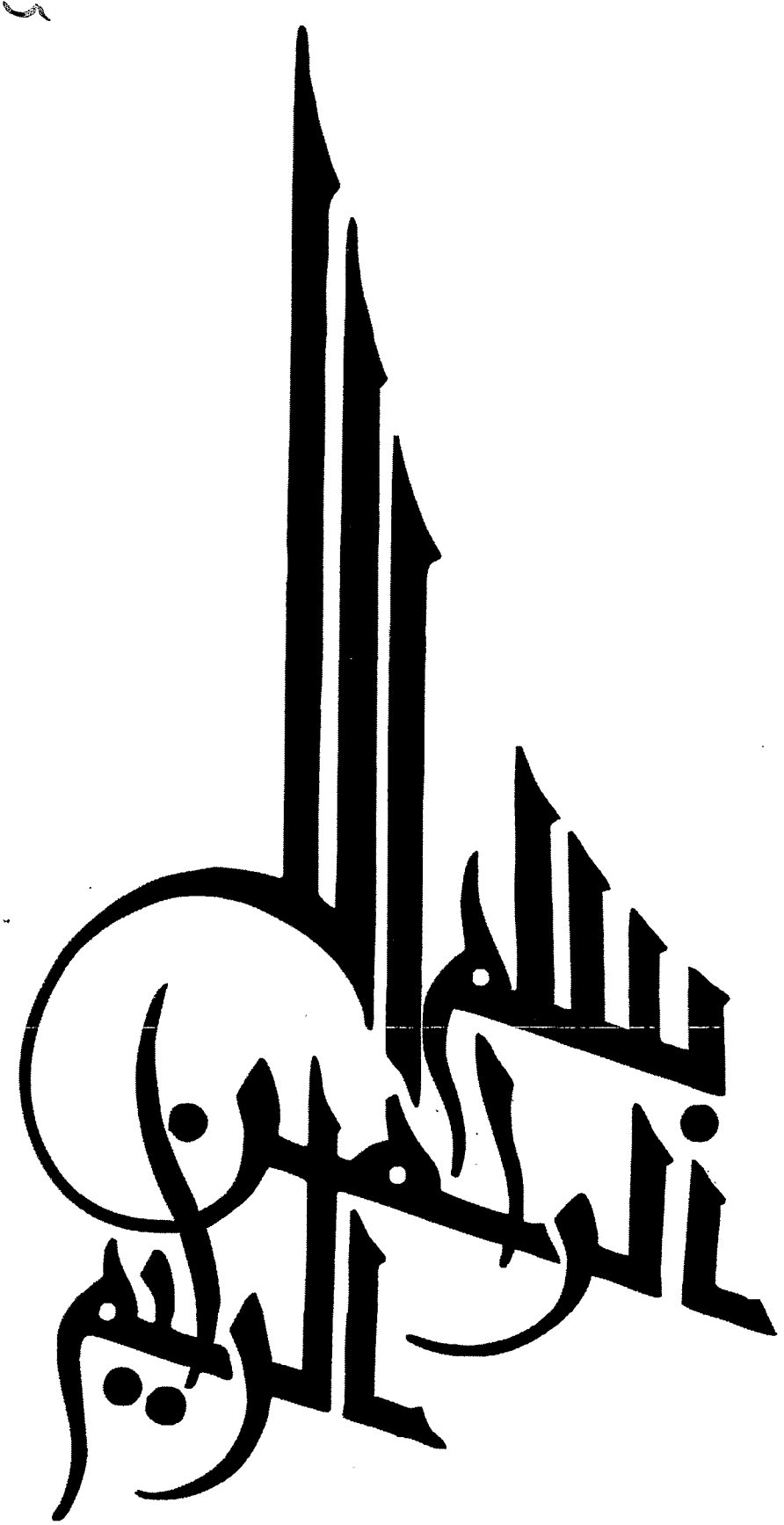
٩٥ ـ



١١٤٢٨٥ ـ ٢٠١٢١٩

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی

عنوان

ساخت و بررسی پلی پلکس‌های هدفمند شده با نانوبادی علیه MUC1 حاوی سازه‌ی ژنی HRE/ERE – pMUC1-tBid

نگارش
الهام صادق‌زاده

استاد راهنما
سرکار خانم دکتر فاطمه رهبری‌زاده

استادان مشاور
جناب آقای دکتر محمدجواد رسایی

۱۳۸۸/۴/ ۱

زمستان ۱۳۸۷

۱۱۴۶۵۰

«فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان‌نامه کارشناسی ارشد»

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم الهام صادق زاده رشته: بیوتکنولوژی پزشکی گرایش: – ---- تقدیم می‌شود. اینجانبان نسخهٔ نهائی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوی بررسی و تأیید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجهٔ کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنیم.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

