بسم الله الرحمن الرحيم

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای مجتبی فتحی رشته **بیوشیمی بالینی** رساله **دکتری** خود را با عنوان « **تولید و کنترل کیفی کمپلکس ^{177}Lu-siRNA ویژه رسپتور نوع یک فاکتور رشد شبه انسولین و بررسی اثرات آن روی رشد سلولی، آپوپتوز و کینتیک برداشت سلولی در رده سلولی SW480 سرطان کولون** » در تاریخ **۱۳۹۱/۶/۴** ارائه کردند.

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

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	امضاء
استاد راهنمای اصلی	دکتر محمد تقی خانی	
استاد راهنمای دوم	دکترمحمد قنادی مراغه	
استاد مشاور	دکترکمال یاوری	
استاد ناظر	دکترفاطمه صفری کرمی تهرانی	
استاد ناظر	دکترمحمد جواد رسایی	
استاد ناظر	دکترپروین پا سالار	
استاد ناظر	دکتربیژن نهاوندیان	
نماینده تحصیلات تکمیلی	دکترسید علیرضا مصباح نمین	

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 دانشجو 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، 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 آئین نامه های مصوب انجام شود.

ماده ۴- 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 ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ 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 **مجتبی‌فتحی** دانشجوی‌رشته **بیوشیمی‌بالینی** ورودی‌سال **۱۳۸۶** مقطع **دکتری تخصصی** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آئین 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 آئین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هر گونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله بر اساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هر گونه اعتراض را از خود سلب نمودم»

امضا:

تاریخ: ۱۳۹۵/۵/۲

آیین نامه چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (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 پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اطلاع دهد.

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

«کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد/ رساله دکتری نگارنده در رشته **بیوشیمی بالینی** است که در سال ۱۳۸۶در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی آقایان **دکتر محمد تقی‌خانی و دکتر محمد قنادی-مراغه**، مشاوره جناب آقای **دکتر کمال یاوری** از آن دفاع شده است.»

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت‌چاپ) را به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر درمعرض فروش قرار دهد.

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت‌مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند 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 **مجتبی فتحی** دانشجوی رشته **بیوشیمی بالینی** مقطع **دکتری تخصصی** و ورودی **سال ۱۳۸۶** تعهد فوق وضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: مجتبی فتحی

تاریخ و امضا: ۱۳۹۱/۵/۲

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته بیوشیمی بالینی

عنوان

تولید و کنترل کیفی کمپلکس ^{177}Lu – siRNA ویژه رسپتور نوع یک فاکتور رشد شبه انسولین و بررسی اثرات آن روی رشد سلولی ، آپوپتوز و کینتیک برداشت سلولی در رده سلولی SW480 سرطان کولون

نگارش

مجتبی فتحی

اساتید راهنما

دکتر محمد تقی خانی و دکتر محمد قنادی-مراغه

استاد مشاور

دکتر کمال یاوری

تابستان 1391

تقدیم به:

همسرم نازیلا

تقدیم به:

دخترهای نازم هانیه و هاله

تقدیم به:

خواهر و برادرهایم

تشکر و قدردانی

به نام خداوند یکتا

بی‌نهایت سپاس خدای عزوجل را که به من مجالی داد تا این رساله به پایان برسد. بی شک، پس از لطف خداوند متعال بدون یاری اساتید محترم و همکاران و دوستان عزیز، به سرانجام رساندن این رساله امکان‌پذیر نبود.

-لازم می‌دانم از زحمات، لطف و محبت‌های اساتید ارجمندم آقایان دکتر محمد تقی‌خانی و دکتر محمد قنادی-مراغه، که راهنمایی این رساله را بر عهده داشتند و آقای دکتر کمال یاوری که در مشاوره این رساله نقش داشتند، صمیمانه سپاسگزاری و تشکر نمایم.

-از کلیه اساتید گروه که در مدت حضور اینجانب در گروه بیوشیمی بالینی بر توان علمی حقیر اضافه کردند، سپاسگزارم.

