

بررسی اثر انار و ترکیبات آن بر سرطان سینه: مقاله مروری

زهرا اسمعیلی نژاد^۱، رضا براتی بلداجی^{۲*}

مقاله مروری

مقدمه: میوه انار منبع غنی از فیتوکمیکالها با اثرات آنتی‌اکسیدانی بسیار بالاست، که دارای اثرات درمانی گسترده در طب سنتی و مدرن است و در پیشگیری و درمان بیماری‌های قلبی عروقی، دیابت، چاقی، بیماری‌های التهابی، بیماری‌های عفونی و میکروبی، اختلالات عصبی و ایمنی موثر است. امروزه نقش انار در مراحل مختلف سرطان نیز اثبات شده است و از آنجایی که سرطان سینه یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها بین خانم‌ها می‌باشد، در این مطالعه به بررسی اثر انار در سرطان سینه می‌پردازیم. مطالب استفاده شده از پایگاه اطلاع داده PubMed به صورت گزینشی با استفاده از کلید واژه‌های "pomegranate" یا "Punica granatum" و "breast cancer" استخراج شده‌اند. مطالعات بررسی شده نشان داده‌اند که ترکیبات موجود در انار می‌توانند از مسیرهای متفاوت بر مراحل مختلف سرطان اثر بگذارند از جمله: مهار آروماتازها و مهار آنزیم‌های سیکلواکسیژناز، اثر بر پروتئین‌های شوک حرارتی، فاکتور رونویسی زیپ پایه لوسین و فاکتورهای رونویسی از پروتئین‌های خاص و چرخه سلولی. همچنین در برخی مطالعات نشان داده شده است که ترکیبات انار می‌توانند از طریق فعالیت ضد استروژنی و استروژنی، تاثیر بر ۲۷- هیدروکسی کلسترول، تغییر در گیرنده‌های استروژن α و β ، مسیر پیام‌رسانی Wnt / β -catenin، چسبندگی و مهاجرت سلول‌های سرطانی، اثر بر سیتوکروم p450، مسیر آپتوز کاسپاز، آپتوز و مسیرهای دیگر بر مراحل مختلف سرطان اثر بگذارند.

واژه‌های کلیدی: نئوپلاسم، پونیکا، متاستاز، آپتوز

ارجاع: اسمعیلی نژاد زهرا، براتی رضا. بررسی اثر انار و ترکیبات آن بر سرطان سینه: مقاله مروری. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۸؛ ۲۷ (۸): ۲۵-۱۸۱۴.

۱- کارشناس، پژوهشی، مرکز تحقیقات تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

۲- کارشناس، پژوهشی، مرکز تحقیقات تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۳۲۸۰۷۸۵، پست الکترونیکی: reza93barati@gmail.com، کد پستی: ۷۱۹۳۶۳۵۸۹۹

سرطان سینه

بر طبق معیارهای WHO شیوع جهانی سرطان در حال رشد، سریع و هشداردهنده می‌باشد (۱). ولی اتیولوژی کامل سرطان هنوز ناشناخته باقی مانده است. سرطان سومین عامل مرگ و میر در ایران است و یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها بین زنان، سرطان سینه می‌باشد (۲، ۳). شیوع سرطان سینه در بین خانم‌ها در ایران ۳۲٪ و در آمریکا ۱۲/۵٪ گزارش شده است (۴). عوامل خطر سرطان سینه عبارتند از: سن، سابقه خانوادگی و اختلالات ژنتیکی، مانند جهش در ژن‌های سرکوب کننده تومور. سایر عوامل خطر مرتبط با هورمون‌ها می‌باشد، از جمله سن ابتلا به منارک، شروع زودرس یائسگی، زایمان زودرس، ناباروری و استفاده از داروهای ضدبارداری خوراکی و هورمونی می‌باشد. علاوه بر این، عوامل مرتبط با سبک زندگی مانند مصرف الکل، چاقی و شرایط بیماری (مانند دیابت) نیز به بروز سرطان کمک می‌کنند (۵). به‌طور کلی قرار گرفتن در معرض میزان بالای استروژن درون‌زا یا خارجی، به‌عنوان مهم‌ترین عامل خطر در توسعه سرطان سینه پذیرفته شده است (۶). مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می‌دهند که افزایش سطح سرمی E1 و E2 پس از یائسگی به‌طور قابل توجهی باعث افزایش خطر ابتلا به سرطان سینه می‌شود (۷).

عوامل شیمی‌درمانی، تاموکسیفن و رالوکسیفن خطر ابتلا به سرطان سینه با گیرنده مثبت استروژن را در ۵۰ درصد زنان پرخطر کاهش می‌دهند، اما متاسفانه استفاده از آن‌ها با عوارض جانبی عمده همراه است، از جمله این‌که بر اندومتر رحم اثر می‌گذارند و ممکن است باعث سرطان اندومتر نیز بشوند. علاوه بر این، از سرطان سینه با گیرنده منفی استروژن جلوگیری نمی‌کنند. در طول دهه گذشته، استفاده از محصولات طبیعی مشتق شده از گیاهان برای پیشگیری و درمان سرطان در ایالات متحده افزایش یافته است (۸، ۹). رژیم غنی از میوه‌ها و سبزیجات باعث کاهش ریسک ابتلا به

سرطان سینه و سایر انواع سرطان می‌شود و همچنین تخمین زده شده است که بیش از ۲۰٪ سرطان‌ها با مصرف میوه و سبزی از بین می‌روند، این مطلب نشان می‌دهد که فیتوکمیکال‌های میوه‌ها و سبزیجات باعث جلوگیری از شروع و پیشرفت سرطان با تاثیر بر راه‌های بیوشیمیایی و مولکولی می‌شوند. از ویژگی‌های مثبت فیتوکمیکال‌ها می‌توان به دسترسی آسان، قیمت ارزان و عدم وجود اثرات سمی در آن‌ها اشاره کرد (۱۰).

