Error! Bookmark not defined.

پیوست‌ها .....Error! Bookmark not defined.

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۳: مواد مورد استفاده برای انجام آزمایش‌ها..... **Error! Bookmark not defined.**

جدول ۲-۳ : دستگاه‌های مورد استفاده در این تحقیق..... **Error! Bookmark not defined.**

جدول ۳-۳: اجزای واکنش Reverse Transcription ..... **Error! Bookmark not defined.**

جدول ۴-۳: توالی پرایمر ها جهت تکثیر ژن های Bax، Bcl-2، Caspase3، Caspase 9 و ژن β-actin به عنوان ژن کنترل داخلی..... **Error! Bookmark not defined.**

جدول ۵-۳ : اجزای واکنش Real-time PCR ..... **Error! Bookmark not defined.**

جدول ۶-۳ : برنامه دمایی واکنش Real-Time PCR ..... **Error! Bookmark not defined.**

جدول ۱-۴: غلظت مؤثر (IC50) داتوره اینوکسیا در زمان‌های ۴۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت **Error! Bookmark not defined.**

فهرست تصاویر

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۲: ساختار کروموزوم فیلادلفیا ..... **Error! Bookmark not defined.**

شکل ۲-۲: سلول‌های K562..... **Error! Bookmark not defined.**

شکل ۳-۲ : تصویر مسیر خارجی آپاپتوز [۹۶]. ..... **Error! Bookmark not defined.**

شکل ۴-۲: تصویر مسیر میتوکندریایی آپاپتوز[۹۶]. ..... **Error! Bookmark not defined.**

شکل ۵-۲: نمایی از میوه و گل داتوره اینوکسیا ..... **Error! Bookmark not defined.**

شکل ۱-۳: فازهای تکثیر واکنش Real Time PCR ..... **Error! Bookmark not defined.**

شکل ۱-٤: نتایج حاصل از آنالیز فلوسایتومتری برای روش Annexin-V و PI **Error! Bookmark not defined.**

شکل ۲-۴: ژل آگارز پس از الکتروفورز RNA استخراج شده از نمونه‌ها و رویت باندهای ۱۸s rRNA و ۲۸s rRNA..... **Error! Bookmark not defined.**

شکل ۳-۴: نمودار مربوط به تکثیر ژن‌های Bax و β-actin..... **Error! Bookmark not defined.**

شکل ۴-۴: نمودار مربوط به تکثیر ژن‌های Bcl2 و β-actin..... **Error! Bookmark not defined.**

شکل ۵-۴: نمودار مربوط به تکثیر ژن‌های Caspase3 و β-actin..... **Error! Bookmark not defined.**

شکل ۶-۴: نمودار مربوط به تکثیر ژن‌های Caspase9 و β-actin..... **Error! Bookmark not defined.**

شکل ۷-۴: تصویر نمودار ذوب محصول واکنش Real-Time PCR ژن Bax. **Error! Bookmark not defined.**

شکل ۸-۴: تصویر نمودار ذوب محصول واکنش Real-Time PCR ژن Bcl2. **Error! Bookmark not defined.**

شکل ۹-۴: تصویر نمودار ذوب محصول واکنش Real-Time PCR ژن Caspase3. **Error! Bookmark not defined.**

شکل ۱۰-۴: تصویر نمودار ذوب محصول واکنش Real-Time PCR ژن Caspase9. **Error! Bookmark not defined.**

شکل ۱۱-۴: تصویر نمودار ذوب محصول واکنش Real-Time PCR ژن β-actin. **Error! Bookmark not defined.**

