بسم الله الرحمن الرحیم

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از
پایان‌نامه کارشناسی ارشد

خانم عطیه غمناک رشته **بیوتکنولوژی پزشکی** پایان‌نامه **کارشناسی ارشد** خود را با عنوان « **بررسی بیان miR-21 در سلولهای بنیادی سرطان سینه در انسان** » در تاریخ **۱۳۹۱/۴/۱۰** ارائه کردند.

بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنند.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

دکتر مهدی فروزنده مقدم	(استاد راهنما)	
دکتر شیرین شهبازی	(استاد ناظر)	
دکتر مجید صادقی زاده	(استاد ناظر)	
دکتر محمد جواد رسایی	(استاد ناظر ونماینده تحصیلات تکمیلی)	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه-های مصوب انجام شود.

ماده ٤- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/٤/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/٤/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **عطیه غمناک** دانشجوی رشته **بیوتکنولوژی پزشکی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۸** مقطع **کارشناسی ارشد** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

امضا

تاریخ

۱۳۹۱/۴/۲۱

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل **پایان‌نامه کارشناسی ارشد** نگارنده در رشته **بیوتکنولوژی پزشکی** است که در سال **۱۳۹۱** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر مهدی فروزنده مقدم** ، از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ٤ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ٥ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ٤ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ٦ : اینجانب **عطیه غمناک** دانشجوی رشته **بیوتکونولوژی پزشکی** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی عطیه غمناک

تاریخ و امضا

۱۳۹۱/۴/۲۱

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه

دوره کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی پزشکی

عنوان

بررسی بیان miR-21 در سلول‌های بنیادی سرطان سینه در انسان

نگارش

عطیه غمناک

استاد راهنما

دکتر مهدی فروزنده مقدم

تابستان ۱۳۹۱

تقدیم به :

پدر و مادر عزیز و بزرگوارم و همسر مهربان و صبورم.

تشکر و قدردانی

تشکر می‌کنم از استاد ارجمندم جناب آقای دکتر مهدی فروزنده مقدم و همه‌ی دوستانی که به نوعی مرا در این پروژه همراهی و یاری کردند.
تشکر ویژه از سرکار خانم دکتر ماریا هاشمیان خسروشاهی که لطف بی‌دریغشان باعث پیشرفت کار من در این مطالعه گردید.

چکیده

سلول‌های آغازگر سرطان سینه اخیراً با فنوتیپ $CD44^{+}CD24^{-}$ مشخص شده‌اند که منحصراً فعالیت تومورزایی را حفظ کرده و خواص شبه سلول بنیادی را نشان می‌دهند. این سلول‌ها زیرمجموعه‌ی کوچکی از سلول‌های توموری را تشکیل می‌دهند و مسئول آغاز تومور، پیشرفت و عود آن هستند. علاوه بر این نسبت به درمان‌های رایج سرطان مانند شیمی‌درمانی و رادیودرمانی مقاوند. اگر بتوان ویژگی این سلول‌ها را به طور کامل مشخص کرد، شاید بشود راه‌های درمانی دائمی برای سرطان پیدا کرد. به همین منظور تلاش می‌شود که مارکرهای بیشتری برای سلول‌های بنیادی سرطانی یافت شود. در این مطالعه بیان miR-21 در این سلول‌ها بررسی می‌شود که تنظیم‌کننده‌ی اصلی متاستاز است و بیان آن در بسیاری از سرطان‌ها از جمله سرطان سینه افزایش می‌یابد.

ابتدا سلول‌های $CD44^{+}CD24^{-}$ از توده‌ی توموری سرطان سینه توسط روش‌های FACS و MACS جدا شدند. سپس در محیط اختصاصی بدون سرم و پلیت‌های کشت سلولی غیرچسبنده کشت داده شدند و هر هفته پاساژ داده شدند تا مَموسفیرها تشکیل شوند. بعد از تشکیل، RNA کل و miRNA این سلول‌ها استخراج شد تا از روی آن‌ها cDNA استخراج شود. بررسی بیان ژن‌های survivin و oct-4 توسط real-time PCR تأیید بیشتری بر این بود که این سلول‌ها خاصیت سلول‌های بنیادی سرطانی را دارند. سپس بیان miR-21 در آن‌ها سنجیده شد.