-از برادرهای عزیزم مرتضی فتحی و مقتدا فتحی و نیز خواهرزاده عزیزم مهندس اباذر قاسمی که با همکاری صمیمانه خودشان حل بسیاری از مشکلات را میسر نمودند، تقدیر و تشکر می‌نمایم.

-از خواهرخانم ارجمندم سرکارخانم فاطمه مالکی که همواره حضورش مملو از امید است و در مدت انجام این رساله، حقیر و خانواده اینجانب را مورد لطف و محبت خود قرار دادند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایم.

- از کارشناس‌های گروه بیوشیمی بالینی، سرکارخانم افشار و سرکارخانم اعتمادی، همکلاسی‌هایم که مجال ذکر نامشان در این مقال نمی‌گنجد تشکر می‌کنم.

چکیده

مقدمه: نقش رسپتورهای تیروزین کینازی در پاتوژنز سرطان کولون در رده‌های سلول سرطانی و نمونه‌های توموری متعددی ارزیابی شده است. از بین آنها افزایش بیان رسپتور IGF-1R مرتبط با پیش‌آگهی بد، ترانسفورماسیون، متاستاز، آنژیوژنز و مقاومت به درمانهای رایج در سرطان کولون است. وقتی siRNA ضد IGF-1R با یک رادیوایزوتوپ همراه می‌گردد، siRNA فرایند RNAi را در سلولهاد القاء کرده و خاموش‌سازی ژن مورد نظر انجام می‌گیرد و بدین وسیله فنوتیپ بدخیمی ناشی از آن ازبین می‌رود. از طرفی پرتوهای گاما، ردیابی مولکول را امکان‌پذیر می‌سازد و از طرف دیگر وقتی ایزوتوپ همراه نشر کننده بتا باشد سلولهای سرطانی را پرتودهی کرده و اثر سینرژیسم siRNA و پرتو بروز می‌کند. به علاوه، به خاطر اثر غیر اختصاصی پرتوهای بتا؛ سلولهای سرطانی مجاور را هم که ممکن است هدف مورد نظر را بیان نکنند، پرتودهی کرده و آنها را هم از بین می‌برد. این اثرات که Crossing Fire نام دارد، اساس رادیوتراپی هدفمند در سرطان است. در پژوهش حاضر، siRNA ضد IGF-1R با لوتسیم-177 که نشرکننده بتا و گاما است، نشاندار گردید. کینتیک برداشت سلولی و اثرات درمانی کمپلکس مذکور در رده سلول سرطانی کولون SW480 مورد تحقیق قرار گرفت.

مواد و روشها: siRNA ضد IGF-1R و siRNA ضد لوسیفراز به عنوان کنترل طراحی گردید. پس از کونژوگاسیون با شلاتور p-SCN-Bn-DTPA با لوتسیم-177 نشاندار گردید. کونژوگه‌ها با اولترافیلتراسیون و رادیوکونژوگه‌ها با سفادکس G-25 تخلیص شدند. کنترل کیفی محصول نهایی با ITLC و PAGE بررسی گردید. کینتیک برداشت سلولی با بهره‌گیری از پرتوهای گامای ناشی از لوتسیم-177 به توسط شمارشگر گاما انجام شد و اثر siRNAهای نشاندار و غیرنشاندار بر روی بیان ژن IGF-1R با RT-PCR و الایزا مورد بررسی قرار گرفت.مهار پرولیفراسیون سلولی و آپوپتوز القاء شده با این ترکیبات به ترتیب با MTT و رنگ‌آمیزی دوگانه با انکسین V و PI بررسی شد.