دکتر فاطمه رهبری زاده (استاد راهنما)

دکتر محمدجواد رسایی (استاد مشاور)

دکتر مهدی فروزنده مقدم (استاد ناظر)

دکتر محمدحسین صنعتی (استاد ناظر)

دکتر حسین عبدل تهرانی (نماینده تحصیلات تکمیلی)

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 ۱۳۸۷ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی "سرکار خانم دکتر فاطمه رهبری‌زاده" و مشاوره جناب آقایان "دکتر محمدجواد رسایی" و "دکتر سید معین مقیمی" 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 ۴ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت 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 ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب الهام صادق‌زاده دانشجوی رشته بیوتکنولوژی پزشکی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی الهام صادق‌زاده

تاریخ و امضا ۸۸/۴/۳

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

با عنایت به سیاست‌های پژوهشی 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 هیات 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 ذیل را رعایت نمایند:

ماده ۱ : حقوق مادی و معنوی پایان‌نامه‌ها / رساله‌های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هرگونه بهره‌برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین‌نامه‌ها و دستورالعمل‌های مصوب دانشگاه باشد.

ماده ۲ : انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه / رساله به‌صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی می‌باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما نویسنده مسئول مقاله باشند.

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

ماده ۳ : انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان‌نامه / رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و براساس آیین‌نامه‌های مصوب انجام می‌شود.

ماده ۴ : ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه 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 حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵ : این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸۴/۴/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم‌الاجرا است و هرگونه تخلف از مفاد این دستورالعمل، از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

تقدیم به

میهنم

ایران

هم میهنم

ایرانی

سپاسگزارم از:

- *یگانه ایزد هستی* که گام‌های ما را همیشه در مسیر درست رهنمون می‌شود
- اساتید ارجمندم *سرکار خانم دکتر رهبری‌زاده* و *جناب آقایان دکتر رسایی و دکتر مقیمی*، که بدون راهنمایی‌شان تکمیل این پایان‌نامه غیرممکن بود
- معلم سال اول ابتدایی‌ام، *مرحومه سرکار خانم هاشمی*، که مرا در برداشتن مشکل‌ترین گام تحصیلیم یاری کردند
- تمامی کسانی که به نوعی چیزی به من آموختند، حتی اگر به اندازه‌ی یک کلمه
- *عزیزترینم*، که بی‌پشتیبانی‌اش نه آغازی برای این کار متصور بودم و نه انجامی
- دوست عزیزم، *سرکار خانم جعفری*، که موهبتشان بی‌دریغ نصیب همگان می‌شود
- *جناب آقای کروندیان*، که همیشه سعی در رفع مشکلات مسیر انجام کار داشتند

چکیده

شیوه‌های مرسوم درمان سرطان بر ریشه‌کن کردن سلول‌های توموری، از طریق شیمی‌درمانی و رادیوتراپی، و فعال‌سازی سیستم ایمنی برای از بین بردن سلول‌های توموری تاکید دارد. با آنکه این شیوه‌های درمانی در برخی سرطان‌ها پاسخ خوبی داشته است، لازم است درمان‌های اختصاصی‌تری برای بیمارانی که به درمان‌های معمول پاسخ نمی‌دهند، ابداع شود. به علاوه باید از آسیب بافت‌های نرمال، که به دنبال درمان‌های معمول ایجاد می‌شود، پیشگیری کرد. درمان‌های هدفمند با داروهای شیمیایی یا ژن‌های کشنده‌ی سلول رویکردی جدید در درمان سرطان است. در درمان با ژن‌های کشنده‌ی سلول، ژن کدکننده‌ی یکی از پروتئین‌های مسیرهای آپوپتوز به محل تومور تحویل داده می‌شود. مهم‌ترین مشکل در این راه اطمینان یافتن از فعال شدن این ژن در محل تومور است. به همین منظور یا باید از عناصر تنظیمی وابسته به ریزمحیط تومور استفاده کرد یا ژن را به طریق هدفمند وارد سلول‌های توموری کرد. انتقال هدفمند داروها و ژن‌ها با تولید آنتی‌بادی در آزمایشگاه محقق شد. آنتی‌بادی‌های تک‌دومنی به طور طبیعی بخشی از ایمنی هومورال شتر است و به دلیل اندازه‌ی نانومتری به نانوبادی معروفند. در این تحقیق با استفاده از panning یک کتابخانه‌ی ایمن شتری موفق به جدا کردن یک نانوبادی اختصاصی علیه MUC1 شدیم.

