بسم الله
الرحمن الرحیم

بسمه تعالی

## تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای کمال یاوری **رشته بیوشیمی بالینی رساله دکتری واحدی خود را با عنوان:** " مطا لعه اثرات خاموش سازی ژن گیرنده نوع ۱فاکتور رشد شبه انسولین با واسطه RNA مداخله گرکوچک در رده سلولی سرطانی کولون با استفاده از رادیو ایزوتوپها "

**در تاریخ ۸۸/۵/۷ ارائه کردند. اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده است و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.**

| اعضای هیات داوران | نام و نام خانوادگی | امضاء |
|---|---|---|
| ۱- استاد راهنمای اصلی | دکتر محمد تقی خانی | |
| ۲- استاد راهنمای دوم | دکتر محمد قنادی | |
| ۳- استاد مشاور | دکتر علیرضا مصباح | |
| ۴- استاد مشاور | دکتر محمد حسین بابایی | |
| ۵- استاد ناظر | دکتر فاطمه کرمی تهرانی | |
| ۶- استاد ناظر | دکتر محمد جواد رسایی | |
| ۷- استاد ناظر | دکتر بیژن نهاوندیان | |
| ۸- استاد ناظر | دکتر هوشنگ امیر رسولی | |
| ۹-نماینده تحصیلات تکمیلی | دکتر عبدالامیرعلامه | |

# 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 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 آئین‌نامه‌های 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.

# 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 رساله دکتری نگارنده در رشته **بیوشیمی بالینی** است که در سال۱۳۸۸ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **آقایان دکتر محمد تقی خانی** و **دکتر محمد قنادی** ، مشاوره **آقایان دکتر علیرضا مصباح** و **دکتر محمد حسین بابایی** 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 **کمال یاوری** دانشجوی رشته **بیوشیمی بالینی** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضا

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

**رساله دوره دکتری تخصصی (ph.D) در رشته بیوشیمی بالینی**

## عنوان:

# مطالعه اثرات خاموش سازی ژن گیرنده نوع ۱ فاکتور رشد شبه انسولین با واسطه RNA مداخله گر کوچک در رده سلولی سرطانی کولون با استفاده از رادیو ایزوتوپها

**نگارش:**

**کمال یاوری**

**اساتید راهنما:**

دکتر محمد تقی خانی
دکتر محمد قنادی مراغه

**اساتید مشاور:**

دکتر علیرضا مصباح نمین
دکتر محمد حسین بابایی

**تابستان ۱۳۸۸**

**این کتابچه پایان تلاشی است مقطعی و آغازیست برای تلاش های والاتر و بیشتر....**

**و آن را تقدیم می کنم به:**

# پدر پاکدل و مهربانم
# روح بلند مادرعزیزم
# و خانواده ام

**آنانکه همواره دستها و دلهایشان پشتوانه زندگی و دعاهایشان تکیه گاه تلاشهایم بوده است**

تشکر و قدردانی

**به نام خداوند جان وخرد  کزین برتر از اندیشه بر نگذرد**

***حمد و سپاس آن یار صدق سرمدی را که ما را توفیق داد و راه و رسم زندگی و کتابت آموخت. درود فراوان بر ذات مقدس او که بر من منت نهاد تا بتوانم این تحقیق را به پایان برسانم. بر خود لازم می دانم که امتنان خویش را از اساتید گرانقدر و نازنین یاران همراه در انجام این تحقیق ابراز دارم.***