انار

انار میوه بومی مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری در خاورمیانه و هند می‌باشد، و از لحاظ تجربی، برای قرن‌ها کاربرد دارویی داشته است (۱۱) و دارای کاربردهای گسترده‌ای در طب سنتی و مدرن است (۱۲). فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا از قسمت‌های مختلف انار مانند آب، پوست و دانه‌ها مشخص شده‌اند. این فعالیت آنتی‌اکسیدانی به مقدار زیاد ترکیبات فنلی مرتبط است شامل: آنتوسیانیدین‌ها (۳-۳-گلوکوزاید و ۳-۵ دی‌گلوکوزاید از دلفینیدین، سیانیدین، پلارگونیدین)، الاجیک‌اسید، پونیکالین، پونیکالاجین، پدانکولاجین و فلاونول‌های متفاوت (۱۴، ۱۳). آب انار منبع خوبی از فروکتوز، ساکارز و گلوکز است. همچنین بعضی از اسیدهای ارگانیک ساده مثل اسیداسکوربیک، سیتریک‌اسید، فوماریک‌اسید و مالیک‌اسید را دارد. علاوه بر این شامل مقدار کمی آمینواسید به ویژه پرولین، متیونین و والین می‌باشد (۱۵). انار به دلیل وجود این ترکیبات در پیشگیری یا درمان بسیاری از بیماری‌ها مثل سرطان، بیماری‌های قلبی عروقی، دیابت، چاقی، بیماری‌های التهابی، بیماری‌های عفونی و میکروبی، اختلالات عصبی و ایمنی، التهاب، زخم و آرتريت نقش دارد. بر اساس مطالعات پیشین و بالینی که توسط آزمایشگاه‌های مختلف در سراسر جهان انجام شده است، نمونه‌های مشتق شده از انار از قبیل آب، عصاره‌ها و فیتوکمیکال‌ها اثرات پیشگیرانه و درمانی بر روی سرطان کولون، کبد، ریه، پروستات و پوست را نشان داده‌اند (۱۶، ۵). تحقیقات نشان داده‌اند که اثرات درمانی انار در سرطان سینه،

داده شده است که آمینوگلو تیمید (یک مهارکننده آروماتاز شناخته شده) با دوز ۱۰۰ میلی‌مول در لیتر تقریباً ۶۵٪ فعالیت آروماتاز را مهار می‌کند، در حالی که داده‌های حاصل از این مطالعه نشان داد که آب انار تخمیر شده و پلی فنول‌های آن به ترتیب ۶۰ و ۸۰ درصد قدرت مهارکنندگی آروماتاز را دارند (۲۰). هم‌چنین نشان داده شده فلاونوئیدهای موجود در انار (مانند لوتئولین، کومسترویل، کومپفرل) به‌طور رقابتی باعث مهار آروماتاز در یک سیستم کشت سلولی انسانی می‌شوند (۲۱). ترکیبات مشتق شده از اجیتانین شامل: UB Methylated-UB, urolithin B, MUB, UA, urolithin A, sulfate AUB, acetylated-UB, MUA و acetylated-MUA فعالیت ضد آروماتاز قابل توجهی را نشان داده‌اند که در این بین، یورولایتین B بیشترین فعالیت آنتی‌آروماتازی را از خود نشان داده است که ممکن است به دلیل جذب بهتر آن در سلول باشد. البته واضح است که ترکیب مجموع این ترکیبات اثر بهتری نسبت به استفاده از یک ترکیب منفرد دارد (۱۹).

مهار سیکلواکسیژناز

خانواده آنزیم‌های COX Cyclooxygenase در سنتز پروستاگلاندین‌ها (PG) از جمله PGE، نقش دارند و دارای دو خانواده COX-1 و COX-2 می‌باشند. COX-1 در اکثر سلول‌ها بیان می‌شود، در حالی که بیان COX-2 از طریق محرک‌های مختلف، از جمله استرس، سیتوکین‌ها، فاکتورهای رشد و آنکوژن‌ها به‌وجود می‌آید. پروستاگلاندین‌های تولید شده توسط COX-2 در مراحل مختلف ایجاد سرطان، از جمله تکثیر، موتاژنز، فرار از آپوپتوز، سرکوب ایمنی، آنژیوژنز و تهاجم نقش دارند. بنابراین مهار COX-2 باعث کاهش ترومای سلولی تومور سینه می‌شود (۱۶). پونیکیک اسید و الاجیک اسید که از اجزاء انار هستند، در تنظیم فعالیت آنزیم COX2 دخیل هستند. الاجیک اسید باعث مهار آپوپتوز، فعال‌سازی مسیرهای التهابی و آنژیوژنز می‌شود. علاوه بر این نشان داده شده است که، پرودلفینیدین prodelfinidien جدا شده از توت سیاه، مانع از تولید COX و پروستاگلاندین می‌شود، بنابراین با توجه به این‌که

در مقایسه با تاموکسیفن و استرادیول قابل‌ملاحظه است (۱۷). مطالعات نشان داده‌اند که عصاره انار و اجزای آن، به صورت جداگانه و یا به صورت ترکیبی، می‌تواند پروتئین‌ها و ژن‌های کلیدی در سرطان سینه را تنظیم و هدف‌گذاری کند و باعث کاهش تکثیر در سرطان سینه شود (۱۸). عصاره میوه انار می‌تواند با جایگزین شدن و یا اضافه شدن به تنظیم‌کننده انتخابی گیرنده استروژن (SERM Selective estrogen receptor modulator) که برای جلوگیری از سرطان سینه می‌باشد، از سرطان پیشگیری کند (۹، ۸). الاجیتانین که از اجزاء انار است، در دستگاه گوارش هیدرولیز می‌شود و ترکیبات مختلف از جمله الاجیک اسید را به‌وجود می‌آورد که توسط میکروفلورهای کولون به 6-one و یورولایتین (UA) تبدیل می‌شود. این دو ترکیب باعث مهار رشد سلول‌های سرطان سینه و پروستات می‌شوند. مطالعات اخیر نیز نشان داده‌اند که یورولایتین A و B دارای اثرات استروژنی و ضد استروژنی در سلول‌های سرطانی سینه انسان هستند و بنابراین ممکن است دارای ویژگی‌های شبه SERM باشند (۱۹).

روش بررسی

مطالب استفاده شده برگرفته از ۴۹ مقاله ای هستند که به شرح مکانیسم اثر انار در سرطان سینه پرداخته‌اند. مطالب، در پایگاه اطلاع داده PubMed با استفاده از کلید واژه‌های "pomegranate" یا "Punica grantum" و "breast cancer" و "breast neoplasm" ۱۷ مقاله به‌صورت گزینشی انتخاب شدند. مقالات استفاده شده، از مقالات منتشر شده بین سال‌های ۱۹۹۴ تا ۲۰۱۷ می‌باشد و سعی شده که از مقالات جدیدتر بهره‌گیری شود.