یافتن مارکرهای سلولی که فقط برروی سلول‌های سرطانی بیان شود، قدم بعدی در هدفمند کردن حامل-های ژن‌درمانی است. مارکرهای متعددی با کاربردهای درمانی و تشخیصی وجود دارند. MUC1 یکی از این تومورمارکرها است که در سرطان‌های سلول‌های اپیتلیال (سینه، کولون و ...) بیان بالایی دارد، و می‌توان از آن به عنوان یک مولکول هدفگیری بر سطح سلول‌های توموری استفاده کرد.

انتخاب حامل دارو یا ژن مشکل دیگری در انتقال هدفمند آنها است. وکتورهای ویروسی سال‌ها است برای انتقال ژن به کار رفته‌اند اما به دلیل برخی نگرانی‌ها از نظر سلامت بیماران، وکتورهای غیرویروسی بیشتر مورد توجه قرار گرفتند. در میان حامل‌های غیرویروسی، پلی‌اتیلن‌ایمین (PEI) بیشترین کاربرد را داشته است. بار سطحی مثبت بالای این پلیمر به راحتی ژن‌ها را، با داشتن زنجیره‌ی فسفات، مجتمع می‌کند. البته داشتن بار مثبت سطحی استفاده از این حامل را در موجود زنده غیرممکن می‌سازد، چون این نانوحامل‌ها به سرعت از جریان خون پاک می-شوند. پوشاندن این پلی‌پلکس‌ها با یک پلیمر خنثی، مثل پلی‌اتیلن گلیکول (PEG)، باعث کاهش شناسایی این ذرات توسط سیستم رتیکولواندوتلیال می‌شود و مدت گردش پلی‌پلکس‌ها را در جریان خون افزایش می‌دهد. در این تحقیق ما از نانوذرات حاوی سازه‌ی ژنی HRE/ERE – pMUC1 – tBid و نانوذرات PEI – PEG هدفمند شده با نانوبادی آنتی MUC1 استفاده کردیم و نانوذره‌ی حاصل در شش رده‌ی سلولی سرطانی و نرمال تست شد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد نانوذره‌ی حاصل توانایی بسیار خوبی در هدایت سازه‌ی HRE/ERE – pMUC1 – tBid (سازه‌ی حاوی ژن کد کشنده‌ی سلول با هدایت رونویسی) به سلول‌های سرطانی دارد به گونه-ای که بیان ژن کشنده در سلول‌های نرمال دیده نشد.

واژگان کلیدی: نانوذره، PEI، PEG، نانوبادی، پلی‌پلکس

چکیده	۱
۱- مقدمه	۲
۱-۱ ژن درمانی	۳
۱-۲ حامل ها	۴
۱-۲-۱ حامل های ویروسی	۵
۱-۲-۱-۱ آدنوویروس ها	۵
۱-۲-۱-۲ سیستم های حامل رتروویروسی و لنتی ویروسی	۶
انکورتروویروس ها	۷
لنتی ویروس ها	۷
۱-۲-۱-۳ ویروس آبله (واکسینیا) و پاکس ویروس ها	۸
۱-۲-۱-۴ ویروس هرپس سیمپلکس	۹
۱-۲-۱-۵ ویروس استوماتیت وزیکولار و RNA ویروس ها	۱۰
۱-۲-۱-۶ پاروویروس ها	۱۲
۱-۲-۱-۷ مزایا و معایب سیستم های حامل ویروسی	۱۳
۱-۲-۲ حامل های غیرویروسی	۱۵
۱-۲-۲-۱ تزریق DNA لخت	۱۵
۱-۲-۲-۲ انتقال ژن با استفاده از نیروهای فیزیکی	۱۶
انتقال ژن با تفنگ ژنی	۱۶
الکتروپوریشن	۱۶
انتقال ژن با کمک امواج اولتراسوند	۱۷
انتقال هیدرودینامیک ژن	۱۷
۱-۲-۲-۳ نانوحامل ها	۱۸
لیپیدهای کاتیونی و لیپوزوم ها	۲۴
انتقال ژن به وسیله‌ی پلیمرهای کاتیونی	۲۸