- از جناب آقای دکتر محمد تقی خانی، استاد فرهیخته و اندیشمند که راهنمایی این تحقیق را بر عهده داشته و بهترین الگوی علمی و اخلاقی برای اینجانب بوده و با آموزش علوم و راهنمایی های متعدد حق بزرگی بر عهده من قرار داده اند، صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم.
- از جناب آقای دکتر محمد قنادی مراغه، استاد راهنمای رساله که با خلوص نیت از هر گونه راهنمایی و معاضدت دریغ نفرمودند صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم. بی شک بدون همکاری ایشان به نتیجه رساندن این تحقیق میسر نمی شد.
- از جناب آقای دکتر علیرضا مصباح نمین، استاد مشاور رساله که صادقانه تجربیات گرانمایه خویش را در اختیار اینجانب قرار داده و همه گونه همکاری را مبذول داشتند، صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم.
- از جناب آقای دکتر محمد حسین بابایی، استاد مشاور رساله که با پشتیبانی و راهنمایی های فراوان نقش عمده ای در به نتیجه رساندن این تحقیق داشتند ، صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم.
- از کلیه اساتید گرانقدر و پرسنل فهیم گروه بیوشمی بالینی که در دوران حضور اینجانب در این گروه بر توان علمی و اجتماعی اینجانب افزودند، صمیمانه تشکر و قدردانی می کنم.
- از ریاست محترم دانشکده پزشکی جناب آقای دکتر علامه که زحمات فراوانی در ارتقاء کمی و کیفی امکانات و همچنین سطح علمی دانشکده کشیده اند، صمیمانه تشکر و قدردانی می کنم.
- از کلیه اعضاء محترم هیات علمی و پرسنل فهیم آزمایشگاه های جابر ابن حیان،کنترل کیفی رادیو ایزوتوپ، بخش پرتودهی بیمارستان شهدا و بخش فلوسایتومتری سازمان انتقال خون به خاطر همکاری صادقانه و مساعدت هایشان در کلیه مراحل تحقیق سپاسگزاری می گردد.
- از همکاری صمیمانه ریاست محترم پژوهشکده چرخه سوخت هسته ای جناب آقای دکتر احمدی تشکر و قدردانی می نمایم.

- از برادر بزرگوارم جناب آقای دکتر محمد یاوری استاد الکترونیک دانشگاه امیرکبیر به خاطر نقش مهمی که در مراحل مختلف رساله به خصوص ویرایش ادبی مقالات داشتند، صمیمانه تشکر و قدردانی می کنم.
- از همسر فداکارم و خانواده محترمشان که بدون صبر و بردباری ایشان در برابر مشکلات این مهم به سامان نمی رسید، صمیمانه تشکر و قدردانی می کنم.
- از دوستان و همکاران عزیزم آقایان دکتر مشکانی، مهندس سامانی، سر کار خانم دکتر رجبی و سایر عزیزانی که با همکاری صمیمانه خود حل بسیاری از مشکلات را میسر نمودند، تقدیر و تشکر می نمایم.
- از همکلاسی ها و دانشجویان همدوره که علم و دانش بسیار در زمینه های گوناگون و سخت کوشی و عشق به کار را در محضر یکدیگر آموختیم، صمیمانه تشکر و قدردانی می کنم.
- از کلیه دانشجویان فهیم دانشگاه تربیت مدرس که در طی سالیان اخیر به لحاظ ارتباط مستمر از توان علمی و اجتماعی شان بهره مند گشتم، تقدیر و تشکر می نمایم.
- از کلیه پرسنل فهیم دانشکده پزشکی به خصوص حوزه پژوهشی به خاطر همکاری های صمیمانه شان سپاسگزاری می گردد.

و .....