نتایج: تخلیص ترکیبی با استفاده از اولترافیلتراسیون و ژل فیلتراسیون منجر به تولید siRNA نشاندار با لوتسیم-177 با خلوص 1/97 ± 97/32 گردید. 4 ساعت پس از ترانسفکشن کمپلکس 177Lu-siRNA به سلولهای سرطانی کولون اختلاف معنی‌داری در کینتیک برداشت سلولی siRNA ضد IGF-1R و ضد لوسیفراز مشاهده گردید ($P < 0.01$). پایداری کمپلکس 177Lu-siRNA که با ITLC آنالیز شد، نشان داد که 1/48 ± 85/37 درصد کمپلکس در FCS10% به مدت 72 ساعت پایدار باقی می‌ماند. اختلاف معنی‌داری در کاهش بیان ژن IGF-1R بین siRNA ضد IGF-1R نشاندار با لوتسیم-177 و غیر نشاندار مشاهده نشد؛ در حالی که کاهش بیان القاء شده با این ترکیبات به طور معنی‌داری از کنترل لوسیفراز مربوطه بیشتر بود ($P < 0.001$). در سلولهای سرطانی کولون SW480 که با siRNA ضد IGF-1R تیمار شده بودند، پرولیفراسیون سلولی کاهش و آپوپتوز افزایش نشان داد و به لحاظ آماری این اثرات در مورد siRNA نشاندار در مقایسه با فرم غیر نشاندار با لوتسیم-177 افزایش قابل توجهی داشت ($P < 0.01$).

نتیجه‌گیری: امکان‌پذیر است که siRNA با لوتسیم-177 با واسطه شلاتو p-SCN-Bn-DTPA نشاندار گردد و با بهره‌گیری از پرتوهای گاما ردیابی کمپلکس تولید شده در in vitro انجام و نشان داده شد که اثرات سینرژیسم بین پرتوهای بتا و خاموش‌سازی بیان ژن IGF-1R در مهار پرولیفراسیون سلولی و القاء آپوپتوز در رده سلول سرطانی کولون SW480 وجود دارد.

کلمات کلیدی: رسپتور نوع یک فاکتور رشد شبه انسولین، RNAi، سرطان کولون، لوتسیم-177 و siRNA تغییر یافته

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات انجام شده

1-1. سرطان کولورکتال 2

1-1-1. تعریف 2

1-1-2. پاتوفیزیولوژی 3

2-1. سیستم IGF 5

1-2-1. فاکتورهای رشد شبه انسولین 5

2-2-1. گیرنده های فاکتورهای رشد شبه انسولین 7

3-2-1. پروتئین های متصل شونده به فاکتورهای رشد شبه انسولین (IGFBPs) 8

4-2-1. اعمال بیولوژیکی فاکتورهای رشد شبه انسولین 9

5-2-1. فاکتورهای رشد شبه انسولین به عنوان فاکتورهای رشد تومور 10

6-2-1. فاکتورهای رشد شبه انسولین در سرطان کولون 12

7-2-1. نقش IGF-1R در سرطان کولون 13

8-2-1. ارتباط رسپتور IGF-1R و مقاومت سلولهای سرطانی در برابر درمان 16

3-1. فرایند RNAi 23

1-3-1. RNA مداخله‌گر روش خاموش کردن اختصاصی ژنها در سطح رونویسی می باشد 23

2-3-1. سازوکار فرآیند RNAi 25

3-3-1. RNAi در سلولهای پستانداران 27

4-1. پرتودرمانی و سرطان 29

1-4-1. رادیوتراپی هدفمند در سرطان 30

2-4-1. نشاندارسازی siRNA با رادیوایزوتوپها 35

1-2-4-1. روشهای پایدارسازی siRNA 37
1-5. اصول طراحی siRNA 40
1-6. هدف **41**
1-6-1. فرضیه ها 44
1-6-2. هدف کلی پژوهش حاضر 44

فصل دوم: مواد و روشها

2-1. بافرها 46
2-1-1. بافر TBE (5x) 46
2-1-2. بافر PBS 46
2-1-3. بافر لیز سلولی (RIPA) 46
2-2. کیتها 47
2-3. محلول ها 48
2-3-1. تریپسین-EDTA 0/25 درصد 48
2-3-2. تریپان بلو 48
2-3-3. آب حاوی DEPC 0/1 درصد 48
2-3-4. محلول برادفورد 49
2-3-5. محلول استاندارد پروتئین برای سنجش برادفورد 49
2-3-6. محلول کمپلکس ایتریوم آرسنازو 49
2-4. محیط کشت سلولی 50
2-4-1. محیط کشت RPMI برای کشت سلولی 50
2-4-2. محیط فریزینگ سلولها 50
2-4-3. محیط کشت خام 50