پلیمرهای biodegradable ۲۹
پلی‌ایمیدازول و پلیمرهای وابسته ۲۹
پلی β – آمینواسترها ۳۱
پلی‌استرهای کاتیونی ۳۱
پلی‌ساکاریدهای کاتیونی ۳۳
پلیمرهای non-biodegradable ۳۳
پلی L – لیزین (PLL) ۳۳
پلی‌اتیلن ایمین (PEI) ۳۵
۱-۳ پوشش‌دهی (coating) با پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) ۴۰
۱-۴ ایمونولوژی سرطان ۴۴
۱-۴-۱ موسین ۱ (MUC1) ۴۷
۱-۵ هدفمند کردن نانوحامل‌ها ۵۰
۱-۵-۱ هدفگیری غیرفعال (passive targeting) ۵۱
۱-۵-۱-۱ عروق ناقص ۵۱
۱-۵-۱-۲ محیط بافت توموری ۵۲
۱-۵-۱-۳ تجویز موضعی دارو ۵۲
۱-۵-۲ هدفگیری فعال (active targeting) ۵۳
۱-۵-۲-۱ هدفگیری با واسطه‌ی کربوهیدرات ها ۵۳
۱-۵-۲-۲ هدفگیری با واسطه‌ی گیرنده و آنتی‌ژن ۵۳
خصوصیات لیگاندها و آنتی‌بادی‌ها ۵۴
آنتی‌بادی تک‌دومنی شتری ۵۵
خصوصیات گیرنده‌های سطحی سلول و آنتی‌ژن‌ها ۵۶
خصوصیات پلیمرهای حامل ۵۷
۱-۶ سازه‌ی ژنی کشنده‌ی سلول ۵۷

۲- مواد و روش‌ها ۵۸

۲-۱ مواد ۵۹

۲-۱-۱ بافرها ۵۹

۲-۱-۱-۱ بافر فسفات سالین (PBS) ۵۹

۲-۱-۱-۲ مخلوط PEG – NaCl 20% ۵۹

۲-۱-۱-۳ Tris – Cl ۵۹

۲-۱-۱-۴ بافر EIA ۶۰

۲-۱-۱-۵ بافر بلاکر الایزا ۶۰

۲-۱-۱-۶ محلول متوقف کننده‌ی واکنش الایزا ۶۰

۲-۱-۱-۷ معرف برادفورد ۶۰

۲-۱-۱-۸ بافرهای تخلیص پری‌پلاسمیک ۶۰

۲-۱-۱-۹ بافرهای ستون نیکل ۶۱

۲-۱-۱-۱۰ بافرهای SDS – PAGE ۶۱

۲-۱-۱-۱۱ بافر انتقال وسترن بلاتینگ ۶۳

۲-۱-۲ محیط‌های کشت ۶۳

۲-۱-۲-۱ محیط کشت Lauria Bertani (LB) ۶۳

۲-۱-۲-۲ محیط کشت LB آگار ۶۳

۲-۱-۲-۳ محیط کشت Super Broth (SB) ۶۴

۲-۱-۲-۴ محیط کشت 2XYT ۶۴

۲-۱-۲-۵ محیط کشت M9 ۶۴

۲-۱-۲-۶ محیط کشت TB ۶۵

۲-۲ تجهیزات مورد نیاز ۶۵

۲-۳ روش کار ۶۵

۲-۳-۱ تخلیص فاژمید دارای ژن مربوط به نانو بادی علیه MUC-1 از کتابخانه ی فاژمیدی شتر یک و دوکوهانه ایمن شده ۶۵
۲-۳-۱-۱ تکثیر و تخلیص فاژ کمکی M13K07 ۶۵
۲-۳-۱-۲ تکثیر کتابخانه‌ی اولیه ۶۶
۲-۳-۱-۳ panning پلی‌کلونال ۶۷
۲-۳-۱-۴ تیتراسیون ورودی‌ها و خروجی‌های مراحل panning ۶۸
۲-۳-۱-۵ فاژ الایزا ۶۸
۲-۳-۱-۶ panning مونوکلونال ۷۰
۲-۳-۱-۷ الایزای فاز محلول ۷۱
۲-۳-۱-۸ انتقال ژن نانوبادی علیه MUC – 1 به وکتور بیانی PJ ۷۱
۲-۳-۱-۹ ساب کلونینگ ۷۲
۲-۳-۲ تخلیص نانوبادی علیه MUC-1 با استفاده از ستون نیکل ۷۲
۲-۳-۲-۱ کشت انبوه باکتری حاوی نانوبادی علیه MUC – 1 کلون شده در وکتور PJ ۷۲
۲-۳-۲-۲ جداسازی پروتئین از پری‌پلاسم باکتری ۷۳
۲-۳-۲-۳ تخلیص پروتئین مورد نظر با استفاده از ستون نیکل ۷۴
تخلیص با کمک ستون نیکل ۷۴
۲-۳-۲-۴ وسترن بلاتینگ ۷۵
۲-۳-۴ تهیه‌ی نانوذرات پلی‌پلکس PEI/DNA ۷۶
۲-۳-۵ پوشاندن نانوذرات تهیه شده با heterobifunctional PEG (Mal – PEG – NHS) ۷۸
۲-۳-۶ اندازه‌گیری زتاپتانسیل پلی‌پلکس‌های هدفمند ۷۹
۲-۳-۷ تست تایید حضور پلاسمید در پلیپلکسهای ساخته شده DNA retardation assay ۷۹
۲-۳-۸ انتقال سازه ی ژنی tBid به داخل سلول های هدف و کنترل با نانوذرات پلی پلکس PEI ساخته شده ۸۰
۲-۳-۹ انتقال سازه‌ی ژنی tBid به داخل سلول‌های هدف و کنترل با لیپوفکتامین ۸۱