بحث

نقش اجزاء مختلف انار در درمان و پیشگیری از سرطان سینه: مهار آروماتازها
کیم و همکاران گزارش دادند که آب انار تخمیر شده و پلی‌فنل‌های تخمیر نشده که از پوست انار استخراج می‌شوند، به‌صورت قابل توجهی فعالیت آروماتاز را مهار می‌کنند. نشان

مستقیم در تسریع روند تکثیر سلول‌های تومور دخالت دارند. همچنین ثابت شده است که HSP90 باعث تنظیم بیان و عملکرد انواع عوامل تولیدکننده پاتوکارسینوژن می‌شود. بنابراین به نظر می‌رسد مهار HSP یک رویکرد مناسب است که احتمالاً منجر به کاهش بالقوه در استرس التهابی می‌شود و بنابراین یک روش ایده آل برای کاهش بروز سرطان است. درمان با امولسیون انار به منظور سرکوب پروتئین‌های بیش تنظیم شده HSP70 و HSP90، کاهش قابل ملاحظه‌ای از وضعیت استرس‌زایی مبتنی بر التهاب را نشان داده است (۲۵).

تأثیر بر سایر مسیرهای التهابی

فاکتور رونویسی زیپ پایه لوسین (Nrf2)، نقش مهمی در محافظت از سلول‌های سینه در برابر آسیب‌های ناشی از التهاب و استرس اکسیداتیو دارد. تحت شرایط نرمال سلولی، Nrf2 در ارتباط با Kelch-like ECH-associated protein با Keap1 است. پس از استرس سلولی، Keap1 آزاد می‌شود، به هسته وارد می‌شود، و به‌عنوان یک عنصر پاسخ دهنده آنتی‌اکسیدانی شناخته می‌شود و رونویسی ژن‌های فراوانی را تسهیل می‌کند که آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و سم‌زدایی را رمزگذاری می‌کنند. مسیر پیام‌رسانی Nrf2 عمیقاً در تنظیم التهاب و سرطان‌زایی مرتبط با التهاب دخیل است و بر این اساس این مسیر حاوی هدف مهم پیشگیری از سرطان مربوط به التهاب است. نشان داده شده است که درمان با امولسیون انار در تقویت بیان و همچنین انتقال هسته‌ای Nrf2 مؤثر است که به نوبه خود باعث کاهش فعالیت التهابی ناشی از NF- κ B می‌شود و در نهایت منجر به پیشگیری از سرطان سینه می‌شود. با این حال، توجه به جنبه دیگری از القاء Nrf2 قابل توجه است که بیان پایدار Nrf2 موجب افزایش مقاومت سلول‌های سرطانی به عوامل شیمی‌درمانی، از جمله سیس‌پلاتین Cisplatin و دوکسوروبیسین Doxorubicin می‌شود. افزایش Nrf2، ناشی از درمان با امولسیون انار، می‌تواند برای جلوگیری از التهاب ناشی از سرطان مفید باشد، اما می‌تواند نتیجه درمانی بیماران

دلفینیدین delphinidial در انار نیز وجود دارد ممکن است پاسخ‌های التهابی را مهار کند (۲۲، ۲۳). تعدادی دیگر از اجزای انار، مانند اسیدگالیک و پونیکالاجین A و B، باعث تولید PGE2 ناشی از لیپوپولی ساکارید، اکسیدنیتریک و اینترلوکین - ۱۶ می‌شوند (۱۶). Shukla و همکاران گزارش کردند که در خرگوش‌ها پس از خوردن عصاره میوه انار فعالیت آنزیم‌های COX-1 و COX-2 مهار شده‌اند که نشان می‌دهد، پس از مصرف انار متابولیت‌های انار موجود در خون، اثرات فیزیولوژیک قابل اندازه‌گیری دارند (۲۴).

تأثیر بر پروتئین‌های شوک حرارتی

پروتئین‌های شوک حرارت (HSP)، پروتئین‌های قابل تحمل در برابر استرس هستند که نقش مهمی در پاسخ استرس سلولی دارند. چند خانواده اصلی HSP در انسان وجود دارد، مانند HSP40، HSP70، HSP90، HSP60/HSP10، HSP110. بر اساس گزارش‌های علمی، HSP90 می‌تواند رویدادهای التهابی را از طریق تنظیم سیتوکین‌های مختلف و مسیرهای پیام‌رسانی سلول تنظیم کند. در حال حاضر بررسی اثربخشی مهارکننده‌های مختلف HSP90 در درمان بسیاری از بیماری‌های انکولوژیک، از جمله سرطان سینه در حال انجام است. در تحقیقات انجام گرفته بیان بالایی از HSP90 در بخش‌های تومور نشان داده شده و مشخص شده که سرطان ممکن است به دلیل شرایط التهابی باعث القا پروتئین‌های شوک حرارتی شود و منجر به تکثیر نامنظم و فرار از آپوپتوز شود. نتایج یک مطالعه، کاهش قابل توجهی را در بیان HSP90 در گروه دریافت‌کننده‌ها مولسیون انار نشان داد، که نشان دهنده خاصیت انار برای از بین بردن رشد سلول‌های تومور سینه از طریق کاهش HSP90 است که ممکن است با مقدار کمتر استرس التهابی نیز مرتبط باشد (۱۶). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که HSPها در طول پیشرفت در مدولاسیون عملکرد p53، پیشرفت چرخه سلولی و آپوپتوز سرطان نقش دارند. دو عامل مهم در توسعه و پیشرفت تومور، HSP70 و HSP90 هستند. نشان داده شده است که سلول‌های بدخیم در سرطان کبد بیش از حد HSP70 را منتشر می‌کنند و به‌طور