با توجه به بررسی‌های انجام شده مشخص شده که سلول‌های $CD44^{+}CD24^{-}$ جدا شده از تومور می‌توانند تا ۳ هفته در شرایط اختصاصی رشد صعودی داشته باشند. وقتی میزان بیان ژن‌های survivin و oct-4 در آن‌ها سنجیده شد، مشخص شد که بیان این ژن‌ها در این سلول‌ها نسبت به گروه‌های کنترل افزایش چشم‌گیری داشته است. سپس توسط real-time PCR بیان miR-21 سنجیده شد که نسبت به گروه‌های کنترل بیشتر بود. با توجه به این نتایج شاید بتوان در آینده این مولکول را به عنوان مارکری برای سلول‌های بنیادی سرطان سینه در ا نسان معرفی کرد.

کلمات کلیدی: سلول بنیادی سرطانی، سلول‌های $CD44^{+}CD24^{-}$، miR-21

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته..... ۱

۱-۱. سلول های بنیادی سرطانی..... ۲

۱-۱-۱. تاریخچه‌ی سلول‌های بنیادی سرطانی..... ۲

۱-۱-۲. نظریه‌های شکل‌گیری سرطان..... ۲

۱-۱-۲-۱. نظریه‌ی اتفاقی..... ۳

۱-۱-۲-۲. مدل سلسله مراتبی..... ٤

۱-۱-۳. منشأ سلول‌های بنیادی سرطانی..... ٦

۱-۱-٤. آشیانه سلول‌های بنیادی..... ۸

۱-۱-۵. شناسایی و جداسازی سلول‌های بنیادی نرمال و سرطانی در شیشه..... ۹

۱-۱-۵-۱. جمعیت جانبی..... ۹

۱-۱-۵-۲. تشکیل مَموسفیِر..... ۱۱

۱-۱-۵-۳. مارکرهای ESA^{+} $CD24^{-/low}$ $CD44^{+}$ و CD133..... ۱۲

۱-۱-۵-٤. فعالیت آلدهید دهیدروژناز..... ۱٤

۱-۱-٦. نظریه‌ی سلول‌های بنیادی سرطانی و مقاومت دارویی چندگانه..... ۱٦

۱-۲. miRNA..... ۱٦

۱-۲-۱. miRNA اینترونی..... ۱۸

۱-۲-۲. پیدایش و مکانیسم عمل miRNA..... ۱۹

۱-۲-۳. روش‌های تعیین کمی miRNAها..... ۲۲

۱-۲-۳-۱. Stem-Loop RT-PCR..... ۲۳

۱-۲-۳-۲. PCR با استفاده از سیستم آشکارسازی SYBR® Green وپرایمرهای مبتنی بر LNA..... ۲۳