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار ۱-۴: اثر عصاره آبی داتوره اینوکسیا بر زیست پذیری سلول‌های K562. **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۲-۴: میزان بیان نسبی ژن پروآپاپتوزی Bax پس از تیمار ۲۴ ساعته با غلظت‌های عصاره داتوره اینوکسیا (۱-۰mg/ml) و DOX. دوکسوروبیسین: DOX، P: *، ۰/۰۱ > P: ∞، ۰/۰۰۱ > P: ◊، داده‌ها به صورت Mean±SD گزارش شده‌اند. **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۳-۴: میزان بیان نسبی ژن پروآپاپتوزی Bax پس از تیمار ۴۸ ساعته با غلظت‌های عصاره داتوره اینوکسیا (۱-۰mg/ml) و DOX. دوکسوروبیسین: DOX، P: *، ۰/۰۱ > P: ∞، ۰/۰۰۱ > P: ◊، داده‌ها به صورت Mean±SD گزارش شده‌اند. **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۴-۴: میزان بیان نسبی ژن پروآپاپتوزی Bax پس از تیمار ۷۲ ساعته با غلظت‌های عصاره داتوره اینوکسیا (۱-۰mg/ml) و DOX. دوکسوروبیسین: DOX، P: *، ۰/۰۱ > P: ∞، ۰/۰۰۱ > P: ◊، داده‌ها به صورت Mean±SD گزارش شده‌اند. **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۵-۴: میزان بیان نسبی ژن Bax در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف داتوره در سه زمان مورد مطالعه (P: *، ۰/۰۱ > P: ∞، ۰/۰۰۱ > P: ◊). **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۶-۴: میزان بیان نسبی ژن ضدآپاپتوزی Bcl2 پس از تیمار ۲۴ ساعته با غلظت‌های مختلف عصاره داتوره اینوکسیا (۱-۰mg/ml) و DOX. دوکسوروبیسین: DOX، P: *، ۰/۰۱ > P: ∞، ۰/۰۰۱ > P: ◊، داده‌ها به صورت Mean±SD گزارش شده‌اند. **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۷-۴: میزان بیان نسبی ژن ضدآپاپتوزی Bcl2 پس از تیمار ۴۸ ساعته با غلظت‌های مختلف عصاره داتوره اینوکسیا (۱-۰mg/ml) و DOX. دوکسوروبیسین: DOX، P: *، ۰/۰۱ > P: ∞، ۰/۰۰۱ > P: ◊، داده‌ها به صورت Mean±SD گزارش شده‌اند. **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۸-۴: میزان بیان نسبی ژن ضدآپاپتوزی Bcl2 پس از تیمار ۷۲ ساعته با غلظت‌های مختلف عصاره داتوره اینوکسیا (۱-۰mg/ml) و DOX. دوکسوروبیسین: DOX، P: *، ۰/۰۱ > P: ∞، ۰/۰۰۱ > P: ◊، داده‌ها به صورت Mean±SD گزارش شده‌اند. **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۹-۴: میزان بیان نسبی ژن Bcl2 در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف داتوره در سه زمان مورد مطالعه. **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۱۰-۴: میزان بیان نسبی ژن Caspase 3 پس از تیمار ۲۴ ساعته با غلظت‌های مختلف عصاره داتوره اینوکسیا (۱-۰mg/ml) و DOX. دوکسوروبیسین: DOX، P: <۰/۰۵ *، P: <۰/۰۱ ∞، P: <۰/۰۰۱ ◊، داده‌ها به صورت Mean±SD گزارش شده‌اند..... **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۱۱-۴: میزان بیان نسبی ژن Caspase 3 پس از تیمار ۴۸ ساعته با غلظت‌های مختلف عصاره داتوره اینوکسیا (۱-۰mg/ml) و DOX. دوکسوروبیسین: DOX، P: <۰/۰۵ *، P: <۰/۰۱ ∞، P: <۰/۰۰۱ ◊، داده‌ها به صورت Mean±SD گزارش شده‌اند..... **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۱۲-۴: میزان بیان نسبی ژن Caspase 3 پس از تیمار ۷۲ ساعته با غلظت‌های عصاره داتوره اینوکسیا (۱-۰mg/ml) و DOX. دوکسوروبیسین: DOX، P: <۰/۰۵ *، P: <۰/۰۱ ∞، P: <۰/۰۰۱ ◊، داده‌ها به صورت Mean±SD گزارش شده‌اند..... **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۱۳-۴: میزان بیان نسبی ژن Caspase 3 در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف داتوره در سه زمان مورد مطالعه (P: <۰/۰۵ *، P: <۰/۰۱ ∞، P: <۰/۰۰۱ ◊). ..... **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۱۴-۴: میزان بیان نسبی ژن Caspase 9 پس از تیمار ۲۴ ساعته با غلظت‌های مختلف عصاره داتوره اینوکسیا (۱-۰mg/ml) و DOX. دوکسوروبیسین: DOX، P: <۰/۰۵ *، P: <۰/۰۱ ∞، P: <۰/۰۰۱ ◊، داده‌ها به صورت Mean±SD گزارش شده‌اند..... **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۱۵-۴: میزان بیان نسبی ژن Caspase 9 پس از تیمار ۴۸ ساعته با غلظت‌های مختلف عصاره داتوره اینوکسیا (۱-۰mg/ml) و DOX. دوکسوروبیسین: DOX، P: <۰/۰۵ *، P: <۰/۰۱ ∞، P: <۰/۰۰۱ ◊، داده‌ها به صورت Mean±SD گزارش شده‌اند..... **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۱۶-۴: میزان بیان نسبی ژن Caspase 9 پس از تیمار ۷۲ ساعته با غلظت‌های مختلف عصاره داتوره اینوکسیا (۱-۰mg/ml) و DOX. دوکسوروبیسین: DOX، P: <۰/۰۵ *، P: <۰/۰۱ ∞، P: <۰/۰۰۱ ◊، داده‌ها به صورت Mean±SD گزارش شده‌اند..... **Error! Bookmark not defined.**

نمودار ۱۷-۴: میزان بیان نسبی ژن Caspase 9 در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف داتوره در سه زمان مورد مطالعه (P: <۰/۰۵ *، P: <۰/۰۱ ∞، P: <۰/۰۰۱ ◊). ..... **Error! Bookmark not defined.**

فهرست ضمائم و پیوست ها

عنوان **صفحه**

پیوست شماره یک: برگه اطلاعات ایمنی (MSDS) ترایزول ..... **Error! Bookmark not defined.**

پیوست شماره دو: برگه اطلاعات ایمنی (MSDS) آگارز ..... **Error! Bookmark not defined.**

پیوست شماره سه: برگه اطلاعات ایمنی (MSDS) کلروفرم..... **Error! Bookmark not defined.**

پیوست شماره چهار: برگه اطلاعات ایمنی (MSDS) اتیدیوم بروماید ..... **Error! Bookmark not defined.**