**شکر او شکر خدا باشد یقین**

**چون احسان کرد توفیقش قرین**

**ترک شکرش، ترک شکر حق بود**

**حق او لاشک، به حق ملحق بود**

**چکیده**

گیرنده نوع یک فاکتور رشد شبه انسولین (IGF-IR ) لازمه مطلق برای ایجاد و حفظ فنوتیپ تغییر شکل یافته در خیلی از سلولها است. سرطان کولون دومین سرطان عامل مرگ و میر در جهان می باشد. مطالعات نشان داده اند که سلول های سرطانی کولون ژن IGF-IR را به میزان زیادی بیان می کنند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات بیولوژیکی حاصل از کاهش بیان IGF-IR از طریق به کار گیری RNAi در سلول های سرطانی کولون انسان است. ابتدا دو دودمان سلولی SW480 وHT29 از نظر بیان IGF-IR بررسی شدند و مشاهده گردید که سلول های SW480 میزان بیشتری IGF-IR نسبت به سلولهای HT29 تولید می کنند. در نتیجه سلول های SW480 به عنوان مدلی جهت این مطالعه انتخاب شدند. سلول های SW480 توسط وکتور حاوی siRNA ویژه طراحی شده بر علیه mRNA ژن IGF-IR (pkD-shRNA-IGF-IR-V2) و یا وکتور کنترل (pkD-shRNA-NegCon-V1) ترانسفکت شدند. میزان بیان mRNA و پروتئین ژن IGF-IR در سلولهای ترانسفکت شده و کنترل به ترتیب با روش های RT-PCR نیمه کمی و الایزا اندازه گیری شدند. تغییرات در رشد سلولی و حساسیت سلول ها به عوامل دارویی و پرتودهی با استفاده از روش MTT ارزیابی گردید. توزیع سلول ها در چرخه سلولی با استفاده از فلوسایتومتری اندازه گیری شدند. نتایج ما نشان داد که پلاسمید های حاوی siRNA علیه IGF-IR به صورت قوی و مداوم میزان IGF-IR در سلول های SW480 را تا حدود ۹۵٪ کاهش داد. میزان پرولیفراسیون سلولی در سلولهای ترانسفکت شده کاهش یافت و بالاترین میزان کاهش تکثیر (پرولیفراسیون ) سلولی ۲/۱±۵۳/۸% بود که در روز سوم پس از ترانسفکشن مشاهده گردید. تغییرات در میزان توزیع سلول ها در چرخه سلولی مابین سلول های ترانسفکت شده و کنترل بسیار چشمگیر بود. دربسیاری از سلول های ترانسفکت شده در مرحله $G_0/G_1$ چرخه سلولی وقفه ایجاد شد و فازهای S و G2/M به شدت کاهش یافتند. ترانسفکشن سلولهای SW480 با pkD-shRNA-IGF-IR-V2باعث برگشت حساسیت بیشتر سلول ها به تیمارهای شیمی و پرتودهی درمانی گردید. فاکتورهای افزایش حساسیت به تیمارهای شیمی دارویی و پرتودهی به ترتیب ۲ /.± ۱ / ۸ و حدود ۰۸/ .± ۲ /۰ ۲ به دست آمد. نتایج نشان داد که ژن IGF-IR در ایجاد و ترانسفورماسیون سلولهای سرطان کولون نقش مهمی را دارد و کاهش IGF-IR در سطح سلولهای سرطانی کولون می تواند باعث برگشت فنوتیپ ترانس فورم گردد. همچنین فعالیت سینرژیکی RNAi و عوامل سیتوتوکسیتی نشان داد که ترکیب ژن درمانی با شیمی درمانی یا پرتودهی می تواند یک رویکرد درمانی امیدوار کننده درآینده باشد.

واژگان کلیدی: *رسپتور نوع ۱فاکتور رشد شبه انسولین، سرطان کولون، RNA interference ، رشد سلولی، حساسیت به پرتودهی یونیزان و عوامل دارویی*