۱-۲-٤. miR-21 ..... ۲٦
۱-۳. هدف از این تحقیق ۲۷
۱-٤.کورکومین ۲۷
۱-۵. پرتودرمانی و سلول‌های بنیادی سرطان سینه ۲۹
۱-٦. اساس تست MTT ۳۰
فصل دوم: مواد و روش‌ها ۳۱
۲-۱. وسایل ۳۲
۲-۲. دستگاه‌ها ۳۲
۲-۳. مواد ۳۳
۲-۳-۱. مواد بخش سلولی ۳۳
۲-۳-۱-۱. مواد مورد نیاز برای سلول های BCSC ۳۳
۲-۳-۱-۲. مواد مورد نیاز برای رده‌های سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 ..... ۳٦
۲-۳-۱-۳. مواد مورد نیاز برای فلوسایتومتری و FACS ۳۷
۲-۳-۱-٤. مواد مورد نیاز برای جداسازی سلول‌ها با استفاده از ستون MACS ۳۹
۲-۳-۱-۵. مواد مورد نیاز برای انجام تست MTT ۳۹
۲-۳-۲. مواد بخش مولکولی ٤۰
۲-۳-۲-۱. مواد مورد نیاز برای تخلیص RNA ٤۰
۲-۳-۲-۲. مواد مورد نیاز برای تیمار DNase ٤۰
۲-۳-۲-۳. مواد مورد نیاز برای تخلیص miRNA ٤۰
۲-۳-۲-٤. مواد مورد نیاز برای سنتز cDNA ٤۱
۲-۳-۲-۵. مواد مورد نیاز جهت سنتز cDNA از miRNA ٤۱
۲-۳-۲-٦. مواد مورد نیاز برای واکنش RT-PCR ٤۲
۲-۳-۲-۷. مواد مورد نیاز برای واکنش real time PCR ٤٤

۲-۳-۲-۸. مواد مورد نیاز برای الکتروفورز ٤٥
۲-۳-۲-۹. مواد مورد نیاز برای واکنش Real-Time PCR مربوط به miRNA ٤٦
۲-٤. روش‌ها ٤٧
۲-٤-۱. بخش سلولی ٤٧
۲-٤-۱-۱. انتقال نمونه‌های بافت توموری و نرمال سینه از بیمارستان به آزمایشگاه ٤٧
۲-٤-۱-۲. هضم آنزیمی و مکانیکی نمونه‌های بافتی و به دست آوردن سلول تک ٤٧
۲-٤-۱-۳. جداسازی سلول‌های $CD44^{+}CD24^{-}$ با استفاده از ستون MACS ٤٩
۲-٤-۱-٤. ایمونوفنوتایپ تأییدی با روش فلوسایتومتری ٥٠
۲-٤-۱-٥. جداسازی سلول‌های $CD44^{+}CD24^{-}$ با استفاده از FACS ٥١
۲-٤-۱-٦. کشت و پاساژ سلول‌های $CD44^{+}CD24^{-}$ ٥١
۲-٤-۱-۷. دیفریز کردن سلول‌های MCF-7 و MDA-MB-231 ..... ٥٢
۲-٤-۱-۸. پاساژ و کشت سلول‌های MCF-7 ..... ٥٢
۲-٤-۱-۹. پاساژ و کشت سلول‌های MDA-MB-231 ..... ٥٣
۲-٤-۱-۱۰. تست MTT ٥٣
۲-٤-۲. روش‌های بخش مولکولی ٥٤
۲-٤-۲-۱. تخلیص RNA ٥٤
۲-٤-۲-۲. تخلیص miRNA ٥٥
۲-٤-۲-۳. الکتروفورز RNA ٥٦
۲-٤-۲-٤. اندازه گیری RNA کل (توتال) ٥٦
۲-٤-۲-٥. پروتوکل تیمار DNase ٥٧
۲-٤-۲-٦. پروتوکل سنتز cDNA ٥٧
۲-٤-۲-۷. سنتز cDNA از miRNA ٥٨
فصل سوم: نتایج و یافته‌ها ٦٥