تأثیر بر ۲۷-هیدروکسی کلاسترول و تغییر در Era و Erb

اخیراً با شناسایی یکی از مشتقات کلاسترول به نام ۲۷ هیدروکسی کلاسترول که یک تنظیم کننده انتخابی گیرنده استروژن (SERM) اندوژنیک است و می تواند از طریق مکانسیم حد واسط گیرنده استروژن فعالیت کند، ارتباط بین پاقی و سرطان سینه مشخص شده است. ۲۷-هیدروکسی کلاسترول می تواند منجر به تغییر در گیرنده استروژن α و β شود و آن را از E217- β -estradiol و دیگر تنظیم کننده های انتخابی گیرنده استروژن متمایز کند و باعث فعالیت تکثیری در سلول های سرطان سینه شود. به علاوه ۲۷ هیدروکسی کلاسترول باعث رشد بیش از حد وابسته به گیرنده استروژن و متاستاز در موش های مبتلا به سرطان سینه می شود. گزارش شده است که این تنظیم کننده های انتخابی گیرنده استروژن درون زاء، اثرات مخرب شامل مهار اثر محافظتی از استرادیول در بیماری های قلبی عروقی، ترویج آترواسکلروز، تنظیم منفی هموستاز استخوان و همچنین القاء و ترویج سرطان سینه دارند. مطالعات نشان دادند که عصاره انار می تواند به عنوان تنظیم کننده های انتخابی گیرنده استروژن عمل کند، به گیرنده استروژن باند شود و کمپلکس لیگاند-گیرنده را به عناصر پاسخ دهنده به گیرنده استروژن جابه جا کند و باعث تنظیم کاهشی فاکتورهای رونویسی حد واسط گیرنده استروژن در سرطان سینه شود. همچنین عصاره انار می تواند مانع تکثیر ۲۷ هیدروکسی کلاسترول شود و بیان ژن های افزایشنده ۲۷-هیدروکسی کلاسترول را کاهش دهد. طبق نتایج مطالعات واضح است که انار و ۲۷ هیدروکسی کلاسترول بر سر باند شدن به گیرنده استروژن α با استرادیول رقابت می کنند. بنابراین عصاره انار با رقابت با ۲۷ هیدروکسی کلاسترول می تواند باعث کاهش اثرات تکثیری ۲۷ هیدروکسی کلاسترول در رده سلولی سلول های سرطان سینه شود. پس می تواند باعث مهار تکثیر سلولی و کاهش اثرات تکثیری استرادیول شود. به طور کلی یافته های این مطالعه نشان داد که عصاره انار به گیرنده استروژن متصل می شود و باعث تنظیم کاهشی فاکتورهای حدواسط رونویسی عناصر پاسخ دهنده به استروژن در

درمان شده با داروهای شیمی درمانی را به خطر بیندازد (۱۶). فاکتورهای رونویسی از پروتئین های خاص (Sp) (specificity protein transcription factors)، عوامل رونویسی هستند که به طور گسترده ای در تومورها به میزان بیش از حد بیان می شوند و ژن های مورد نیاز برای تکثیر سلولی، بقا و آنژیوژنز را تنظیم می کنند. در یک مطالعه نشان داده شد که عصاره انار باعث کاهش رونویسی از ژن های Sp1، Sp3 و Sp4 و همچنین باعث کاهش ژن های کنترل شده با Sp در گیر در تکثیر سلولی، آنژیوژنز و التهاب، از جمله cyclin D1، bcl2 B-cell lymphoma 2، VEGF، vascular endothelial growth factor، گیرنده آن (VEGFR-1) و NF- κ B می شود. در سلول های سرطانی سینه، بیان Sp به علت سرکوب گیرنده های آن توسط miR-27a بالا می باشد. انار می تواند به طور قابل توجه miR-27a را در سلول های سرطانی سینه کاهش دهد و باعث تنظیم افزایشی ژن ZBTB10 (پروتئینی سرکوب کننده Sp) در سلول های سرطانی شود که در نهایت باعث تنظیم غلظت NF- κ B و ژن های دخیل در آنژیوژنز می شود (۲۶).

فعالیت ضد استروژنی و استروژنی

یک مطالعه با هدف بررسی اثر مصرف آب انار بر سطح استرادیول، استرون، تستوسترون، اندرستندین و گلوبولین متصل شونده به هورمون های جنسی در زنان یائسه مبتلا به سرطان سینه انجام شد. در این کارآزمایی بالینی افراد برای مدت ۳ هفته، به صورت روزانه ۸ اونس آب انار دریافت می کردند در حالی که افراد در گروه کنترل آب سیب دریافت می کردند. بعد از ۳ هفته مداخله هیچ کاهش قابل توجهی در گلوبولین متصل شونده به هورمون های جنسی در گروه مداخله نسبت به کنترل مشاهده نشد. ولی کاهش قابل توجه استرون و تستوسترون در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد (۲۷). همچنین نشان داده شده که یورولیتین به عنوان یک مولکول بیواکتیو موجود در انار، می تواند به گیرنده استروژن باند شود و فعالیت استروژنی و ضد استروژنی در سلول های سرطان سینه داشته باشد (۲۸).

در انتقال پیام، چسبندگی سلولی و تنظیم بیان ژن سلول دارد. در غیاب پیام Wnt، β -catenin به یک کمپلکس چند پروتئینی متصل می‌شود که شامل Axin، adenomatous polyposis coli، کازئین کیناز -1-a و گلیکوژن سینتاز کیناز است که فسفوریلاسیون، یوبیکوئینه شدن و تخریب آن‌ها را با پروتئازوم تسهیل می‌کند. در حضور پیام Wnt، تخریب این مجموعه، غیرفعال شده، که منجر به تثبیت و تجمع β -catenin در سیتوپلاسم می‌شود. در نتیجه، β -catenin هسته انتقال می‌یابد و به فاکتور سلول‌های T/فاکتور ارتقادهنده لنفوییداها T-cell factor/lymphoid-enhancer factor متصل می‌شود و در نتیجه آن منجر به فعال شدن رونویسی از ژن‌های مختلف هدف مانند c-myc، cyclin D1، matrix metalloproteinase 7 و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی که در سرطان سینه نقش دارد، می‌شود. تجمع قابل توجهی از β -catenin در هسته و یا سیتوپلاسم در نمونه‌های سرطان انسانی مشاهده شده است و به نظر می‌رسد با پیش‌آگهی ضعیف همراه باشد. جالب توجه است که در نمونه‌های انسانی سرطان سینه تنظیمات هسته‌ای و یا سیتوپلاسمی β -catenin با بیان ژن هدف خود یعنی cyclin D1 هم بسته است. فعال شدن مسیر Wnt/ β -catenin ممکن است یک رویداد زودهنگام در سرطان سینه در انسان باشد. نتایج یک مطالعه نشان داد که درمان با امولسیون انار باعث لغو پیام‌رسانی Wnt/ β -catenin می‌شود که نشان دهنده کاهش بیان β -catenin هسته‌ای و سیتوزولی است. به نظر می‌رسد مکانیسم احتمالی امولسیون انار در مهار تکثیر سلولی و تشدید آپوپتوز در تومور سینه در موش‌های صحرایی سرکوب پیام‌رسانی Wnt/ β -catenin باشد. میزان پروتئین cyclin D1 در بیش از ۵۰ درصد سرطان‌های سینه افزایش یافته است. یافته‌ها نشان می‌دهد که ممکن است cyclin D1 به‌عنوان یک هدف بالقوه برای ترکیبات فعال انار در جهت پیشگیری از سرطان سینه باشد. از آنجایی که cyclin D1 یک ژن تنظیم شده با β -catenin می‌باشد و امولسیون انار به همان شیوه β -catenin باعث تنظیم کاهشی Cyclin D1 می‌شود، مطالعات تداخل پیام