پیوست شماره پنج: برگه اطلاعات مقاله ۱۱۶

فهرست کوتاه نوشته‌ها

Abbreviations	
ABL	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
ABTS	2,2′ -azino-bis-(3-ethylbenzo thiazoline-6-sulfonate)
Apaf-1	Apoptotic Protease activation factor-1
BCR	Breakpoint cluster region
CARD	Caspase recruitment domain
Caspase	Cystein-Aspartete Proteases
Cdk	Cyclin dependent kinase
CDKI	Cyclin dependent kinase inhibitors
CML	Chronic Myelogenous Leukemia
DED	Death effector domain
D. innoxia	Datura innoxia
DISC	Death-inducing signaling complex
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPPH	2,2 -diphenyl-hydrazyl
FBS	Fetal Bovine Serum
HCT15	Human Colon adenocarcinoma
MTT	3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide

NF-kB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
Ph	Philadelphia chromosome
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-alpha
TRAIL	TNF-related apoptosis including ligand

چکیده

مقدمه و اهداف: لوسمی میلوئیدی مزمن شایع‌ترین نوع سرطان پیشرفته سلول‌های بنیادی خون ساز از رده‌ی گرانولوسیتی است. رده‌ی سلولی K562 یک رده‌ی اریتروئیدی از سلول‌های خونی است که به علت داشتن کروموزوم فیلادلفیا و کسب مقاوت ذاتی نسبت به آپاپتوز، به عنوان شاخصی برای بیماری CML محسوب می‌شود. داتوره اینوکسیا گیاهی متعلق به خانواده سولانسه بوده که به واسطه داشتن ترکیبات پلی فنولی و آلکالوئیدی دارای خاصیت ضد سرطانی است. با توجه به اینکه یکی از مهمترین مکانیسم‌های تقابل ترکیبات گیاهی با سلول‌های سرطانی، القای آپاپتوز توسط این ترکیبات می‌باشد، هدف از این مطالعه بررسی مکانیسم مولکولی آپاپتوز القا شده توسط عصاره آبی برگ‌های داتوره، از طریق تأثیر بر میزان بیان ژن‌های آپاتوزی Bax، Bcl2، Caspase 3 و Caspase 9 در سلول‌های K562 بود.

روش اجرا: از برگ‌های داتوره اینوکسیا با روش فریز درایر پودر تهیه شد و پس از حل کردن در آب مقطر به نسبت ۱ به ۱۰، عصاره آبی تهیه گردید. اثرات عصاره آبی داتوره اینوکسیا بر سلول‌های K562 پس از مواجهه این سلولها با غلظت‌های مختلف عصاره و برای مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. اثرات ضدتکثیری عصاره داتوره بر میزان زنده ماندن سلول‌ها به روش MTT ارزیابی شد. سپس میزان آپاپتوز القا شده توسط تکنیک فلوسایتومتری و درمرحله آخر میزان بیان نسبی ژن‌های آپاپتوزی با Real-Time PCR بررسی گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که غلظت‌های (۱ mg/ml، ۰/۸، ۰/۶، ۰/۴، ۰/۲) عصاره آبی داتوره، تکثیر سلول‌های K562 را در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مهار کرد و میزان زنده ماندن آن‌ها را در یک رفتار وابسته به غلظت و زمان، به طور معناداری (P< ۰/۰۰۱) کاهش داد. عصاره آبی داتوره پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون، نیمی از سلول‌ها را از بین برد (IC50 = ۰/۶ mg/ml). پس از تیمار ۲۴ ساعته با عصاره داتوره، بیان Bax تغییر چندانی نیافت. در حالی که در این زمان، بیان Bcl2 در تمامی غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل کاهش یافت (P<۰/۰۰۱). افزایش بیان Caspase 3 در غلظت ۰/۶ mg/ml داتوره از نظر آماری معنی دار نبود و غلظت ۱mg/ml داتوره، بیان Caspase 9 را نسبت به گروه کنترل ۱۰ برابر افزایش داد (P<۰/۰۰۱). تیمار ۴۸ ساعته با داتوره، منجر به افزایش بیان دو برابری Bax در غلظت ۰/۶ mg/ml نسبت به گروه کنترل گردید (P<۰/۰۱).

بیان ژن Bcl2 در تمامی غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل کاهش یافت (P<۰/۰۰۱). بیان ژن Caspase 3 و Caspase 9 در غلظت ۱mg/ml داتوره، پس از ۴۸ ساعت از نظر آماری افزایش چشم گیری را نشان داد (P<۰/۰۰۱). پس از تیمار ۷۲ ساعته، بیان ژن‌های Bax و Bcl2 در تمامی غلظت‌های داتوره نسبت به گروه کنترل به ترتیب افزایش و کاهش یافت. غلظت ۱mg/ml داتوره، بیان Caspase 3 و Caspase 9 را در این زمان به ترتیب ۴/۶ و ۸ برابر کرد (P<۰/۰۰۱).

نتیجه گیری: این امکان وجود دارد که عصاره آبی استخراج شده از برگ‌های گیاه داتوره اینوکسیا بتواند از طریق القای بیان ژن‌های آپاپتوزی در سلول‌های K562 و هدایت این سلول‌ها به سمت مرگ برنامه ریزی شده، در از بین بردن سلول‌های سرطانی نقشی مفید ایفا کند.