# فهرست مطالب

**فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته..... ۱**
۱-۱. سرطان کولون..... ۲
۱-۱-۱. اتیولوژی وریسک فاکتورهای بیماری..... ۳
۱-۱-۲. تقسیم بندی مراحل کلینیکی سرطان کولون..... ٤
۱-۲. فاکتورهای رشد شبه انسولین..... ٥
۱-۲-۱. ساختمان ژنی فاکتورهای رشد شبه انسولین..... ۷
۱-۲-۳. گیرنده های فاکتورهای رشد شبه انسولین..... ۸
۱-۲-٤. پروتئین های متصل شونده به IGF. (IGFBPs)..... ۹
۱-۲-٥. اعمال بیولوژیکی فاکتورهای رشد شبه انسولین..... ۱۰
۱-۲-٦. فاکتورهای رشد شبه انسولین به عنوان فاکتورهای رشد تومور..... ۱۱
۱-۲-۷. فاکتورهای رشد شبه انسولین در سرطان کولون..... ۱۳
۱-۲-۷-۱. مطالعات آزمایشگاهی..... ۱۳
۱-۲-۷-۲. مطالعات اپیدمیولوژیکی..... ۱۹
۱-۲-۷-۲-۱. بیماران آکرومگالی..... ۱۹
۱-۲-۷-۲-۲. مطالعات در افراد سالم..... ۲۰
۱-۳. روشهای هدف دهی IGF-IR..... ۲۱
۱ـ۳-۱. روشهای مبتنی بر توقف برهم کنش بین رسپتورو لیگاند..... ۲۱
۱-۳-۱-۱. آنتی بادیهای خنثی کننده رسپتور..... ۲۱
۱-۳-۱-۲. کاهش دادن لیگاند های IGF-IR..... ۲۲
۱-۳-۱-۳. پپتیدهای آنالوگ IGF-I..... ۲۲
۱-۳-۲. استراتژیهایی که در عملکردIGF-IR تداخل ایجاد می کنند..... ۲۲
۱-۳-۲-۱. موتانتهای منفی غالب (Dominant negative mutants)..... ۲۲
۱-۳-۲-۲. مینی رسپتورهای حاوی C ترمینال..... ۲۳
۱-۳-۲-۳. مولکهای دارای وزن مولکولی پایین..... ۲۳
۱-۳-۲-٤. پپتیدهای اپتامر ..... ۲۳
۱-۳-۳. استراتژیهایی که سنتز IGF-IR را تحت تأثیر قرار می دهند..... ۲٤
۱-۳-۳-۱. ریبوزویم ها..... ۲٤

۱-۳-۳-۲. DNA سه رشته ای..... ۲٤
۱-۳-۳-۳. تکنولوژی آنتی سنس..... ۲٤
۱-٤.RNA مداخله گر (RNA Interference)..... ۲٦
۱-٤-۱. تاریخچه تداخل RNA..... ۲۷
۱-٤-۲. تداخلRNA روش خاموش کردن اختصاصی ژنها در سطح ترانسکریپتومیک می باشد..... ۲۸
۱-٤-۳. سازوکار فرآیند تداخل RNA..... ۲۹
۱-٤-٤. تداخل RNA در سلول های پستانداران..... ۳۰
۱-٤-٥. روشهای مختلف تولید siRNA در سلول های پستانداران..... ۳۲
۱-٤-٦. اصول طراحی siRNA..... ۳٦
۱-٥. وکتورهای تولید کننده shRNA..... ۳۷
۱-٦. روشهای انتقال ژن به سلول های جانوری..... ۳۹
۱-٦-۱. روشهای فیزیکی..... ٤۰
۱-٦-۱-۱. الکتروپوریشن..... ٤۰
۱-٦-۱-۲. میکرو اینجکشن..... ٤۰
۱-٦-۱-۳. بیولیستیک..... ٤۰
۱-٦-۲. انتقال بیولوژیکی ژن..... ٤۰
۱-٦-۳. سیستم های انتقال شیمیایی ژن..... ٤۱
۱-٦-۳-۱. روش کلسیم فسفات..... ٤۱
۱-٦-۳-۲. پلیمرهای کاتیونی..... ٤۱
۱-٦-۳-۳. لیپوزوم ها..... ٤۲
۱-٤-۷. کاربردهای تداخل RNA..... ٤۳
۱-٤-۷-۱. تداخل RNA ، ابزاری برای مطالعات ژنومیکس عملکردی..... ٤۳
۱-٤-۷-۲. تداخل RNA، امیدی برای توسعه روش های درمانی..... ٤٥
**۱-٥. هدف**..... **٤٦**
**فصل دوم: مواد و روش ها**..... **٤۸**
۲-۱. مواد و وسایل..... ٤۸
۲-۱-۱. آنزیم ها..... ٤۸
۲-۱-۲. بافرها..... ٤۸
۲-۱-۳. پلاسمیدها ..... ٤۹