2-5. کشت رده سلولی و پاساژ سلولها 50
2-5-1. شمارش سلولی..... 51
2-5-2. فریز کردن سلولها..... 52
2-5-3. روش ذوب نمودن سلولهای منجمد شده..... 52

2-6. طراحی siRNA..... 53
2-6-1. آماده سازی siRNAها 54

2-7. نشاندارسازی siRNA با لوتسیم-177..... 56
2-7-1. تولید و تخلیص siRNA کونژوگه با شلاتورp-SCN-Bn-DTPA 56
2-7-2. کنترل کیفی siRNA کونژوگه با روش اسپکتروفوتومتریک..... 56
2-7-3. تولید لوتسیم رادیواکتیو (^{177}Lu) و نشاندار کردن siRNAهای کونژوگه با شلاتور..... 58
2-7-4. خلوص رادیوشیمیایی کمپلکس ^{177}Lu-siRNA..... 58
2-7-5. بررسی کمپلکس ^{177}Lu-siRNA با ژل پلی آکریل آمید غیر احیایی 59
2-7-6. بررسی در صد ورود کمپلکس ^{177}Lu-siRNA به سلولهای سرطانی کولون..... 59

2-8. آنالیز داده ها..... 60

2-9. روش ترانسفکشن سلولها با siRNA جهت آزمون RNAi..... 60
2-9-1. بررسی نتایج انجام آزمون RNAi بر روی بیان ژن IGF-IR 62
2-1-9-2. تخلیص RNA توتال با استفاده از QIAGEN RNeasy Plus mini kit..... 62
2-1-1-9-2. ارزیابی کمی و کیفی RNAهای به دست آمده از سلولهای کنترل و ترانسفکت شده..... 63
2-1-9-2. ساخت cDNA، با استفاده از کیت First Strand cDNA Synthesis Kit..... 64
2-1-9-3. تکنیک PCR 66
2- 9- 2. بررسی نتایج انجام آزمون تداخل RNA بر روی بیان پروتئین IGF-IR 69
2- 9- 2-1. جمع‌آوری و لیز سلولها..... 69
2- 9- 2-2. روش برادفورد..... 70

2- 9- 2-3. سنجش غلظت پروتئین در لیزات سلولها با استفاده از الایزا 71
2-9- 3. اثرات بیولوژیکی خاموشی ژن IGF-IR بر روی رشد سلولی 73
2-9- 4. اثرات خاموشی ژن IGF-IR بر روی آپوپتوز در سلولهای سرطانی کولون 74

فصل سوم: نتایج

3-1. توالی تعیین شده برای siRNAها 78
3-2. نشاندارسازی siRNAها با لوتسیم به منظور مطالعات کینتیکی آنها 80
3-2-1. کونژوگاسیون siRNA با شلاتور p-SCN-Bn-DTPA 80
3-2-2. نشاندارسازی siRNA با لوتسیم-177 و تخلیص آن 84
3-2-3. کنترل کیفی siRNA نشاندار با لوتسیم-177 (^{177}Lu-siRNA) 89
3-2-3-1. کروماتوگرافی لایه نازک (ITLC) 89
3-2-3-2. ژل پلی‌آکریل آمید (PAGE) نشان داد که siRNAها پس از نشاندارسازی تجزیه نشده است 91
3-3. پایداری siRNA و siRNA نشاندار با لوتسیم رادیواکتیو 93
3-3-1. پایداری siRNA غیر نشاندار 93
3-3-2. پایداری کمپلکس siRNA نشاندار با لوتسیم رادیواکتیو 94
3-4. تعیین کمی درصد ترانسفکشن siRNA نشاندار با لوتسیم-177 در سلولهای سرطانی کولون 96
3-5. نتایج حاصل از انجام آزمایش RNAi جهت خاموش‌سازی ژن IGF-1R 100
3-6. نتایج حاصل از انجام آزمایش RNAi بر روی بیان پروتئین IGF-1R 103
3-7. بررسی نتایج حاصل از RNAi با siRNAهای نشاندار با لوتسیم-177 104
3-8. توالیsiRNA ضد IGF-1R حاوی هگزیل‌آمین لینکر و نشاندار با لوتسیم (^{177}Lu-F1) به طور موثری باعث کاهش پرولیفراسیون سلولی می‌شود 108
3-9. توالی siRNA ضد IGF-1R فاقد تغییرات در اسکلت قند فسفات (F1) چه به صورت غیرنشاندار و چه به صورت نشاندار با لوتسیم-177 آپوپتوز را در سلولهای سرطانی کولون SW480 القاء می‌نماید 110