۳-۱. جداسازی سلول‌های بنیادی سرطان سینه..... ٦٦
۳-۱-۱. جداسازی سلول‌های بنیادی سرطانی توسط MACS وکشت آن‌ها..... ٦٧
۳-۱-۱-۱. نتایج فلوسایتومتری سلول‌های جداشده توسط MACS..... ٦٨
۳-۱-۱-۲. کشت سلول‌های $CD44^{+}CD24^{-}$ حاصل از MACS..... ٦٩
۳-۱-۲. جداسازی سلول‌های بنیادی سرطانی توسط FACS وکشت آن‌ها..... ۷۰
۳-۱-۳. بررسی درصد فنوتیپ سلولی $CD44^{+}CD24^{-}$ در رده های سلولی مرتبط با سرطان سینه و سلول‌های نرمال بافت پستان توسط فلوسایتومتری..... ۷۲
۳-۲. استخراج RNA..... ۷٤
۳-۳. cDNA سازی..... ۷٥
٤-۳. نتایج حاصل از بهینه سازی RT-PCR..... ۷٦
۳-٥. بررسی بیان ژن‌های survivin و oct-4 با استفاده از Real-Time PCR..... ۷۷
۳-٥-۱. منحنی استاندارد..... ۷۸
۳-٥-۲. نتایج حاصل از real time PCR مربوط به نمونه‌های مورد آزمایش..... ۸۰
۳-٦-بررسی بیان miR-21 با استفاده از Real-Time PCR..... ۸۲
۳-۷. تأثیر curcumin و تست MTT..... ۸٤
۳-۸. تأثیر پرتوزایی بر روی سلول‌های بنیادی سرطان سینه..... ۸۷
فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها..... ۹۰
٤-۱.بحث..... ۹۱
٤-۲. نتیجه‌گیری..... ۹٥
٤-۳. پیشنهادات..... ۱۰۱
فهرست منابع..... ۱۰۳
چکیده‌ی انگلیسی..... ۱۱۲

فهرست جداول

جدول ۲- ۱. مواد مورد نیاز برای تهیه بافر PBS..... ۳۸

جدول ۲- ۲. مواد مورد نیاز برای sorting buffer..... ۳۸

جدول ۲- ۳. ویژگی‌های پرایمرهای ژن β-actin..... ٤۳

جدول ۲- ٤. ویژگی‌های مربوط به پرایمرهای ژن oct-4..... ٤٤

جدول ۲- ٥. ویژگی‌های پرایمرهای مربوط به ژن survivin..... ٤٤

جدول ۲- ٦. مواد لازم جهت سنتز cDNA از miRNA..... ٥۹

جدول ۲- ۷. مقدار مواد مورد نیاز برای واکنش PCR ژن بتا اکتین..... ٦۱

جدول ۲- ۸. مقدار مواد مورد نیاز برای واکنش PCR ژن oct-4..... ٦۱

جدول ۲- ۹. مقدار مواد مورد نیاز برای واکنش PCR ژن survivin..... ٦۲

جدول ۲- ۱۰.مقدار مواد لازم جهت واکنش PCR مربوط به cDNA حاصل از miRNA..... ٦۳

فهرست نمودارها

نمودار۳– ۱. روند رشد جمعیت سلولی $CD44^{+}CD24^{-}$ تا هفته‌ی چهارم پس از خالص سازی در هر چاهک..... ۷۰

نمودار۳– ۲. روند رشد جمعیت سلولی $CD44^{+}CD24^{-}$ تا هفته‌ی چهارم پس از خالص سازی در هر چاهک..... ۷۲

نمودار۳– ۳. مقایسه‌ی جمعیت سلولی $CD44^{+}CD24^{-}$ در گروه‌های سلولی کنترل و سلول‌های تومـوری جدا شده توسط روش‌های FACS و MACS..... ۷٤

نمودار۳– ٤. مقایسه‌ی نسبت بیان ژن survivin در گروه‌های مختلف سلولی..... ۸۱

نمودار۳– ۵. مقایسه‌ی نسبت بیان ژن4-oct در گروه‌های مختلف سلولی..... ۸۲

نمودار۳– ٦. مقایسه‌ی بیان miR-21 در گروه‌های سلولی مختلف..... ۸٤

نمودار۳– ۷. نتایج تست MTT حاصل از تأثیرغلظت‌های مختلف کورکومین بر سلول‌های بنیادی سرطان سینه در زمان‌های مختلف..... ۸٦