۲-۱-٤. محیط های کشت..... ٤٩
۲-۱-٥. آنتی بیوتیک ها..... ٥٠
۲-۱-٦. کیت ها..... ٥٠
**۲-۱-۷. رده سلولی** ..... ٥٠
**۲-۱-۸. سایر محلول ها**..... ٥٠
۲-۱-۹. سایر مواد..... ٥۲
۲-۲. روش ها..... ٥۲
۲-۲-۱. تهیه پلاسمیدها به میزان مورد نیاز..... ٥۲
۲-۲-۱-۱. تکثیر پلاسمیدها..... ٥۲
۲-۲-۱-۲. تهیه باکتری مستعد..... ٥۳
۲-۲-۱-۳. آماده سازی پلاسمید جهت انتقال به باکتری..... ٥۳
۲-۲-۱-٤. دستورالعمل انتقال پلاسمیدها به باکتری مستعد..... ٥٤
۲-۲-۱-٥. فریز باکتری حاوی پلاسمید..... ٥٤
۲-۲-۱-٦. تخلیص پلاسمیدها..... ٥٤
۲-۲-۱-۷. روش تخلیص پلاسمیدها..... ٥٥
۲-۲-۱-۸. ارزیابی کمی و کیفی پلاسمید تخلیص شده..... ٥٦
۲-۲-۱-۹. تائید پلاسمیدها..... ٥٦
۲-۲-۲. تهیه رده سلولی مورد نیاز..... ٥۷
۲-۲-۲-۱. انتخاب رده سلولی مناسب..... ٥۷
۲-۲-۲-۱-۱. کشت رده های سلولی برای انتخاب بهترین رده سلولی..... ٥۷
۲-۲-۲-۲. پاساژ سلول ها..... ٥۷
۲-۲-۲-۳. شمارش سلولی..... ٥۷
۲-۲-۲-٤. فریز کردن سلول ها..... ٥۸
۲-۲-۲-٥. روش ذوب نمودن سلول های منجمد..... ٥۸
۲-۲-۳. آزمون تداخل RNA مبتنی بروکتور علیه ژن IGF-IR در جمعیت سلولی SW480 بیان کننده IGF-IR..... ٥۹
۲-۲-۳-۱. آماده سازی سلول ها جهت انجام ترانسفکشن پلاسمیدهای siRNA..... ٥۹

۲-۲-۳-۲. تهیه کمپلکس ترانسفکشن و به دست آوردن نسبت اپتیمم پلاسمید و Reagent FuGENE HD Transfection جهت به دست آوردن بالاترین کارآرایی انتقال ژنی.....۵۹
۲-۲-۳-۳. انجام آزمون تداخل RNA جهت خاموشی ژن IGF-IR در سلول هایSW480 .....۵۹
۲-۲-۳-٤. بررسی نتایج انجام آزمون تداخل RNA بر روی بیان ژن IGF-IR.....٦١
۲-۲-۳-٤-۱- تخلیص RNA توتال با استفاده از QIAGEN RNeasy plus mini kit.....٦١
۲-۲-۳-٤-۱-۱. ارزیابی کمی و کیفی RNA های به دست آمده از سلول های کنترل و ترانسفکت شده.....٦٣
۲-۲-۳-٤-۲- ساخت DNA، با استفاده از کیت First Strand cDNA Synthesis Kit.....٦٤
۲-۳-٤-۳. تکنیک PCR.....٦٥
۲-۳-٤-۳-۱. طراحی پرایمر.....٦٥
۲-۳-٤-۳-۲. یافتن دمای Annealing مناسب برای پرایمرها.....٦٦
۲-۳-٤-۳-۳. روش کار در تکنیک PCR.....٦٧
۲-۳-٤-۳-٤. کنترل ها در PCR.....٦٧
۲-۳-٤-۳-٥. الکتروفورز نمونه های PCR شده بر روی ژل آگازر.....٦٨
۲- ۲- ۳ -٥. بررسی نتایج انجام آزمون تداخل RNA بر روی بیان پروتئین IGF-IR .....٦٨
۲- ۲- ۳- ٥-۱. جمع آوری و لیز سلول ها.....٦٨
۲- ۲- ۳- ٥- ۲. غلظت سنجی پروتئین.....٦٩
۲- ۲- ۳- ٥- ۲-۱. روش برادفورد.....٦٩
۲- ۲- ۳- ٥- ۲-۱. تهیه غلظت های کاری محلول استاندارد پروتئین.....٦٩
۲- ۲- ۳- ٥- ۳. سنجش غلظت پروتئین در لیزات سلول ها با استفاده از الایزا .....۷۰
۲- ۲- ۳- ٥- ۳-۱. اساس کار کیت الایزا.....۷۰
۲- ۲- ۳- ٥- ۳-۲. انجام الایزا.....۷۱
۲-۲- ٤. مطالعات بیولوژیکی سلول ها جهت بررسی اثرات خاموشی ژن IGF-IR.....۷۲
۲-۲-٤-۱. رسم منحنی رشد سلول های ترانسفکت شده و کنترل ها.....۷۲