۲-۳-۱۰ شمارش سلول‌های زنده و مرده ۸۱

۲-۳-۱۱ انجام semiquantitative RT – PCR برای تایید ورود ژن tBid به سلول ۸۲

۳- نتایج ۸۳

۳-۱ تخلیص فاژمید دارای ژن مربوط به نانو بادی علیه MUC-1 از کتابخانه ی فاژمیدی شتر یک و دوکوهانه ایمن شده ۸۴

۳-۱-۱ تکثیر و تخلیص فاژ کمکی M13KO7 ۸۴

۳-۱-۲ تکثیر کتابخانه‌ی اولیه ۸۴

۳-۱-۳ panning پلی کلونال ۸۴

۳-۱-۳-۱ تیتراسیون ۸۴

۳-۱-۳-۲ نتایج فاژ الایزا ۸۵

۳-۱-۴ panning مونوکلونال ۸۵

۳-۱-۵ الایزای فاز محلول ۸۶

۳-۱-۶ ساب کلونینگ ۸۷

۳-۱-۷ تخلیص پروتئین مورد نظر با استفاده از ستون نیکل ۸۹

۳-۱-۸ وسترن بلاتینگ ۸۹

۳-۲ ساخت نانوذرات ۹۰

۳-۳ اندازه گیری زتا پتانسیل نانوذرات تهیه شده ۹۱

۳-۴ تست تایید حضور سازه در نانوذرات با DNA retardation assay ۹۲

۳-۵ ترانسفکشن سلول های هدف و شاهد با نانوذرات مسلح به سازه ی ژنی ۹۲

۳-۶ تایید عملکرد نانوذرات حاوی سازهی درمانی ۹۲

۳-۶-۱ شمارش سلول ها ۹۲

۳-۶-۲ بررسی عملکرد نانوذرات حاوی سازه ی درمانی در سطح رونویسی (نتایج semiquantitative RT – PCR) ۹۶

۴- بحث و نتیجه‌گیری ۱۱۰

۴-۱ پیشنهادها ۱۱۷

۵- منابع ۱۱۸

پیوست‌ها ۱۳۵

پیوست – ۱: نتایج الایزای panning مونوکلونال ۱۳۶

Abstract ۱۳۹

فهرست تصاویر و نمودارها

شکل۱-۱ - انواع نانوحامل‌ها ۱۹

شکل ۱-۲ - تصویری شماتیک از تئوری "اسفنج پروتونی" ۲۹

شکل ۱-۳ - تصویر شماتیک از برداشت سلولی و حرکت داخل سلولی پلی‌پلکس‌های پوشش‌دار هدفمند ۳۸

شکل ۱-۴ - شمایی از اتصالات کووالان برای اتصال لیگاندها به منظور هدفیابی فعال ۴۳

شکل ۱-۵ - تصویری شماتیک از پلی‌پلکس‌های DNA/PEI پوشانده شده با PEG با لیگاندهای هدفیاب متصل به آن برای انتقال هدفمند ژن به تومورها ۴۴

شکل ۱-۶ - سه مسیر تبدیل آنتی‌ژن‌های خودی به آنتی‌ژن‌های توموری ۴۵

شکل ۱-۷ - عوامل تحریک و سرکوب سیستم ایمنی در محیط اطراف تومور ۴۸

شکل۱-۸ - اثر EPR ۵۲

شکل ۱-۹ - تحویل ماده‌ی درمانی به روش هدفگیری فعال با واسطه‌ی لیگاند/آنتی‌بادی – گیرنده/آنتی‌ژن . ۵۴

شکل ۳-۱ - بخشی از نتایج sequencing کلون ۴۶ ۸۶

شکل ۳-۲ - خطی شدن پلاسمید ER46 پس از تاثیر آنزیم BpuA1 ۸۷

شکل ۳-۳ - نتایج ساب‌کلونینگ کلون 46 پس از ligation ۸۸

شکل۳-۴ - colony PCR تاییدی بر روی ساب‌کلون‌های ۷، ۸، ۱۴ و ۲۸ ۸۸

شکل۳-۵ - نتیجه‌ی SDS – PAGE پس از تخلیص پروتئین از ستون نیکل ۸۹

شکل ۳-۶ - نتیجه‌ی وسترن بلاتینگ ۸۹

شکل۳- ۷ - نانوذرات پلی‌پلکس PEI هدفمند شده با نانوبادی حاوی سازه‌ی ژنی HRE/ERE – pMUC1 – tBid ۹۰

شکل ۳- ۸ - نانوذرات پلی‌پلکس PEI پگیله و هدفمند شده با نانوبادی حاوی سازه‌ی ژنی HRE/ERE – pMUC1 – tBid ۹۰ .