نمودار۳– ۸. نتایج تست MTT حاصل از تأثیر غلظت‌های مختلف کورکومین بر سلول‌های رده‌ی سلولی MDA-MB-231 در زمان‌ها مختلف..... ۸٦

نمودار۳– ۹. نتایج تست MTT حاصل از تأثیر غلظت های مختلف کورکومین بر روی سلول های رده‌ی سلولی MCF-7 در زمان‌های مختلف..... ۸۷

نمودار۳– ۱۰. درصد سلول‌های زنده در زمان صفر پس از پرتودهی..... ۸۸

نمودار۳– ۱۱. درصد سلول‌های زنده پس از گذشت ٤۸ساعت از پرتودهی..... ۸۹

نمودار۳– ۱۲. درصد سلول‌های زنده پس از گذشت ۷۲ساعت از پرتودهی..... ۸۹

فهرست شکل‌ها

شکل ۱- ۱. شکل ساده ای از نقش سلول‌های بنیادی در تکامل پستان نرمال و تومورزایی ۸
شکل ۱- ۲. مقایسه‌ی پیدایش و مکانیسم عمل RNA تداخل‌گر در siRNA، miRNA بین ژنی(اگزونی) و miRNA اینترونی..... ۲۲
شکل ۱- ۳. شمای کلی برای روش TaqMan miRNA PCR..... ۲٤
شکل ۱- ٤. طرح کلی از سیستم miRCURY LNA microRNA PCR..... ۲٦
شکل ۱- ٥. اثر مهاری کورکومین بر روی سرطان‌های مختلف..... ۲۸
شکل ۲- ۱. تصویری از باندهای Ladder روی ژل آگارز..... ٤٦
شکل ۲- ۲. تصویری از ستون های جداسازی متعلق به شرکت Miltenyi Biotech..... ٤۹
شکل ۳-۱. تغییر درصد جمعیت سلولی $CD44^{+}CD24^{-}$ قبل و بعد از جداسازی توسط MACS..... ٦۸
شکل ۳-۲. تفاوت در گوناگونی سلول های جدا شده از بافت تومور سینه قبل و بعد از انجام MACS. ٦۹
شکل ۳-۳. نتایج مربوط به جداسازی جمعیت سلولی $CD44^{+}CD24^{-}$ توسط FACS..... ۷۱
شکل ۳-٤. رشد سلول‌های $CD44^{+}CD24^{-}$ به عنوان مموسفیر در محیط کشت اختصاصی mammoCult..... ۷۲
شکل ۳-٥. مقایسه‌ی درصد $CD44^{+}CD24^{-}$ در گروه های سلولی مختلف ۷۳
شکل ۳-٦. RNA تخلیص شده روی ژل آگارز..... ۷٥
شکل ۳-۷. وجود باند ۱۳۱ جفت بازی بتا-اکتین نشان‌دهنده‌ی وجود cDNA می‌باشد..... ۷٦
شکل ۳-۸. منحنی melting برای محصول PCR حاصل از پرایمرهای miR-191..... ۷٦
شکل ۳-۹. تصویری از بهینه سازی شرایط PCR برای ژن survivin..... ۷۷
شکل ۳-۱۰. تصویری از بهینه سازی شرایط PCR برای ژن oct-4..... ۷۷
شکل ۳-۱۱. نتایج مربوط به real-time PCR ژن بتا-اکتین..... ۸۰

شکل ۳-۱۲. نتایج مربوط به real-time PCR ژن survivin. A) فواصل منظم نشان‌دهنده رابطه Ct با مقدار الگو اولیه است..... ۷۹
شکل ۳-۱۳. نتایج مربوط به real-time PCR ژن oct-4..... ۸۰
شکل ۳-۱٤. نتایج real-time PCR مربوط به miR-191..... ۸۳
شکل ۳-۱۵.نتایج real-time PCR مربوط به miR-21..... ۸۳