سلول‌های سرطانی سینه، بدون اثرات آگونیستی در آندومتر رحم می‌شود و همچنین بر بیماری قلبی عروقی اثرات قابل‌مقایسه‌ای نسبت به ۱۷-بتا استرادیول دارد. این یافته‌ها نشان دهنده توانایی عصاره انار در جلوگیری از فعالیت ۲۷-هیدروکسی کلاسترول است. به عبارتی عصاره انار می‌تواند با ۲۷-هیدروکسی کلاسترول برای گیرنده استروژن α رقابت کند و از تکثیر ایجاد شده توسط ۲۷-هیدروکسی کلاسترول جلوگیری کند (۱۷). استروژن اثر خود را در بافت هدف از طریق تعامل با دو عضو مختلف از خانواده گیرنده هسته‌ای از عوامل رونویسی تنظیم شده توسط هورمون، به نام گیرنده استروژن α و گیرنده استروژن β انجام می‌دهد. پس از اتصال هورمون به این گیرنده‌ها، کمپلکس گیرنده-هورمون با سلول‌های خاصی در DNA به نام عناصر پاسخ دهنده به استروژن و یا با سایر عوامل رونویسی واکنش می‌دهد که برای تنظیم رونویسی ژن هدف به کار می‌روند. تنظیم‌کننده‌های انتخابی گیرنده استروژن به گیرنده استروژن باند می‌شوند و عمل آگونیست استروژن را در بعضی از بافت‌های هدف و عمل آنتاگونیستی استروژن را در سایر بافت‌ها اعمال می‌کنند. ژن‌هایی که توسط تنظیم‌کننده‌های انتخابی گیرنده استروژن با گیرنده استروژن α تنظیم می‌شوند، متفاوت از آن‌هایی است که با گیرنده استروژن β تنظیم می‌شوند.

گیرنده استروژن α باعث افزایش تکثیر در سلول‌های سرطان سینه و گیرنده استروژن β باعث سرکوب تومور می‌شود. نشان داده شده است که عصاره انار فعالیت رونویسی وابسته به استروژن گیرنده استروژن α را به‌صورت وابسته به دوز مهار می‌کند. عصاره انار به گیرنده استروژن متصل می‌شود، کمپلکس گیرنده لیگاند را به هسته منتقل می‌کند و رونویسی عناصر پاسخ دهنده به استروژن را در سلول‌های سرطانی سینه بدون اثر بر آندومتر رحم کاهش می‌دهد و دارای اثر محافظتی قلب در مقایسه با E2 است (۹).

مسیر پیام‌رسانی Wnt/ β -catenin

مسیر پیام‌رسانی Wnt/ β -catenin نقش مهمی در توسعه ژن سرطان سینه و همچنین تومورزایی به‌دلیل دخالت

Wnt/ β -catenin توسط امولوسیون انار را در حین سرطان در موش صحرایی تأیید می‌کنند (۶).

چسبندگی و مهاجرت سلول‌های سرطانی

از دست دادن چسبندگی، افزایش مهاجرت و کموتاکسیک به‌عنوان ویژگی عمده متاستاز شناخته می‌شود. مطالعه‌ای با هدف بررسی اثر آب انار بر متاستاز در سرطان سینه انجام شد که نتایج آن نشان داد آب انار یا مجموعه ترکیبات آن (الاجیک‌اسید، پونیکیک‌اسید و لوتولین) علاوه بر مهار رشد سلول‌های سرطان سینه، باعث افزایش چسبندگی سلول‌های سرطان سینه و کاهش مهاجرت آن‌ها می‌شود اما بر سلول‌های سالم اثری ندارد. هم‌چنین این درمان باعث مهار کموتاکسیک‌های سرطان می‌شود. در این مطالعه این فرضیه شکل گرفت که احتمالاً آب انار و ترکیبات گفته شده باعث افزایش بیان ژن چسبندگی سلول‌های سرطانی و مهار ژن‌های تحریک کننده مهاجرت و مهار کموتاکسیک می‌شود.

آب انار باعث تحریک ICAM-1 intercellular adhesion molecule-1 (فاکتور دخیل در چسبندگی سلول‌ها) و MARCKS myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate (پروتئین اتصال دهنده مرتبط با غشای پلاسمایی که در چسبندگی دخیل است) می‌شود. هم‌چنین باعث افزایش بیان Hyaluronan-mediated motility receptorHMMR (پروتئین محلول که باعث تغییر رفتارهای مهاجرتی سلول می‌شود). این گیرنده به هیالورونان باند می‌شود و باعث فعال شدن مسیر انتقال پیام-RhoA ROCK activated protein kinase (یک فاکتور کلیدی در تنظیم مهاجرت سلول‌ها)، می‌شود. آب انار هم‌چنین باعث تنظیم کاهش nexillin and anillin (پروتئین‌های اتصال دهنده اکتین که در تنظیم ساختار اسکلت سلولی دخیل هستند)، می‌شود. به‌علاوه باعث تنظیم کاهش N-chimearin (پروتئین فعال کننده GTPase که باعث افزایش مهاجرت می‌شود)، و هم‌چنین تنظیم کاهش TWIST فاکتور رونویسی که باعث کاهش چسبندگی و افزایش تحرک سلول می‌شود (۳).