شکل ۳- ۹ – میزان بار سطحی پلی‌پلکس‌های PEI هدفمند شده با نانوبادی آنتی MUC1 ۹۱

شکل ۳- ۱۰ – میزان بار سطحی پلی‌پلکس‌های PEI پگیله و هدفمند شده با نانوبادی آنتی MUC1 ۹۱

شکل ۳- ۱۱ - پلی‌پلکس PEI هدفمند شده PEI و پلی‌پلکس PEI پگیله شده‌ی هدفمند شده با نانوبادی آنتی MUC1 ۹۲

شکل۳- ۱۲ - تعداد سلول‌های مرده و زنده رده‌ی سلولی MCF7 ۹۳

شکل۳- ۱۳ - تعداد سلول‌های مرده و زنده رده‌ی سلولی T47D ۹۳

شکل ۳- ۱۴ – تعداد سلول‌های زنده و مرده‌ی رده‌ی HT29 ۹۴

شکل۳- ۱۵ - تعداد سلول‌ها مرده و زنده رده‌ی سلولی A431 ۹۴

شکل۳- ۱۶ - تعداد سلول‌ها مرده و زنده رده‌ی سلولی SKBR3 ۹۵

شکل۳- ۱۷ - تعداد سلول‌ها مرده و زنده رده‌ی سلولی NIH3T3 ۹۵

شکل ۳- ۱۸ - نتیجه‌ی RT - PCR بر روی سلول‌های نرمال ۹۶

شکل ۳- ۱۹ - نتیجه‌ی RT - PCR بر روی سلول‌ها پس از ترانسفکشن pCDNA Hygro $^{+}$ با استفاده از لیپوفکتامین ۹۶

شکل ۳- ۲۰ - نتیجه‌ی RT - PCR بر روی سلول‌ها پس از ترانسفکشن سازه‌ی ژنی دارای tBid با استفاده از لیپوفکتامین ۹۶

شکل ۳- ۲۱ - نتیجه‌ی RT - PCR بر روی سلول‌های مواجه شده با PEI به تنهایی ۹۶

شکل ۳- ۲۲ - نتیجه‌ی RT - PCR بر روی سلول‌ها پس از ترانسفکشن سازه‌ی ژنی دارای tBid با استفاده از پلی-پلکس PEI/DNA. ۹۷

شکل ۳- ۲۳ - نتیجه‌ی RT - PCR بر روی سلول‌ها پس از ترانسفکشن سازه‌ی ژنی دارای tBid با استفاده از پلی-پلکس PEI/DNA هدفمند با نانوبادی علیه MUC1 ۹۷

شکل ۳- ۲۴ - نتیجه‌ی RT - PCR بر روی سلول‌ها پس از ترانسفکشن سازه‌ی ژنی دارای tBid با استفاده از پلی-پلکس PEG/PEI/DNA ۹۷

شکل ۳- ۲۵ - نتیجه‌ی RT - PCR بر روی سلول‌ها پس از ترانسفکشن سازه‌ی ژنی دارای tBid با استفاده از پلی-پلکس PEG/PEI/DNA هدفمند با نانوبادی علیه MUC1 ۹۷

شکل ۳- ۲۶ – میزان بیان tBid در رده‌های مختلف سلولی پس از انتقال پلاسمید pCDNA – Hygro^{+} با لیپوفکتامین ۹۹

شکل ۳- ۲۷ – میزان بیان tBid در رده‌های مختلف سلولی پس از انتقال سازه‌ی ژنی HRE/ERE – pMUC1 – tBid با لیپوفکتامین ۹۹

شکل ۳- ۲۸ – میزان بیان tBid در رده‌های مختلف سلولی پس از تیمار سلول‌ها با PEI به تنهایی ۱۰۰

شکل ۳- ۲۹ – میزان بیان tBid در رده‌های مختلف سلولی پس از تیمار سلول‌ها با PEI حامل سازه‌ی ژنی مورد نظر ۱۰۰

شکل ۳- ۳۰ – میزان بیان tBid در رده‌های مختلف سلولی پس از تیمار سلول‌ها با PEI حامل سازه‌ی ژنی مورد نظر و هدفمند با نانوبادی علیه MUC1 ۱۰۱