کلمات کلیدی: داتوره اینوکسیا، آپاپتوز، سلول‌های K562.

Abstract

Background and Objectives: Chronic myeloid leukemia is a malignant proliferation of hematological stem cells granulocytic lineage.k562 cell line is an erythroid lineage of blood cells that is known as an indicant for CML.due to possess of Philadelphia chromosome, this cells obtain inherent resistance of apoptosis.Datura innoxia is one of the species of solanaceae family which due to comprises phenolic and alkaloid compounds has anticancer properties.apoptosis is the most important mechanism of herbal derivatives for eradicate malignant cells.this study purpose was to clarify the molecular mechanism of induced apoptosis of D.innoxia in K562 cells through Bax, Bcl-2, caspase3, caspase9 gene expression.

Methods: Datura innoxia leaves turned into dried powder with freeze dryer.the solution of dried powdered leave was prepared 10% w/v in water.The effects of D.innoxia leaves aqueous extract were evaluated by the proliferation of K562 cells assessing in the presence of various extract concentrations (0, 0.4, 0.6, 1mg/ml) for 24, 48, 72 hour incubation periods.cell viability was measured with MTT assay.finally, induced apoptosis rate and relative gene expression were evaluated with flowcytometry and Real-time PCR, respectively.

Results: Various concentration of aqueous extract of D.innoxia leaves decreased cell viability of K562 cells in a dose and time-dependent manner.the IC50 of D.innoxia leaves aqueous extract was determined 0.6mg/ml for 72h incubation time.results indicated the down-regulation of Bcl2 following treatment with D.innoxia in comparison with control.Bax was significantly overexpressed upon increasing of the extract concentration and incubation time.along with increasing D.innoxia up to 1mg/ml after 72h treatment, the caspase 3 mRNA expression was also significantly increased by 4.6 fold compared to the control. Caspase 9 expression increased in 0.6

mg/ml of D.innoxia in comparison with the control up in order to reach 3.78 fold after 72h incubation.caspase 9 expression significantly upregulated (8.046 fold compared to control) by passing 72h from treatment with 1 mg/ml of D.innoxia.

Conclusion: It is possible that aqueous extract of D.innoxia leaves can induce expression of apoptotic genes in K562 cells and lead to eradicate malignant cells.

Key Words: Datura innoxia, Apoptosis, K562 cells.

1. Hoshyar, R., Z. Mahboob, and A. Zarban, The antioxidant and chemical properties of Berberis vulgaris and its cytotoxic effect on human breast carcinoma cells. Cytotechnology, 2016. 68(4): p. 1207-1213.

2. Bai, H., et al., p16 hypermethylation during gastric carcinogenesis of Wistar rats by N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2003. 535(1): p. 73-78.

3. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer. cell, 2000. 100(1): p. 57-70.

4. Orazi, A. and U. Germing, The myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms: myeloproliferative diseases with dysplastic features. Leukemia, 2008. 22(7): p. 1308.

5. McGahon, A., et al., BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death [published erratum appears in Blood 1994 Jun 15; 83 (12): 3835]. Blood, 1994. 83(5): p. 1179-1187.

6. Deininger, M.W., J.M. Goldman, and J.V. Melo, The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood, 2000. 96(10): p. 3343-3356.

7. Klein, E., et al., Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. International journal of cancer, 1976. 18(4): p. 421-431.

8. Goldman, J.M. and J.V. Melo, Chronic myeloid leukemia—advances in biology and new approaches to treatment. New England Journal of Medicine, 2003. 349(15): p. 1451-1464.

9. Savage, D.G. and K.H. Antman, Imatinib mesylate—a new oral targeted therapy. New England Journal of Medicine, 2002. 346(9): p. 683-693.

10. Kviecinski, M.R., et al., Study of the antitumor potential of Bidens pilosa (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. Journal of ethnopharmacology, 2008. 117(1): p. 69-75.

11. Wink, M., Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. Medicines, 2015. 2(3): p. 251-286.

12. Hellebrekers, D.M., A.W. Griffioen, and M. van Engeland, Dual targeting of epigenetic therapy in cancer. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 2007. 1775(1): p. 76-91.

13. Ganesan, K. and B. Xu, Telomerase Inhibitors from Natural Products and Their Anticancer Potential. International journal of molecular sciences, 2017. 19(1): p. 13.

14. GULATI, N., et al., The antiproliferative effect of Quercetin in cancer cells is mediated via inhibition of the PI3K-Akt/PKB pathway. Anticancer research, 2006. 26(2A): p. 1177-1181.

15. Sharma, P., et al., Study of antioxidant activity of Datura stramonium Linn. Res J Phytochem, 2014. 8(3): p. 112-8.

16. Bathaie, S.Z., et al., Anticancer effects of crocetin in both human adenocarcinoma gastric cancer cells and rat model of gastric cancer. Biochemistry and Cell Biology, 2013. 91(6): p. 397-403.

17. Thompson, C.B., Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science, 1995. 267(5203): p. 1456-1462.

18. Wu, Y., et al., Caspase-8 and Caspase-9 Functioned Differently at Different Stages of the Cyclic Stretch-Induced Apoptosis in Human Periodontal Ligament Cells. PloS one, 2016. 11(12): p. e0168268.