3-10. توالی siRNA ضد IGF-1R دارای تغییرات PS و 2'-OM در اسکلت قند فسفات (F3) چه به صورت غیرنشاندار و چه به صورت نشاندار با لوتسیم-177 آپوپتوز را در سلولهای سرطانی کولون SW480 القاء می‌نماید 114

فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها

4-1. بحث و نتیجه‌گیری 118

4-2. پیشنهادهای برخاسته از این رساله 126

فهرست منابع

چکیده انگلیسی

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول1-1. مقایسه لوتسیم-177 با برخی رادیوایزوتوپهای کلینیکی 35

جدول2-1. تهیه Master mix برای یک واکنش PCR 68

جدول 3-1.مشخصات siRNAهای طراحی شده 80

جدول3-2. تعیین مقدار شلاتور p-SCN-Bn-DTPA معلوم در مخلوط حاوی siRNA از روی منحنی استاندارد 83

جدول3-3. نسبت مولی شلاتور p-SCN-Bn-DTPA به siRNA در زمانهای مختلف انکوباسیون 83

جدول3-4. مقادیر R_f برای لوتسیم-177 و کمپلکس آن با شلاتور p-SCN-Bn-DTPA و siRNA 91

جدول3-5. درصد ترانسفکشن siRNA نشاندار به سلولهای سرطانی کولون SW480 در شرایط مختلف 99

جدول3-6. شرایط اپتیمم برای ترانسفکشن 100 نانومولار siRNA در پلیت‌های مختلف کشت سلولی 100

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل1-1. بخش های مختلف روده بزرگ. 3

شکل1-2. مکانسیم دخیل در سرطان با واسطه سیستم IGF و انسولین..... 4

شکل1- 3. ساختار IGF-1R..... 8

شکل1-4. سیستم IGF و فنوتیپ بدخیمی در سرطان. 11

شکل1-5. نقش IGF-1R در مقاومت به درمان سرطان. 19

شکل1-6. نقش IGF-IR در ایجاد سرطان کولون..... 21

شکل1-7. رویکردهای مختلف هدف دهی IGF-IR. 23

شکل1-8. ساز و کار فرایند RNAi..... 26

شکل1- 9. نمای شماتیک از مولکول siRNA..... 41

شکل3-1. جستجوی همولوژی IGF-1R 79

شکل3-2. منحنی استاندارد با کمپلکس ایتریوم آرسنازو..... 82

شکل3-3. طیف ماورای بنفش siRNAها 84

شکل3-4. تخلیص رادیوکونژوگه siRNA با سفادکس G25. 85

شکل3-5. تخلیص لوتسیم-177 و کمپلکس لوتسیم-177 با شلاتور p-SCN-Bn-DTPA. 87

شکل3-6. کروماتوگرام مربوط به تخلیص کمپلکس siRNA با لوتسیم-177. 88

شکل3-7. کروماتوگرام ITLC مربوط به کمپلکس 177Lu-siRNA قبل و بعد از تخلیص..... 90

شکل3-8. ژل پلی آکریل آمید از siRNAهای نشاندار با لوتسیم-177 و غیر نشاندار. 92

شکل3-9. ژل پلی اکریل آمید (PAGE) 17% از siRNAها پس از انکوباسیون در محیط کشت سلولی حاوی 10% FBS..... 95