شکل ۳- ۳۱ – میزان بیان tBid در رده‌های مختلف سلولی پس از تیمار سلول‌ها با PEI پگیله شده حامل سازه‌ی ژنی مورد نظر ۱۰۱

شکل ۳- ۳۲ – میزان بیان tBid در رده‌های مختلف سلولی پس از تیمار سلول‌ها با PEI پگیله شده حامل سازه‌ی ژنی مورد نظر و هدفمند با نانوبادی علیه MUC1 ۱۰۲

شکل ۳- ۳۳ – مقایسه‌ی میزان بیان ژن tBid در دو تست کنترل منفی (سلول‌های بدون تیمار و سلول‌ها تیمار شده با لیپوفکتامین (pCDNA – Hygro+) ۱۰۳

شکل ۳- ۳۴ – مقایسه‌ی میزان بیان ژن tBid در تیمار سلول‌ها با PEI به تنهایی و PEI حاوی سازه‌ی ژنی HRE/ERE – pMUC1 – tBid. ۱۰۳

شکل ۳- ۳۵ – مقایسه‌ی میزان بیان ژن tBid در سلول‌های تیمار شده با لیپوفکتامین ۱۰۴

شکل ۳- ۳۶ – میزان بیان ژن tBid در سلول‌های مورد آزمایش پس از تیمار با لیپوفکتامین - سازه‌ی ژنی به دنبال کسر بیان پایه‌ی tBid پس از تیمار سلول‌ها با لیپوفکتامین – pCDNA – Hygro+ ۱۰۴

شکل ۳- ۳۷ – میزان بیان ژن tBid در رده‌های سلولی مورد آزمایش پس از تیمار با پلی‌پلکس PEI با نانوبادی و فاقد آن ۱۰۵

شکل ۳- ۳۸ – میزان بیان ژن tBid در رده‌های سلولی مورد آزمایش پس از تیمار با پلی‌پلکس PEI بدون نانوبادی و پلی‌پلکس PEI پگیله شده بدون نانوبادی ۱۰۵

شکل ۳- ۳۹ – میزان بیان ژن tBid در رده‌های سلولی مورد آزمایش پس از تیمار با پلی‌پلکس PEI پگیله شده با نانوبادی و بدون آن ۱۰۶

شکل ۳- ۴۰ – میزان بیان ژن tBid در سلول رده‌ی MCF7 با تیمارهای مختلف ۱۰۶

شکل ۳- ۴۱ - میزان بیان ژن tBid در سلول رده‌ی T47D با تیمارهای مختلف ۱۰۷

شکل ۳- ۴۲ - میزان بیان ژن tBid در سلول رده‌ی HT29 با تیمارهای مختلف ۱۰۷

شکل ۳- ۴۳ - میزان بیان ژن tBid در سلول رده‌ی A431 با تیمارهای مختلف ۱۰۸

شکل ۳- ۴۴ - میزان بیان ژن tBid در سلول رده‌ی SKBR3 با تیمارهای مختلف ۱۰۹

شکل ۳- ۴۵ - میزان بیان ژن tBid در سلول رده‌ی NIH3T3 با تیمارهای مختلف ۱۱۰

فصل اول
مقدمه

در ۲۵ سال اخیر پیشرفت‌های بسیاری در درک بنیادی بیولوژی سرطان به دست آمده است. با این حال این پیشرفت‌ها چندان در پیشبرد عرصه‌های بالینی درمان سرطان اثر نداشته است. نانوتکنولوژی عرصه‌ای است که امیدهای بسیاری برای دستیابی به درمان‌های جدید به آن بسته شده است، چون چندین رشته‌ی تخصصی نظیر مهندسی مواد، شیمی و فیزیک را در کنار بیولوژی سرطان به کار خواهد گرفت. این تجمع علوم مختلف در کنار یکدیگر امکان ابداع ابزارها و/یا موادی را به دست می دهد که دست کم در یک بعد ابعادی از ۱ تا ۱۰۰۰ نانومتر دارند. این نکته می تواند عامل پیشرفت‌های سریع در عرصه‌ی درمان و تصویربرداری سرطان باشد.

امید می رود عرصه‌ی رو به رشد "نانوسلامتی"[1] تشخیص تومورهای انسانی را، بدون توجه به اینکه محل تومور اولیه و/یا متاستازهای آن کجا باشد، در اولین مراحل ایجاد آنها امکان‌پذیر سازد. پیشرفت این حوزه از علم شاید راهکارهای موثرتر و با عوارض جانبی کمتری برای از بین بردن تومورها و شبکه‌ی عروقی آنها به دست دهد.