19. Yoshimori, A., et al., Structural and functional definition of the specificity of a novel caspase-3 inhibitor, Ac-DNLD-CHO. BMC pharmacology, 2007. 7(1): p. 8.

20. Devarajan, E., et al., Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. Oncogene, 2002. 21(57): p. 8843-8851.

21. Prenek, L., et al., The regulation of the mitochondrial apoptotic pathway by glucocorticoid receptor in collaboration with Bcl-2 family proteins in developing T cells. Apoptosis, 2016: p. 1-15.

22. Shamas-Din, A., et al., BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2011. 1813(4): p. 508-520.

23. Yang, H.-L., et al., Toona sinensis extracts induces apoptosis via reactive oxygen species in human premyelocytic leukemia cells. Food and Chemical Toxicology, 2006. 44(12): p. 1978-1988.

24. Hossain, M.A., et al., Comparative study of total phenolics, flavonoids contents and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of different polarities fruits crude extracts of Datura metel L. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2014. 4(5): p. 378-383.

25. Kumaran, S., et al., ANTI-CANCER ACTIVITY OF DATURA METEL IN MCF-7 CELL LINE. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 2014. 7(1): p. 181-183.

26. Monira, K.M. and S.M. Munan, Review on Datura metel: A potential medicinal plant. Global Journal of Research on Medicinal Plants & Indigenous Medicine, 2012. 1(4): p. 123.

27. Sharma, P., et al., Study of Antioxidant Activity of Datura stramonium Linn. Research Journal of Phytochemistry, 2014. 8(3): p. 112-118.

28. Fatima, S., et al., Comparative antioxidant potential and total polyphenolic contents of different parts of Datura stramonium. Pakistan Journal of Agricultural Sciences, 2014. 51(3): p. 719-724.

29. Azmir, J., et al., Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. Journal of Food Engineering, 2013. 117(4): p. 426-436.

30. Jakabová, S., et al., Determination of tropane alkaloids atropine and scopolamine by liquid chromatography-mass spectrometry in plant organs of Datura species. Journal of Chromatography A, 2012. 1232: p. 295-301.

31. Ma, L., et al., Important poisonous plants in Tibetan ethnomedicine. Toxins, 2015. 7(1): p. 138-155.

32. Bhardwaj, K., S. Kumar, and S. Ojha, Antioxidant activity and FT-IR analysis of Datura innoxia and Datura metel leaf and seed methanolic extracts. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 2016. 13(5): p. 7-16.

33. Gajendran, B., et al., Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles from Datura inoxia and its apoptotic effect on human breast cancer cell line MCF7. Materials Letters, 2014. 122: p. 98-102.

34. Arulvasu, C., et al., Anti-cancer effect of Datura innoxia P. Mill. Leaf extract in vitro through induction of apoptosis in human Colon Adenocarcinoma and larynx cancer cell lines. J Pharm Res, 2010. 3(7): p. 1485-1488.

35. Chamani, E., et al., In vitro cytotoxicity of polyphenols from Datura innoxia aqueous leaf-extract on human leukemia K562 cells: DNA and nuclear proteins as targets. Drug and chemical toxicology, 2019: p. 1-11.

36. Mignogna, M., S. Fedele, and L.L. Russo, The World Cancer Report and the burden of oral cancer. European journal of cancer prevention, 2004. 13(2): p. 139-142.

37. Weinberg, R.A., The retinoblastoma protein and cell cycle control. Cell, 1995. 81(3): p. 323-330.

38. Tavakoli, J., et al., Evaluation of effectiveness of herbal medication in cancer care: a review study. Iranian journal of cancer prevention, 2012. 5(3): p. 144.

39. Vermeulen, K., D.R. Van Bockstaele, and Z.N. Berneman, The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. Cell proliferation, 2003. 36(3): p. 131-149.

40. Rohrbacher, M. and J. Hasford, Epidemiology of chronic myeloid leukaemia (CML). Best Practice & Research Clinical Haematology, 2009. 22(3): p. 295-302.

41. Singhal, M.K., M. Sengar, and R. Nair, Summary of the published Indian data on chronic myeloid leukemia. South Asian journal of cancer, 2016. 5(3): p. 162.

42. Smith, K.L. and W. Johnson, Classification of chronic myelocytic leukemia in children. Cancer, 1974. 34(3): p. 670-679.

43. Faderl, S., et al., The biology of chronic myeloid leukemia. New England Journal of Medicine, 1999. 341(3): p. 164-172.

44. Andersson, L.C., K. Nilsson, and C.G. Gahmberg, K562—a human erythroleukemic cell line. International journal of cancer, 1979. 23(2): p. 143-147.

45. Consortium, E.P., A user's guide to the encyclopedia of DNA elements (ENCODE). PLoS biology, 2011. 9(4): p. e1001046.

46. Silver, R.T., et al., An Evidence-Based Analysis of the Effect of Busulfan, Hydroxyurea, Interferon, and Allogeneic Bone Marrow Transplantation in Treating the Chronic Phase of Chronic Myeloid Leukemia: Developed for the American Society of Hematology: Presented in part at the Education Session of the American Society of Hematology, December 5, 1998, Miami Beach, FL. Blood, 1999. 94(5): p. 1517-1536.

47. Gratwohl, A., et al., Risk assessment for patients with chronic myeloid leukaemia before allogeneic blood or marrow transplantation. The Lancet, 1998. 352(9134): p. 1087-1092.