شکل3-10. پایداری کمپلکس siRNA با لوتسیم-177 (^{177}Lu-siRNA) در محیط کشت حاوی 10% FBS..... 96
شکل3-11. کینتیک برداشت سلولی siRNA در سلولهای سرطانی کولون SW480..... 98
شکل3-12. اثر خاموش سازی siRNA ضد IGF-1R و GAPDH در سلولهای سرطانی کولون SW480..... 102
شکل3-13. آنالیز باندهای حاصل از RNAi به صورت نیمه کمی..... 103
شکل3-14. خاموشی ژن IGF-1R در سطح پروتئین با RNAi..... 104
شکل3-15. خاموشی ژن IGF-1R در سطح mRNA با siRNA نشاندار با لوتسیم-177 و غیر نشاندار.. 106
شکل 3-16. کاهش بیان پروتئین IGF-1R پس از ترانسفکشن سلولها با siRNAهای ضد IGF-1R..... 107
شکل 3-17. تست MTT در سلولهای تیمار شده با siRNA نشاندار و غیرنشاندار..... 109
شکل 3-18. آپوپتوز القاء شده در سلولهای سرطانی کولون توسط siRNAهای ضد IGF-1R فاقد تغییرات در اسکلت قند-فسفات..... 113
شکل 3-19. آپوپتوز در سلولهای سرطانی کولون توسط siRNAهای ضد IGF-1R حاوی تغییرات در اسکلت قند-فسفات..... 115

فصل اول

مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته

1-1. سرطان کولورکتال[1]

1-1-1. تعریف

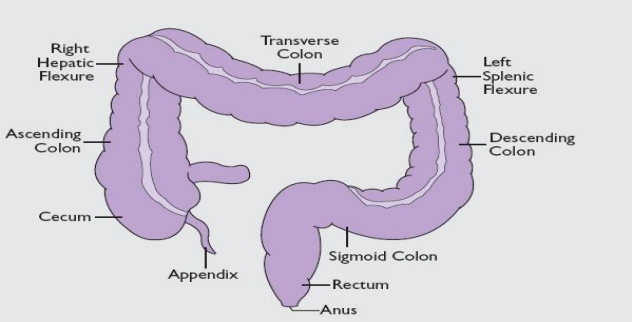
بخش پایانی لوله گوارش روده بزرگ است که از انتهای روده کوچک شروع شده و به آنوس ختم می‌گردد. روده بزرگ شامل دو بخش است. بخش اول اصطلاحاً کولون نامیده می‌شود که حدود 180 سانتی‌متر طول و 14 سانتی‌متر قطر دارد و از چهار قسمت کولون صعودی ، کولون متقاطع، کولون نزولی و کولون سیگموئید تشکیل شده است (شکل1-1). بخش دوم، راست روده یا رکتوم است که طول آن به 15 تا 25 سانتی متر می‌رسد و قسمت پایانی روده بزرگ محسوب می شود [1 و 2].

عملکرد اصلی روده بزرگ احتباس آب، الکترولیت‌ها و دفع مواد زاید می‌باشد. از این رو، این بخش از لوله گوارش در معرض آسیب‌های ناشی از مواد زاید است و احتمال بروز سرطان در این بخش زیاد می‌باشد. سرطان‌های مربوط به این بخش سرطان کولورکتال یا کولون[2] نام دارد. دو سوم از سرطان کولورکتال در کولون و یک سوم آن در رکتوم اتفاق می‌افتد. سومین سرطان شایع و دومین سرطان کشنده در جهان است که سالانه حدود یک میلیون نفر در سطح جهان به آن مبتلا می‌شوند و حدود 10% از مرگ و میرهای مربوط به سرطان را در هر سال به خود اختصاص می‌دهد [3 و 4].

1. Colorectal Cancer

سرطان کولون گستره اپیدمیولوژیکی وسیعی دارد؛ ولی شیوع[1] آن درکشورهای پیشرفته از جمله آمریکای شمالی و اروپا بیشتر است و حدود 60% آن به این کشورها اختصاص دارد. در گزارش انجمن سرطان امریکا، موارد جدید سرطان کولون در سال 2012 در این کشور، حدود 150000 نفر تخمین زده شده است که 50000 نفر آنها در معرض مرگ و میر ناشی از سرطان کولون قرار دارند [5 و 6].

مطالعه‌ای که در ایران صورت گرفته، نشان دهنده ابتلای 10 الی 15 نفر در هر 100.000 می‌باشد که آمار نزدیک به کشورهای در حال توسعه می‌باشد و اغلب در مناطق شمال و شمال غرب کشور شایع است [7 و 8].