فصل اول

مقدمه و

مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱. سلول های بنیادی سرطانی[1]

۱-۱-۱. تاریخچه‌ی سلول‌های بنیادی سرطانی

ایده‌ی سلول‌های بنیادی سرطانی برمی‌گردد به دهه‌ی ۱۹۵۰ هنگامی کـه مطالعـات، سـلول‌هـای بنیادی را در سرطان ژرمینال(تراتوکارسینوما) مشخص کرد. گرین[2] نشان داد که بافت جنینی یا بافت سرطانی در نواحی دارای ایمنی موش رشد می‌کنند در حالی که بافت نرمال نمی تواند رشد کند [۱]. مطالعات رقیق‌سازی نشان داد که سـلول‌هـای آغـازگر تومـور[3] بـا فراوانـی ۱/۳۰ تـا ۱/۱۰۰۰ یافـت می‌شوند. این نتایج مشابه تعداد سلول‌هایی است که در شیمی درمـانی بـاقی مـی‌مانـد. چنـدی بعـد سالمون[4] و همکارانش یافتند که در آدنوکارسینوما نسبت سلول‌های آغازگرتومور به سلول‌های نرمال توموری بین ۱/۱۰۰۰ تا ۱/۱۰۰۰۰۰ می باشد[۲]. هم‌چنین این سـلول‌هـا مـی‌تواننـد در آگـار کلـونی تشکیل دهند[۳].

۱-۱-۲. نظریه‌های شکل‌گیری سرطان

قبل از بحث درباره‌ی نظریه‌های شکل‌گیری سرطان، مهم است که درباره‌ی انواع جهش‌هایی کـه نیاز است تا در یک سلول نرمال رخ دهد در راستای این که یک سلول سرطانی شود صـحبت کنـیم. این موارد غالباً شامل مکانیسم‌هایی برای سلول هستند تـا بتوانـد از آپوپتـوز فـرار کنـد، بـی نیـاز از علامت‌های رشد باشد، پتانسیل تقسیم نامحدود داشته باشد، رگ‌سازی را تقویت کند و متاستاز انجام

[1] Cancer Stem Cells
[2] Green
[3] Tumor initiating cells
[4] Salmon

دهد[٤]. یک سلول باید این صفات را داشته باشد تا بتواند سرطانی شود. معمولاً این اتفـاق هنگـامی رخ می‌دهد که تنظیمات مسیرهای علامت‌دهی مرتبط با عمل سلول به هم می‌خورد[٤].

۱-۱-۲-۱. نظریه‌ی اتفاقی[1]

در مدل قدیمی ایجاد سرطان(بیشتر اوقات مدل اتفاقی خوانده مـی شـود)، سـرطان بـر اسـاس سریالی از جهش‌ها ایجاد می شود که خود توسط عوامل محیطی و دیگر عوامل به وجود مـی‌آینـد و باعث ناپایداری ژنتیکی می گردند[۵]. این مدل توضیح می دهد که جهش‌ها می توانند در هر سلولی رخ دهند و سلول به دلیل تغییر ژنتیکی ایجاد شده، ترانسفورمه نامیده می‌شود[٦]. همچنین این مـدل توضیح می‌دهد که تومور به‌طور نسبی همگن است و مسیرهایی در همه‌ی سلول‌ها وجود دارنـد کـه می‌توانند سلول را به سمت سرطانی شدن پیش ببرند. بنابراین مشکل بتوان سلولی را که دقیقاً منشأ به وجود آمدن یک سرطان خاص است شناسایی کرد زیرا در واقع برای هر سلول در یک تومور خاص احتمال یکسانی وجود دارد که منشأ آن تومور باشند.