۲-۲-٤-۲. اندازه گیری رشد سلولی با استفاده از MTT و به دست آوردن cell viability.....۷۲
۲-۲-٤-۳. آنالیز چرخه سلولی با کمک تکنیک فلوسیتومتری.....۷۳
۲-۲-٤-۳-۱. آنالیز سلول های رنگ آمیزی شده با کمک دستگاه فلوسیتومتر .....۷٤
۲-۲-٤-٤. بررسی حساسیت سلول های ترانسفکت شده و کنترل نسبت به داروی 5- فلوئورو اوراسیل و محاسبه $IC_{50}$ سلول ها.....۷۵
۲-۲-٤-۵. بررسی حساسیت سلول های ترانسفکت شده و کنترل نسبت به ionizing radiation.....۷۵
فصل سوم: نتایج.....۷۷
۳-۱. تهیه پلاسمیدهای pkD-shRNA-IGF-IR-V2 و pkD-shRNA-NegCon-V1 .....۷۸
۳-۱-۱. ارزیابی کمی تخلیص پلاسمیدها.....۷۸
۳-۱-۲. ارزیابی کیفی تخلیص پلاسمیدها.....۷۸
۳-۱-۳. تائید هویت پلاسمیدهای تخلیص شده.....۷۸
۳-۲. تعیین رده سلولی مناسب برای بیان IGF-IR.....۸۱
۳-۲-۱. الکتروفورزRNA توتال.....۸۱
۳-۲-۲. ساخت cDNA وPCR گرادیانت ژن IGF-IR در سلول های HT29 وSW480.....۸۲
۳-۳. آزمون تداخل RNA مبتنی بر وکتور.....۸۳
۳-۳-۱.آماده سازی سلول ها جهت انجام ترانسفکشن پلاسمیدهای siRNA.....۸۳
-۳-۲. بررسی کارآرایی انتقال ژنی با به دست آوردن نسبت اپتیمم وکتور پلاسمید ی و Reagent FuGENE HD Transfection.....۸٤
۳-۳-٤. نتایج حاص از انجام آزمایش تداخل RNA جهت خاموشی ژن IGF-IR.....۸٦
۳-۳-٤-۱. تائید کمی وکیفی RNA توتال به دست آمده از سلول های ترانسفکت شده وکنترل.....۸٦
۳-۳-٤-۲. ساخت cDNA و PCR ژن های IGF-IR و بتا اکتین از رویRNA توتالهای به دست آمده از سلول های ترانسفکت شده و کنترل.....۸۷
۳-۳-٤-۳. آنالیز نیمه کمی RT-PCR نمونه ها با استفاده از نرم افزارUVI-TEC.....۸۹
۳-٤. بررسی نتایج انجام آزمون تداخل RNA بر روی بیان پروتئین IGF-IR .....۹۱