48. Hehlmann, R., et al., Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group [see comments]. Blood, 1994. 84(12): p. 4064-4077.

49. Qi, F., et al., Chinese herbal medicines as adjuvant treatment during chemoor radio-therapy for cancer. Bioscience trends, 2010. 4(6).

50. Nazeema, B., et al., Anti-cancer activity of Datura metel on MCF-7 cell line. Asian J. Pharmaceutic. Clinic. Res, 2014. 7(7): p. 181-183.

51. Park, H.-J., R.C. Kelly, and L.H. Hurley, The Chemical Evolution of DNA− DNA Interstrand Cross-Linkers That Recognize Defined Mixed AT and GC Sequences. Journal of the American Chemical Society, 1996. 118(42): p. 10041-10051.

52. Bathaie, S.Z., et al., Interaction of saffron carotenoids as anticancer compounds with ctDNA, Oligo (dG. dC) 15, and Oligo (dA. dT) 15. DNA and cell biology, 2007. 26(8): p. 533-540.

53. Hoshyar, R., S.Z. Bathaie, and M. Ashrafi, Interaction of safranal and picrocrocin with ctDNA and their preferential mechanisms of binding to GC-and AT-rich oligonucleotides. DNA and cell biology, 2008. 27(12): p. 665-673.

54. Majumder, P., et al., Chromatin as a target for the DNA-binding anticancer drugs, in Chromatin and Disease. 2007, Springer. p. 145-192.

55. Nocetti, N. and I. Whitehouse, Nucleosome repositioning underlies dynamic gene expression. Genes & development, 2016. 30(6): p. 660-672.

56. Bathaie, S.Z. and S.Z. Mousavi, New applications and mechanisms of action of saffron and its important ingredients. Critical reviews in food science and nutrition, 2010. 50(8): p. 761-786.

57. Mohammadgholi, A., A. Rabbani-Chadegani, and S. Fallah, Mechanism of the interaction of plant alkaloid vincristine with DNA and chromatin: Spectroscopic study. DNA and cell biology, 2013. 32(5): p. 228-235.

58. Banerjee, A., et al., Recognition of chromatin by the plant alkaloid, ellipticine as a dual binder. Biochemical and biophysical research communications, 2015. 462(4): p. 352-357.

59. Hu, J., Y. Wang, and Y. Chen, Curcumin-induced histone acetylation in malignant hematologic cells. Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences], 2009. 29(1): p. 25-28.

60. Saha, S.K. and A.R. Khuda-Bukhsh, Berberine alters epigenetic modifications, disrupts microtubule network, and modulates HPV-18 E6-E7 oncoproteins by targeting p53 in cervical cancer cell HeLa: A mechanistic study including molecular docking. European journal of pharmacology, 2014. 744: p. 132-146.

61. Chung, S.S., et al., Salinomycin abolished STAT3 and STAT1 interactions and reduced telomerase activity in colorectal cancer cells. Anticancer research, 2017. 37(2): p. 445-453.

62. Yano, Y., et al., Expression and distribution of human telomerase catalytic component, hTERT, in human breast tissues. Anticancer research, 2002. 22(6C): p. 4101-4107.

63. Mukherjee, S., et al., Curcumin-induced apoptosis in human leukemia cell HL-60 is associated with inhibition of telomerase activity. Molecular and cellular biochemistry, 2007. 297(1-2): p. 31.

64. Chakraborty, S., et al., Inhibition of telomerase activity and induction of apoptosis by curcumin in K-562 cells. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2006. 596(1): p. 81-90.

65. Avci, C.B., et al., Quercetin-induced apoptosis involves increased hTERT enzyme activity of leukemic cells. Hematology, 2011. 16(5): p. 303-307.

66. Vara, J.Á.F., et al., PI3K/Akt signalling pathway and cancer. Cancer treatment reviews, 2004. 30(2): p. 193-204.

67.Dolcet, X., et al., NF-kB in development and progression of human cancer. Virchows archiv, 2005. 446(5): p. 475-482.

68. Chan, S., Targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR): a new approach to treating cancer. British journal of cancer, 2004. 91(8): p. 1420.

69. Khan, N., et al., Dual inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mammalian target of rapamycin signaling in human nonsmall cell lung cancer cells by a dietary flavonoid fisetin. International journal of cancer, 2012. 130(7): p. 1695-1705.

70. Van Aller, G.S., et al., Epigallocatechin gallate (EGCG), a major component of green tea, is a dual phosphoinositide-3-kinase/mTOR inhibitor. Biochemical and biophysical research communications, 2011. 406(2): p. 194-199.

71. Lee, Y.-C., et al., Nobiletin, a citrus flavonoid, suppresses invasion and migration involving FAK/PI3K/Akt and small GTPase signals in human gastric adenocarcinoma AGS cells. Molecular and cellular biochemistry, 2011. 347(1-2): p. 103-115.

72.Maduniċ, J., et al., Apigenin: A dietary flavonoid with diverse anticancer properties. Cancer Letters, 2018. 413: p. 11-22.

73.Shukla, S., P. Fu, and S. Gupta, Apigenin induces apoptosis by targeting inhibitor of apoptosis proteins and Ku70-Bax interaction in prostate cancer. Apoptosis, 2014. 19(5): p. 883-894.