شکل1-1. بخش های مختلف روده بزرگ. ابتدای روده بزرگ سکوم یا روده کور نام دارد که به دنبال آن کولون بالارو، افقی، پایین رو و سیگموییدی قرار می‌گیرد. بخش انتهایی آن رکتوم یا راست روده است که به آنوس ختم می‌گردد [1].

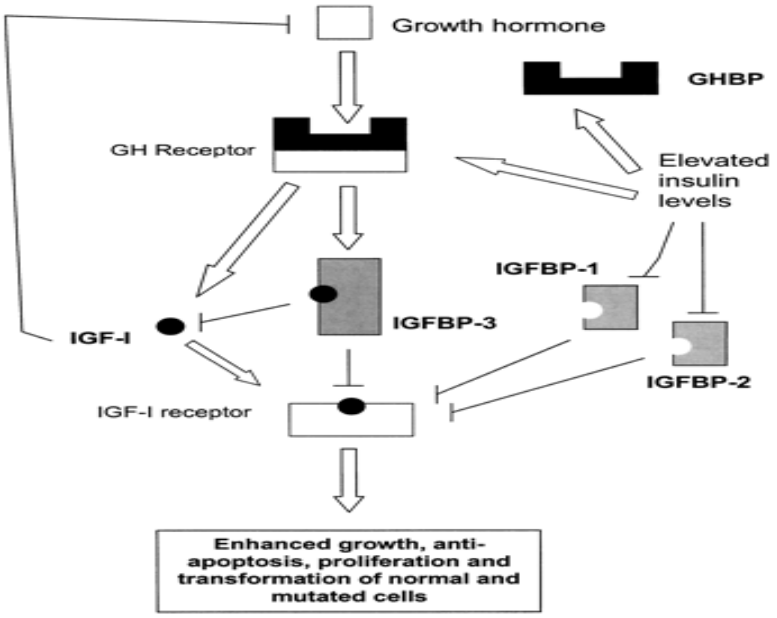
1-1-2. پاتوفیزیولوژی[2]

سرطان کولون در بیش از 90% اسپورادیک[3] است و طی گذشت زمان، موتاسیون در ژنهای سرکوبگر تومور از قبیل APC، p53 و PTEN، پروتوانکوژنهایی مثل k-Ras و IGF-1R و همینطور تغییرات اپی-

1. Incidence
2. Pathophysiology
3. Sprodic

ژنتیکی مثل متیلاسیون DNA از جمله عواملی هستند که در روند بیماری ایجاد می‌گردند [9-12].

مطالعات اپیدمولوژی نشان می‌دهند که فاکتورهایی مثل مصرف الکل، چاقی، سیگار کشیدن از جمله عواملی محیطی هستند که ریسک ابتلا را افزایش می‌دهند. از جمله عوامل محیطی که ریسک ابتلا را به سرطان کولون افزایش می‌دهند چاقی، کم تحرکی می‌باشند که در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه یک حالت اپیدمی پیدا کرده است. نشان داده شده که اثرات این فاکتورها از طریق انسولین و عوامل دخیل در مقاومت به انسولین مثل لپتین میانجیگری می‌گردند؛ از جمله اینکه روی دسترسی فاکتور رشد شبه انسولین نوع یک (IGF-1) به رسپتورهای آن و در نتیجه سوبستراهای فرودست مسیر سیگنالینگ اثر می‌گذارند (شکل1-2).



شکل1-2. مکانسیم دخیل در سرطان با واسطه سیستم IGF و انسولین. چاقی و افزایش کالری وارد شده به بدن منجر به آزادسازی انسولین می گردد که به نوبه خود در دسترسی فاکتورهای رشد IGF به رسپتور اثر می گذارند. حساسیت رسپتورهای هورمون رشد در جهت ترشح IGF-1 نیز افزایش می یابد. به عبارت دیگر، لیگاندهای رسپتور IGF-1R افزایش پیدا کرده و منجر به تحریک رسپتور می گردند که نتیجه آن ترانسفورماسیون، پرولیفراسیون، خاصیت ضد آپوپتوزی و به طور کلی فنوتیپ بدخیمی سلولها است [17].