۳-۵-. رسم منحنی رشد سلول های ترانسفکت شده و کنترولها.....۹۳
۳-٦. بررسی پرولیفراسیون سلولی حاصل از خاموشی ژن IGF-IR با استفاده از MTT...۹٤
۳-۷. تغییرات در چرخه سلولی به دنبال مهار IGF-IR.....۹۵
۳-۸. ارزیابی اثرات خاموشی ژن IGF-IR بر حساسیت سلول های SW480 به پرتو دهی یونیزان.....۹۸
۳-۹. ارزیابی حساسیت سلول ها به عوامل دارویی در اثر خاموشی ژن IGF-IR.....۱۰۱
فصل چهارم: بحث، نتیجه گیری و پیشنهاد ها.....۱۰٤
٤-۱. بحث .....۱۰۵
٤-۲. نتیجه گیری.....۱۱۵
٤-۳. پیشنهاد ها.....۱۱٦
۵. فهرست منابع.....۱۱۷
٦. چکیده انگلیسی.....۱۳۲

# فهرست جداول

جدول ۱-۱. تقسیم بندی مراحل کلینیکی سرطان کولون.....۴
جدول۳-۱. آنالیز نیمه کمی RT-PCR نمونه های حاصل از سلول های ترانسفکت شده و کنترل با استفاده ار نرم افزارUVI-TEC.....۹۰
جدول ۳-۲. نتایج فلوساتومتری.....۹۶
جدول ۳-۳. ID50 سلول ها (کنترل وترانسفکت شده) و میزان افزایش حساسیت سلول های SW480 به پرتودهی یونیزان در اثر خاموشی ژن IGF-IR توسط pkD-shRNA-IGF-IR-V2.....۱۰۰
جدول ۳-٤. IC50 سلول ها (کنترل وترانسفکت شده) و میزان افزایش حساسیت سلول های SW480 به 5-FU در اثر خاموشی ژن IGF-IR توسط pkD-shRNA-IGF-IR-V2.....۱۰۳

# فهرست شکل ها


شکل ۱-۱. قسمت های مختلف کولون..... ۲

شکل۱-۲. مسیرهای اثرات مولکولی پرتودهی بر روی سلول..... ۱۷

شکل۱-۳. نقش IGF-IR در ایجاد سرطان کولون..... ۱۹

شکل۱-۴. رویکردهای مختلف هدف دهی IGF-IR..... ۲۶

شکل۱- ۵. تصویر سازوکار فرآیند تداخل RNA..... ۳۰

شکل ۱-۶. مسیر های بیوشیمیایی dsRNA، miRNA وsiRNA..... ۳۰

شکل ۱- ۷. سه روش عمده تولید RNAi و مکانیسم عمل آنها..... ۳۶

شکل ۱- ۸. نمای شماتیک از مولکول siRNA..... ۳۷

شکل۱-۹. پلاسمید pkD و روش کار آن..... ۳۹

شکل۳-۱. الکتروفورز پلاسمیدهای تخلیص شده..... ۷۹

شکل ۳-۲. نقشه کلی وکتورهای پلاسمیدی pkD به کار رفته در این تحقیق..... ۷۹

شکل۳-۳. الکتروفورز هضم وکتورها توسطPVUII..... ۸۰

شکل ۳-٤. الکتروفورز RNAتوتال در سلول های HT29 و SW480..... ۸۱

شکل۳-۵. الکتروفورز محصول PCR گرادیان IGF-IR و بتا اکتین در سلول های HT29..... ۸۲

شکل ۳-٦. الکتروفورز محصول PCR گرادیانIGF-IR و بتا اکتین در سلول های SW48..... ۸۳

شکل ۳-۷ عکس های فلورسنت حاصل از ترانسفکشن EPGFP-C1 در نسبتهای مختلف با ماده ترانسفکتنت..... ۸۵