اثر بر سیتوکروم p450

آنزیم‌های سیتوکروم p450 در متابولیسم داروها و زنبوبوتیک‌ها دخیل هستند. در یک مطالعه با هدف بررسی اثر آب انار بر بیان و فعالیت سیتوکروم‌ها در موش، به مدت ۴ هفته به موش‌ها آب انار داده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که مصرف آب انار به مدت ۴ هفته باعث کاهش محتوای سیتوکروم کبدی و بیان CYP1A2 و CYP3A Cytochrome P450, family 3, subfamily A می‌شود. هم‌چنین مشخص شد که آب انار از طریق فعالیت بازدارندگی پروکارسینوزن‌ها (مهار فعالیت و بیان سیتوکروم‌ها بر شروع، پیشرفت و گسترش سرطان) موثر است. مطالعات دیگر هم نشان داده‌اند که به‌طور مثال یورولیتین باعث کاهش فعالیت و بیان سیتوکروم p450 ویژه تومور، در فعال‌سازی تعدادی از عوامل سرطانزا و در متابولیسم هورمون‌های استروئیدی نقش دارد. این پروتئین باعث تشکیل 4-هیدروکسی‌استرادیول که ماده‌ای سرطان‌زا بوده و فعالیت استروژنی چشمگیری دارد می‌شود CYP1B1 در سلول‌های 22Rv1 سرطانی پروستات می‌شود (۲۹-۳۱).

مسیر آبشار کاسپاز

فعال‌سازی اعضای خانواده پروآپوپتوزی Bcl2، مانند Bax و Bad، آپوپتوز را با ایجاد حفره‌های غشایی میتوکندری تحریک می‌کند و موجب انتشار سیتوکروم C می‌شود که به فاکتور فعال‌کننده پروتئاز ۱ و سپس به پروکاسپاز ۹ متصل می‌شود تا یک پروتئین پیچیده به نام آپوپتوزوم ایجاد کند. آپوپتوزوم، پروکاسپاز ۹ را به شکل فعال آن یعنی کاسپاز ۹ تبدیل می‌کند که به نوبه خود کاسپاز-۳ را فعال می‌کند. کاسپاز ۷ یکی دیگر از اپراتورهای پایین‌دست است که توسط هر دو مسیر گیرنده مرگ (بیرونی) و مسیرهای واسطه میتوکندری (ذاتی) فعال می‌شود. فعال‌شدن کاسپاز ۳ و کاسپاز ۷ در نهایت منجر به آپوپتوز می‌شوند. بیان بیش از حد Bcl2 از طریق سرکوب آپوپتوز باعث افزایش بقای سلول می‌شود، در حالی که افزایش بیان Bax باعث افزایش سرعت آپوپتوز می‌شود. افزایش نسبت Bax/Bcl2 به‌عنوان یک شاخص قابل اطمینان از میل کلی سلولی به انجام آپوپتوز در

نو ترکیب می‌شود و سلول‌ها را به شکست دو رشته DNA، مهار رشد و آپوپتوز حساس می‌کند. از آنجایی که همولوگ نو ترکیب نشان‌دهنده یک هدف جدید برای درمان سرطان است، تنظیم کاهشی همولوگ نو ترکیب با عصاره انار می‌تواند برای حساسیت تومورها به داروهای ضد سرطان مورد استفاده قرار گیرد (۳۲).

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتایج مطالعات بررسی شده نشان داده‌اند که ترکیبات مختلف موجود در انار می‌تواند از طریق مهار آروماتازها، اثر بر مراحل مختلف چرخه سلولی، فعالیت ضد استروژنی و استروژنی، تاثیر بر ۲۷-هیدروکسی کلسترول و تغییر در گیرنده‌های استروژن α و β ، مسیر پیام‌رسانی Wnt β -catenin، چسبندگی و مهاجرت سلول‌های سرطانی، اثر بر سیتوکروم p450، القا آپوپتوز از طریق مسیر آپشار کاسپاز و مهار التهاب از طریق اثر بر آنزیم‌های مسیر سیکل و اکسیژن از، پروتئین‌های شوک حرارتی، فاکتور رونویسی زیپ پایه لوسین، فاکتورهای رونویسی از پروتئین‌های خاص و مسیرهای دیگر می‌تواند باعث جلوگیری از سرطان سینه شود یا پیشرفت آن را در مراحل مختلف از جمله رشد، تکثیر، تمایز و متاستاز کاهش دهد. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده به‌طور گسترده‌تر به بررسی مکانیسم‌های انار در سرطان سینه و اهمیت هر مکانیسم پرداخته شود

سپاس‌گزاری

محققان مایل به تشکر از اعضای مرکز تحقیقات تغذیه دانشگاه علوم پزشکی شیراز هستند. تعارض در منافع: وجود ندارد.

نظر گرفته می‌شود. نشان داده شده که درمان با عصاره انار باعث افزایش بیان Bax و کاهش بیان Bcl2 در تومورهای سینه با تغییر نسبت Bax/Bcl2 می‌شود. همچنین تنظیم افزایشی Bad، سیتوکروم C، کاسپاز ۳ و ۷ و ۹ نشان داده شده است. بنابراین انار می‌تواند سبب ایجاد آپوپتوز در تومورهای سینه از طریق تنظیم افزایشی ژن پروآپتوتیک، تنظیم کاهشی ژن‌های ضد آپاپتوتیک و مسیر آپشار کاسپاز شود (۵).