۱-۱ ژن درمانی

اساس ژن درمانی تغییر بیان ژن‌های منتخب با هدف درمان یا پیشگیری از بیماری‌ها است. برای دستیابی به این هدف اسیدهای نوکلئیک را به سلول‌های هدف انتقال می‌دهند تا عملکرد ژن مورد نظر را آغاز یا بازیابی کند (به دست آوردن عملکرد[2]) یا آن که عملکرد برخی ژن ها را سرکوب کند (از دست دادن عملکرد[3]). استراتژی‌های جایگزینی ژن معمولا برای انتقال DNA دو رشته‌ای به داخل هسته‌ی سلول طراحی می شوند تا برای تغییر عملکرد ژنی، الیگونوکلئوتیدهای آنتی‌سنس[4] (AS – ON) [۱]ریبوزیم‌ها [۲] یا RNA ها تداخلگر کوچک[5] (siRNA) [۳]را وارد سلول یا بافت هدف کنند.

با آنکه هنوز ژن‌درمانی یک درمان استاندارد پذیرفته شده نیست، تا کنون در بیش از ۱۰۰۰ کارآزمایی بالینی به کار رفته است، که از این میان حدود ۶۵٪ مطالعات ژن‌درمانی در زمینه‌ی درمان سرطان بوده است. بر اساس مطالعات انجام شده در دهه‌ی اخیر به نظر می رسد ژن‌درمانی راهکارهای بسیاری در زمینه‌ی درمان سرطان ارائه خواهد کرد. در این مطالعات اغلب از روش‌های ایمونوتراپی و آنزیم/پیش دارو استفاده شده است. با این حال تعریف دقیق از بافت هدف و یافتن یک حامل موثر برای انتقال ژن همچنان دو محدودیت بزرگ موجود در زمینه‌ی کاربرد درمانی ژن‌ها هستند.

[1] *Nanohealth*
[2] Gain of function
[3] Loss of function
[4] Anti-sense oligonucleotides
[5] Small interfering RNA

تا کنون دو روش عمده برای انتقال ژن به سلول‌های یوکاریوتی به کار رفته است: به کارگیری حامل‌های ویروسی و حامل‌های برپایه‌ی لیپیدها یا پلیمرها (سیستم‌های غیرویروسی). در ادامه به معرفی این حامل‌ها می-پردازیم

۱-۲ حامل[۶] ها

در سال‌های اخیر انکولوژی مرکز تحقیقات ژن‌درمانی بوده است. با وجود حمایت‌های بسیار سازمان‌های متفاوت هنوز بین امیدهای ایجاد شده و آنچه تحقیقات به دست داده‌اند راه درازی است. اغلب شکست‌های ژن-درمانی مربوط به تاکید زیاد بر مبانی کلینیکی و تکنولوژی نابالغ در این زمینه، و از جمله طراحی نه چندان مناسب وکتورها است [۴].

یک حامل مناسب ژن درمانی باید خصوصیات زیر را داشته باشد:

۱- به طور اختصاصی و موثر ژن را به سلول هدف وارد کند.

۲- ژن وارد شده به سلول‌ها به راحتی از سلول خارج نشود یا از دست نرود

۳- ژن را به میزان بالا بیان کند تا اثرات درمانی را به دست دهد

۴- عوارض جانبی در میزبان نداشته و به اصطلاح ایمن باشد.

ویروس‌ها ابزار بسیار مناسبی برای انتقال ژن هستند چون در سیر تکامل خود توانایی انتقال موثر ژن به سلول‌های هدف را کسب کرده اند. ویروس‌های متفاوتی برای ایجاد سیستم‌های وکتوری انتقال ژن با مقاصد درمانی به کار رفته اند. هر سیستم مزایا و مضرات منحصر به خود را دارد. ایمونوژن بودن این وکتورها مهم‌ترین دغدغه در به کارگیری این سیستم‌ها است. وکتورهای ویروسی و اجزای ویروسی آنها باعث ایجاد التهاب می شوند، که این نکته در کاربرد بالینی این وکتورها مشکل‌ساز خواهد بود. برخی از انواع این وکتورها نیز از ویروس‌هایی تهیه می شوند که نگرانی‌هایی در مورد ایمن بودن آنها به هنگام کاربری در انسان ایجاد می کند. به همین دلایل بود که وکتورهای غیرویروسی مورد توجه قرار گرفتند. تولید این وکتورها آسان است و توکسیسیته و ایمونوژنیسیته‌ی پایینی دارند [۵].

در ادامه اول به معرفی حامل‌های ویروسی و بیان مزایا و معایب این سیستم می پردازیم و پس از آن شرح مبسوطی از حامل‌های غیرویروسی با تاکید بر نانو حامل‌های پلیمری خواهد آمد.

---

[6] Vector