شکل۳-۸. کنترل کیفی RNA های توتال استخراج شده از سلول های ترانسفکت شده و کنترل..... ۸۷

شکل ۳-۹. اثر RNA مداخله گر علیه ژن IGF-IR با استفاده از وکتور PKD-shRNA-IGF-1R -V2 در RT-PCR..... ۸۸

شکل ۳-۱۰. نتیجه الایزا ی پروتئین در سلول های ترانسفکت شده و کنترل..... ۹۲

شکل ۳-۱۱. نمودار رشد در سلول های ترانسفکت شده و سلول های کنترل.....۹۳
شکل ۳-۱۲. شکل ۳-۱۲. تغییرات در پرولیفراسیون سلولی به دنبال ترانسفکشن سلول ها با pkd-shRNA-IGF-IR-V2 در مقایسه با سلول های کنترل.....۹٤
شکل ۳-۱۳. هیستوگرام توزیع سلول های ترانسفکت شده و کنترل در فازهای مختلف سلولی.....۹۷
شکل۳-A۱٤. پاسخ های پرتودهی در سلول های کنترل و ترانسفکت شده به صورت کاهش رشد(۲٤ پس از پرتودهی).....۹۹
شکل۳-B۱٤ . پاسخ های پرتودهی در سلول های کنترل و ترانسفکت شده به صورت کاهش رشد (٤۸ پس از پرتودهی).....۹۹
شکل۳-C۱٤. پاسخ های پرتودهی در سلول های کنترل و ترانسفکت شده به صورت کاهش رشد(۷۲ پس از پرتودهی).....۱۰۰
شکل ۳-۱۵. منحنی مهار رشد سلولی در حضور غلظت های فزاینده 5-FU در سلول های ترانسفکت شده و کنترل.....۱۰۲

# فصل ۱

# مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته

## ۱-۱. سرطان کولون

روده بزرگ یا کولون[1] و رکتوم[2] قسمت های آخر دستگاه گوارشی می باشند که از انتهای روده کوچک شروع شده و به آنوس ختم می گردند. کولون از یک ساختمان شبه لوله عضلانی تشکیل شده است که طول آن در بزرگسالان ۱۵۲سانتی متر و قطر آن ۱۴ سانتی مترمی باشد. کولون اولین و بزرگترین قسمت روده بزرگ بوده و دارای چهار قسمت کولون صعودی ، کولون متقاطع، کولون نزولی و کولون سیگموئید می باشد که از کولون صعودی شروع و از طریق سیگموئید به رکتوم وصل می شود(شکل۱). عملکرد کولون هضم باقیمانده غذا و تبدیل آن به انرژی، احتباس آب و مواد معدنی و دفع مواد زاید می باشد[۱و۲].

سرطان کولون معمولا به طور آهسته در طول سالیان ایجاد می گردد. قبل از اینکه سرطان واقعی به وجود آید به صورت یک پولیپ غیر سرطانی بروز می کند که ممکن است در نهایت به سرطان تغییر یابد. پولیپ، رشد بافت روی یک لایه از کولون می باشد. انواع خاصی از پولیپ ها به نام پولیپ های آدنوماتوز و آدنوما با احتمال زیادی سرطانی می شوند. بیش از ۹۵ درصد سرطان کولون آدنوکارسینوما هستند که از بافت غده ای نشات می گیرند[۱- ۳].

سرطان کولون سومین سرطان شایع و دومین سرطان کشنده در جهان می باشد، به طوریکه آمار موجود در آمریکا تعداد مبتلایان به این بیماری را در سال ۲۰۰۵ در حدود ۱۴۵۰۰۰ مورد نشان می دهد که میزان مرگ و میر در این تعداد افراد در حدود ۵۵۰۰۰ نفر گزارش شده است[ ۳-۵]. در گزارشی دیگر در اروپا، حدود ۱۵-۸ در صد تومورهای بدخیم بزرگسالان را این بیماری تشکیل می

[1]Colon
[2]Rectum