مدل دیگری که وابسته به مدل اتفاقی است، مدل تکامل کلونی[2] می‌باشد. در این مدل، سلول‌های خاصی فرصت نجات می‌یابند(به دلیل جهش‌ها). این سلول‌ها انتخاب خواهند شد و نجات خواهنـد یافت در حالی که سلول‌های عادی می‌میرند. سلول‌های جهش یافته، سلول‌های دختر را تولید می‌کنند که منجر به رشد تومور می‌شوند. ناهمگن بودن تومور به دلیـل تمـایز نابجـا، نوسـان اپـی‌ژنتیکـی و اختلاف در ریز محیط‌هاست.

ولی مدل اتفاقی نمی‌تواند بعضی از جنبه‌های تومورها را توضیح دهد.۱) جهش‌های بسیاری لازم است تا یک سلول را ترانسفورم کند و این قضیه نیاز به زمانی بیشـتر از دوره‌ی زنـدگی یـک سـلول عادی دارد.۲) اگر تومور از یک سلول ترانسفورم شده ایجاد شده باشد، سرطان‌ها باید همگن باشـند. ولی به خوبی مشخص شده است که تومورهای سینه بسیار ناهمگن می‌باشند.۳) باوجود درمـانی کـه

[1] Stochastic model
[2] Clonal evolution

تومور را کاملاً از بین برده باشد سرطان‌ها می‌توانند عود کنند. این دلالت دارد بر این که سلول‌های سرطانی بسیار تومورزا می‌توانند از مرگ بر اثر شیمی‌درمانی و رادیودرمانی فرار کنند. این سلول‌ها می توانند بعدتر تکثیر پیدا کنند و باعث عود یا متاستاز شوند. همان‌طور که در پایین بحث می‌شود، نظریه‌ی سلول‌های بنیادی سرطانی به وجود آمد تا این مطالب را توضیح دهد.

۱-۱-۲-۲. مدل سلسله مراتبی[1]

مدل دیگر برای رشد تومور مدل سلول‌های بنیادی سرطانی است که به عنوان مدل سلسله مراتبی نیز خوانده می‌شود. این مدل بیان می‌کند که زیرمجموعه‌ای از سلول‌های توموری که CSCها خوانده می‌شوند، ممکن است که مسئول آغاز و عود سرطان باشند[۷]. این سلول‌ها می توانند خود را تجدید کنند و تمایز یابند که به این دلیل می‌توانند مسئول ناهمگن بودن تومور نیز باشند. خود تجدید کردن[2] بنا به تعریف عبارت است از توانایی تولید رونوشت عین یک سلول که قدرت یکسانی را در تکثیر شدن، تمایز و توسعه یافتن در مقایسه با سلول والد دارد[۸]. سلول‌های اجدادی[3] یا سلول‌های کامل تمایز یافته در تومور این توانایی را ندارند. CSCها ویژگی‌های متعدد دیگری را نسبت به سلول‌های بافت نرمال نشان می‌دهند که شامل تکثیر نامحدود، تقسیم آهسته، و تولید سلول‌های دختری که دستخوش تمایزهای متفاوتی می‌شوند، می‌باشد. سلول‌های دختری توده‌ی توموری را می‌سازند و غیر تومورزا می‌باشند در حالی که سلول‌های بنیادی سرطانی تومورزا هستند و یک بخش کوچکی از تومور را تشکیل می دهند. CSCها هم‌چنین توانایی تکثیر نامحدود دارند. فرض بر این است که این سلول‌ها می توانند از کشته شدن در برابر روش‌های درمانی معمول به وسیله‌ی برخی خواصی که سلول‌های بنیادی نرمال را در برابر این عوامل حفظ می‌کند، فرار کنند. به عنوان مثال درمان‌های متداول بیشتر اوقات رشد سریع سلول‌ها را هدف قرار می دهند؛ اما در مورد CSCها، مانند سلول‌های بنیادی نرمال این باور وجود دارد که به آهستگی تقسیم می‌شوند و حتی می توانند به فاز

[1] Hierarchical model
[2] Self- renewal
[3] Progenitor cells