سایر مکانیسم‌های اثر انار دخیل در سرطان

نشان داده شد که عصاره انار باعث توقف چرخه سلولی در مرحله G2/M و القا آپوپتوز و در نتیجه اثرات مهاری بر رشد سلول می‌شود. همچنین نشان داده شده است که اثرات مهاری عصاره انار بر رشد سلولی تنها به خاطر اثرات آنتی‌اکسیدانی انار نمی‌باشد. آنالیزها نشان داده‌اند که درمان با عصاره انار می‌تواند حدود ۹۰۰ ژن را تحت تاثیر قرار دهد و می‌تواند بر روی تنظیم کاهشی ژن‌های پایدار مرتبط با میتوز، سازمان کروموزوم، پردازش RNA، تکثیر DNA و تعمیر DNA، و ژن‌های کنترل شده در تنظیم آپوپتوز و تکثیر سلولی اثرگذار باشد. همچنین آنالیزها نشان دادند که عصاره انار باعث تنظیم کاهشی ژن‌های مهم دخیل در شکست دو رشته DNA با استفاده از همولوگ نو ترکیب (HR)، مانند BRCA1، RAD51، NBS1، RAD50، MRE11 و BRCA2 می‌شود. تنظیم کاهشی ژن‌های همولوگ نو ترکیب با افزایش سطوح میکرو RNAهای پیش‌بینی شده (miRNAs)، miR-183 (هدف پیش‌بینی شده RAD50) و miR-24 (هدف پیش‌بینی شده BRCA1) ارتباط دارد. این نشان می‌دهد که عصاره انار می‌تواند miRNAهای موجود در فرایندهای تعمیر DNA را تنظیم کند. این داده‌ها نشان می‌دهد که عصاره انار باعث تنظیم کاهشی همولوگ

References:

- 1-Elidrissi Errahhali M, Elidrissi Errahhali M, Abda N, Bellaoui M. *Exploring Geographic Variability in Cancer Prevalence in Eastern Morocco: A Retrospective Study over Eight Years*. Plos One 2016; 11(3): e0151987.
- 2-Masoompour SM, Lankarani KB, Honarvar B, Tabatabaee SH, Moghadami M, Khosravizadegan Z. *Changing Epidemiology of Common Cancers in Southern Iran, 2007-2010: A Cross Sectional Study*. Plos One 2016; 11(5): e0155669.
- 3-Rocha A, Wang L, Penichet M, Martins-Green M. *Pomegranate Juice and Specific Components Inhibit Cell and Molecular Processes Critical for Metastasis of Breast Cancer*. Breast Cancer Resand Treat 2012; 136(3): 647-58.
- 4-Ataollahi MR, Sharifi J, Paknahad MR, Paknahad A. *Breast Cancer and Associated Factors: A Review*. J Med Life 2015; 8(Spec Iss 4): 6-11.
- 5-Bishayee A, Mandal A, Bhattacharyya P, Bhatia D. *Pomegranate Exerts Chemoprevention of Experimentally Induced Mammary Tumorigenesis by Suppression of Cell Proliferation and Induction Of Apoptosis*. Nutr cancer 2016; 68(1): 120-30.
- 6-Mandal A, Bishayee A. *Mechanism of Breast Cancer Preventive Action of Pomegranate: Disruption of Estrogen Receptor and Wnt/B-Catenin Signaling Pathways*. Molecules 2015; 20(12): 22315-28.
- 7-Thomas HV, Reeves GK, Key TJ. *Endogenous Estrogen and Postmenopausal Breast Cancer: A Quantitative Review*. Cancer Causes Control 1997; 8(6): 922-8.
- 8-Khan GN, Gorin MA, Rosenthal D, Pan Q, Bao LW, Wu ZF, et al. *Pomegranate Fruit Extract Impairs Invasion and Motility in Human Breast Cancer*. Integr cancer ther 2009; 8(3): 242-53.
- 9-Sreeja S, Santhosh Kumar TR, Lakshmi BS, Sreeja S. *Pomegranate Extract Demonstrate a Selective Estrogen Receptor Modulator Profile in Human Tumor Cell Lines and in Vivo Models of Estrogen Deprivation*. J Nutr Biochem 2012; 23(7): 725-32.
- 10- Dai Z, Nair V, Khan M, Ciolino HP. *Pomegranate Extract Inhibits the Proliferation And Viability of MMTV-Wnt-1 Mouse Mammary Cancer Stem Cells in Vitro*. Oncol Rep 2010; 24(4): 1087-91.
- 11- Costantini S, Rusolo F, De Vito V, Moccia S, Picariello G, Capone F, et al. *Potential Anti-Inflammatory Effects of the Hydrophilic Fraction of Pomegranate (Punica Granatum L.) Seed Oil on Breast Cancer Cell Lines*. Molecules 2014; 19(6): 8644-60.
- 12- Asgary S, Keshvari M, Sahebkar A, Hashemi M, Rafieian-Kopaei M. *Clinical Investigation of the Acute Effects of Pomegranate Juice on Blood Pressure and Endothelial Function in Hypertensive Individuals*. ARYA Atheroscler 2013; 9(6): 326-31.
- 13- Bazargani-Gilani B, Tajik H, Aliakbarlu J. *Physicochemical and Antioxidative Characteristics of Iranian Pomegranate (Punica Granatum L. Cv. Rabbab-E-Neyriz) Juice and Comparison of Its Antioxidative Activity with Zataria Multiflora Boiss Essential Oil*. Vet Res Forum 2014; 5(4): 313-8.
- 14- Esmailinezhad Z, Babajafari S, Sohrabi Z, Eskandari MH, Amooee S, Barati-Boldaji R. *Effect*