74.Huang, X., et al., Green tea extract enhances the selective cytotoxic activity of Zizyphus jujuba extracts in HepG2 cells. The American journal of Chinese medicine, 2008. 36(04): p. 729-744.

75. Fidelus, R.K., The generation of oxygen radicals: a positive signal for lymphocyte activation. Cellular immunology, 1988. 113(1): p. 175-182.

76. Finkel, T. and N.J. Holbrook, Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature, 2000. 408(6809): p. 239.

77.Sharififar, F., et al., In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic Zataria multiflora Boiss. Food control, 2007. 18(7): p. 800-805.

78.Ananth, A. and S. Rajan, In-vitro antioxidant activity of Datura stramonium L. leaves.

79. Leonard, S.S., et al., Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. Biochemical and biophysical research communications, 2003. 309(4): p. 1017-1026.

80. Miles, S.L., M. McFarland, and R.M. Niles, Molecular and physiological actions of quercetin: need for clinical trials to assess its benefits in human disease. Nutrition reviews, 2014. 72(11): p. 720-734.

81.Rivera, L., et al., Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. Obesity, 2008. 16(9): p. 2081-2087.

82. Kiruthiga, P., et al., Silymarin protection against major reactive oxygen species released by environmental toxins: exogenous H2O2 exposure in erythrocytes. Basic & clinical pharmacology & toxicology, 2007. 100(6): p. 414-419.

83. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. British journal of cancer, 1972. 26(4): p. 239.

84.Roy, A., N. Jauhari, and N. Bharadvaja, Medicinal plants as. Anticancer Plants: Natural Products and Biotechnological Implements. 2: p. 109.

85.Thatte, U., S. Bagadey, and S. Dahanukar, Modulation of programmed cell death by medicinal plants. Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France), 2000. 46(1): p. 199-214.

86. Talib, W.H. and A.M. Mahasneh, Antiproliferative activity of plant extracts used against cancer in traditional medicine. Scientia pharmaceutica, 2010. 78(1): p. 33-46.

87. Los, M., S. Wesselborg, and K. Schulze-Osthoff, The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction. Immunity, 1999. 10(6): p. 629-639.

88. Launay, S., et al., Vital functions for lethal caspases. Oncogene, 2005. 24(33): p. 5137.

89.Chang, H.Y. and X. Yang, Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. Microbiology and molecular biology reviews, 2000. 64(4): p. 821-846.

90. Schü tze, S., V. Tchikov, and W. Schneider-Brachert, Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. Nature reviews Molecular cell biology, 2008. 9(8): p. 655.

91. Wajant, H., The Fas signaling pathway: more than a paradigm. Science, 2002. 296(5573): p. 1635-1636.

92. Wang, Z.-B., Y.-Q. Liu, and Y.-F. Cui, Pathways to caspase activation. Cell biology international, 2005. 29(7): p. 489-496.

93. Barnhart, B.C., E.C. Alappat, and M.E. Peter. The CD95 type I/type II model. in Seminars in immunology. 2003. Elsevier.

94. Yin, X.-M., et al., Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. Nature, 1999. 400(6747): p. 886.

95. Luo, X., et al., Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. Cell, 1998. 94(4): p. 481-490.

96. Galluzzi, L., et al., Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. Cell death and differentiation, 2012. 19(1): p. 107.

97.Kroemer, G., L. Galluzzi, and C. Brenner, Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. Physiological reviews, 2007. 87(1): p. 99-163.

98. Fan, T., L. Xia, and Y. Han, Mitochondrion and Apoptosis. Sheng wu hua xue yu sheng wu wu li xue bao Acta biochimica et biophysica Sinica, 2001. 33(1): p. 7-12.

99. Elmore, S., Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicologic pathology, 2007. 35(4): p. 495-516.

100. Scorrano, L. and S.J. Korsmeyer, Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. Biochemical and biophysical research communications, 2003. 304(3): p. 437-444.

101. Tsujimoto, Y., Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. Journal of cellular physiology, 2003. 195(2): p. 158-167.

102. Boise, L., et al., Bcl-2 and Bcl-2-related proteins in apoptosis regulation, in Apoptosis in Immunology. 1995, Springer. p. 107-121.

103. Oltval, Z.N., C.L. Milliman, and S.J. Korsmeyer, Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programed cell death. cell, 1993. 74(4): p. 609-619.

104.Watson, D.R.A., Datura arenicola (Solanaceae): A New Species in the New Section Discola from Baja California Sur, Mexico. Madroño, 2013. 60(3): p. 217-228.

105. Kintz, P., et al., Testing for atropine and scopolamine in hair by LC-MS-MS after Datura inoxia abuse. Journal of analytical toxicology, 2006. 30(7): p. 454-457.

106. Krenzelok, E.P., Aspects of Datura poisoning and treatment. Clinical Toxicology, 2010. 48(2): p. 104-110.

107. Shagal, M., U. Modibbo, and A. Liman, Pharmacological justification for the ethnomedical use of Datura stramonium stem-bark extract in treatment of diseases caused by some pathogenic bacteria. International Research of Pharmacy and Pharmacology, 2012. 2(1): p. 016-019.

108. Wansi, J.D., et al., Alkaloids from the medicinal plants of Africa, in Medicinal Plant Research in Africa. 2013, Elsevier. p. 557-605.

109. Kuete, V., Health Effects of Alkaloids from African Medicinal Plants, in Toxicological Survey of African Medicinal Plants. 2014, Elsevier. p. 611-633.

110. Pretorius, E. and J. Marx, Datura stramonium in asthma treatment and possible effects on prenatal development. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2006. 21(3): p. 331-337.

111. Chang, S.-S., et al., Poisoning by Datura leaves used as edible wild vegetables. Veterinary and human toxicology, 1999. 41(4): p. 242-245.

112. Kopelman, M.D., The cholinergic neurotransmitter system in human memory and dementia: a review. The Quarterly Journal of Experimental Psychology, 1986. 38(4): p. 535-573.

113. Hardy, T. and D. Wakely, The amnesic properties of hyoscine and atropine in pre-anæsthetic medication. Anaesthesia, 1962. 17(3): p. 331-336.

114. Oliver-Bever, B., Medicinal plants in tropical West Africa. 1986: Cambridge university press.

115. Jäger, A.K. and L. Saaby, Flavonoids and the CNS. Molecules, 2011. 16(2): p. 1471-1485.

116. Ahmad, I.M., et al., Datura aqueous leaf extract enhances cytotoxicity via metabolic oxidative stress on different human cancer cells. JJ of Bio. Sci, 2009. 2(1): p. 9-14.

117. Chiu, C.-C., et al., Fern Plant-Derived Protoapigenone Leads to DNA Damage, Apoptosis, and G2/M Arrest in Lung Cancer Cell Line H1299. DNA and cell biology, 2009. 28(10): p. 501-506.

118. Vermillion, K., et al., Dinoxin b, a withanolide from datura inoxia leaves with specific cytotoxic activities. Journal of natural products, 2011. 74(2): p. 267-271.

119. Pan, Y., X. Wang, and X. Hu, Cytotoxic withanolides from the flowers of Datura metel. Journal of natural products, 2007. 70(7): p. 1127-1132.

120. Sasaki, T., et al., Inhibition of proliferation and induction of differentiation of glioma cells with Datura stramonium agglutinin. British journal of cancer, 2002. 87(8): p. 918.

121. Soni, P., et al., Pharmacological properties of Datura stramonium L. as a potential medicinal tree: an overview. Asian Pacific journal of tropical biomedicine, 2012. 2(12): p. 1002-1008.

122. Givan, A.L., Flow cytometry: first principles. 2013: John Wiley & Sons.

123. Wilfinger, W.W., K. Mackey, and P. Chomczynski, Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. Biotechniques, 1997. 22(3): p. 474-481.

124. Bustin, S.A., The PCR revolution: basic technologies and applications. 2010: Cambridge University Press.

125. Fraga, D., T. Meulia, and S. Fenster, Real-time PCR. Current protocols essential laboratory techniques, 2008(1): p. 10.3. 1-10.3. 34.

126. van Pelt-Verkuil, E., A. Van Belkum, and J.P. Hays, Principles and technical aspects of PCR amplification. 2008: Springer Science & Business Media.

127.Lodish H, B.A., Zipursky L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Mol Cell Bio.5 ed.New York: W.H.Freeman Company 2004; P. 1054-1055.

128. Arulvasu, C., et al., Purification and identification of bioactive protein from leaves of Datura inoxia P. mil. Biomedicine & Preventive Nutrition, 2014. 4(2): p. 143-149.

129. Yang, J., J. Fa, and B. Li, Apigenin exerts anticancer effects on human cervical cancer cells via induction of apoptosis and regulation of Raf/MEK/ERK signalling pathway. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2018. 17(8): p. 1615-1619.

130. Shi, M.-D., et al., Apigenin, a dietary flavonoid, inhibits proliferation of human bladder cancer T-24 cells via blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. Cancer cell international, 2015. 15(1): p. 33.

131. Chiang, L.-C., et al., Anti-proliferative effect of apigenin and its apoptotic induction in human Hep G2 cells. Cancer letters, 2006. 237(2): p. 207-214.

132. Lu, H.-F., et al., Apigenin induces caspase-dependent apoptosis in human lung cancer A549 cells through Bax-and Bcl-2-triggered mitochondrial pathway. International journal of oncology, 2010. 36(6): p. 1477-1484.

133. Gupta, S., F. Afaq, and H. Mukhtar, Involvement of nuclear factor-kappa B, Bax and Bcl-2 in induction of cell cycle arrest and apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma cells. Oncogene, 2002. 21(23): p. 3727.

134.Shukla, S. and S. Gupta, Molecular mechanisms for apigenin-induced cell-cycle arrest and apoptosis of hormone refractory human prostate carcinoma DU145 cells. Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center, 2004. 39(2): p. 114-126.

KERMAN UNIVERSITY
OF MEDICAL SCIENCES

Faculty of Medicine

In partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science

Title :

Evaluation of different concentrations of aqueous extract of Datura Innoxia leaves on mrna levels of apoptotic genes (Bax, Bcl2, Caspase 3, Caspase 9) in K562 cell line

By :

Setareh Javanshir Giv

Supervisors :

۱-Dr. Gholamabbass Mohammadi | ۲-Dr. Elham Chamani

Advisor :

Dr. Kazme Dastjerdi

Thesis No : **۵۸۳** **Date (May , 2020)**