- of Synbiotic Pomegranate Juice on Glycemic, Sex Hormone Profile and Anthropometric Indices in PCOS: A Randomized, Triple Blind, Controlled Trial.* Nutr Metab Cardiovasc Dis 2019; 29(2): 201-208.
- 15- Saravani M, Kazemi Mehrjerdi H, Mirshahi A, Afkhani Goli A. *Protective Effects of Pomegranate Seed Oil on Ovariectomized Rats as a Model of Postmenopausal Osteoporosis: A Multi-Detector Computed Tomography Evaluation.* Vet Res Forum 2014; 5(4): 263-8.
- 16- Mandal A, Bhatia D, Bishayee A. *Anti-Inflammatory Mechanism Involved in Pomegranate-Mediated Prevention of Breast Cancer: The Role of NF-Kb And Nrf2 Signaling Pathways.* Nutrients 2017; 9(5): E436.
- 17- Vini R, Juberiya Am, Sreeja S. *Evidence of Pomegranate Methanolic Extract in Antagonizing the Endogenous SERM, 27-Hydroxycholesterol.* IUBMB Life 2016; 68(2): 116-21.
- 18- Vini R, Sreeja S. *Punica Granatum And Its Therapeutic Implications on Breast Carcinogenesis: A Review.* Biofactors 2015; 1(2): 78-89.
- 19- Adams LS, Zhang Y, Seeram NP, Heber D, Chen S. *Pomegranate Ellagitannin-Derived Compounds Exhibit Antiproliferative And Antiaromatase Activity Inbreast Cancer Cells in Vitro.* Cancer Prev Res 2010; 3(1): 108-13.
- 20- Kim ND, Mehta R, Yu W, Neeman I, Livney T, Amichay A, et al. *Chemopreventive and Adjuvant Therapeutic Potential of Pomegranate (Punica Granatum) for Human Breast Cancer.* Breast Cancer Res Treat 2002;71(3): 203-17.
- 21- Wang C, Mäkelä T, Hase T, Adlercreutz H, Kurzer MS. *Lignans and Flavonoids Inhibit Aromatase Enzyme in Human Preadipocytes.* J Steroid Biochem Mol Biol 1994; 50(3-4): 205-12.
- 22- Aggarwal BB, Shishodia S. *Molecular Targets of Dietary Agents for Prevention and Therapy of Cancer.* Biochem Pharmacol 2006; 71(10): 1397-421.
- 23- Garbacki N, Angenot L, Bassleer C, Damas J, Tits M. *Effects of Prodelphinidins Isolated from Ribes Nigrum on Chondrocyte Metabolism and COX Activity.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2002; 365(6): 434-41.
- 24- Shukla M, Gupta K, Rasheed Z, Khan KA, Haqqi TM. *Bioavailable Constituents/Metabolites of Pomegranate (Punica Granatum L) Preferentially Inhibit COX2 Activity Ex Vivo and IL-1beta-Induced PGE 2 Production in Human Chondrocytes In Vitro.* J Inflamm 2008; 5(1): 9.
- 25- Bishayee A, Thoppil RJ, Darvesh AS, Ohanyan V, Meszaros JG, Bhatia D. *Pomegranate Phytoconstituents Blunt The Inflammatory Cascade in a Chemically Induced Rodent Model of Hepatocellular Carcinogenesis.* J Nutr Biochem 2013; 24(1): 178-87.
- 26- Banerjee N, Talcott S, Safe S, Mertens-Talcott SU. *Cytotoxicity of Pomegranate Polyphenolics in Breast Cancer Cells in Vitro And Vivo: Potential Role of MiRNA-27a and MiRNA-155 In Cell Survival and Inflammation.* Breast Cancer Res Treat 2012; 136(1): 21-34.
- 27- Kapoor R, Ronnenberg A, Puleo E, Chatterton RT Jr, Dorgan JF, Seeram NP, et al. *Effects of*

- Pomegranate Juice on Hormonal Biomarkers of Breast Cancer Risk.* Nutr Cancer 2015; 67(7): 1113-9.
- 28- González-Sarrías A, Giménez-Bastida JA, García-Conesa MT, Gómez-Sánchez MB, García-Talavera NV, Gil-Izquierdo A, et al. *Occurrence of Urolithins, Gut Microbiota Ellagic Acid Metabolites and Proliferation Markers Expression Response in The Human Prostate Gland Upon Consumption of Walnuts and Pomegranate Juice.* Mol Nutr Food Res 2010; 54(3): 311-22.
- 29- Faria A, Monteiro R, Azevedo I, Calhau C. *Pomegranate Juice Effects on Cytochrome P450S Expression: in Vivo Studies.* J Med Food 2007; 10(4): 643-9.
- 30- Vicinanza R, Zhang Y, Henning SM, Heber D. *Pomegranate Juice Metabolites, Ellagic Acid and Urolithin A Synergistically Inhibit Androgen-Independent Prostate Cancer Cell Growth Via Distinct Effects on Cell Cycle Control and Apoptosis.* Evid Based Complement Alternat Med 2013; 2013: 247504.
- 31- Wang L, Martins-Green M. *Pomegranate and Its Components as Alternative Treatment for Prostate Cancer.* Int J Mol Sci 2014; 15(9): 14949-66.
- 32- Shirode AB, Kovvuru P, Chittur SV, Henning SM, Heber D, Reliene R. *Antiproliferative Effects of Pomegranate Extract In MCF-7 Breast Cancer Cells are Associated with Reduced DNA Repair Gene Expression and Induction of Double Strand Breaks.* Mol Carcinog 2014; 53(6): 458-70.

The Effect of Pomegranate and Its Compounds on Breast Cancer: Review Article

Zahra Esmaeilnezhad¹, Reza Barati Boldaji^{*2}

Review Article

Introduction: Pomegranate is a rich source of phytochemicals with high antioxidant effects, which has therapeutic effects in traditional and modern medicine. Pomegranate is effective in the prevention and treatment of cardiovascular diseases, diabetes, obesity, inflammatory diseases, infectious and microbial diseases, neurological disorders and immunity. Today the role of pomegranate in various stages of cancer has also been proven. Since breast cancer is one of the most common cancers among women, this study examined the effect of pomegranate in breast cancer. The articles used from the PubMed database were selected selectively using the words "pomegranate" or "Punica grantum" and "breast cancer". The results of studies have shown that pomegranate compounds can affect different stages of cancer in different ways, including: inhibiting aromatases, inhibiting cyclooxygenase enzymes, effects on heat shock proteins, transcriptional leukocyte zipper transcription factor, transcription factors of specific proteins, cell cycle. Also, it has been shown in some studies that pomegranate compounds can affect different stages of cancer through anti-estrogenic activity, effect on 27-hydroxycholesterol, changes in α and β estrogen receptors, Wnt / β -catenin signaling pathway, cancer cell adhesion and migration, effects on cytochrome p450, Caspase cascade, apoptosis and other pathways.

Keywords: Cancer, Punicaceae, Metastasis, Apoptosis

Citation: Barati R, Esmaeili nezhad Z. **The effect of pomegranate and its compounds on breast cancer: Review article.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2019; 27(8): 1814-25.

¹Nutrition Research Center - Shiraz University of medical sciences, Shiraz, Iran.

²Nutrition Research Center - Shiraz University of medical sciences, Shiraz, Iran.

***Corresponding author: Tel:** 09132807850 **email:** reza93barati@gmail.com