بسم اللہ الرحمن الرحیم

دانشگاه علوم پزشکی و
خدمات بهداشتی، درمانی استان اردبیل
دانشکده پزشکی

# پایان نامه جهت دریافت کارشناسی ارشد (MSc)

## رشته بیوشیمی بالینی

عنوان:

**بررسی تغییرات برخی از فاکتورهای آپوپتوتیک در سلول‌های سومایت جنین جوجه به دنبال هم‌کشتی با نوتوکورد**

اساتید راهنما:

**دکتر محسن سقا**

**دکتر محمد مأذنی**

استاد مشاور :

**دکتر محمد قاسم گل محمدی**

نگارش :

**رزگار رهبری**

سال تحصیلی:

**شهریور-۱۳۹۰**

# با تقدیر و تشکر فراوان از

**زحمات استاد گرانقدر جناب آقای دکتر محسن سقا و همچنین اساتید بزرگوار جناب آقای دکتر محمد ماذنی، دکتر محمد قاسم گل محمدی و دکتر نوروز نجف زاده، که تا پایان تحقیق بنده را همیاری نمودند.**

**همچنین تشکر ویژه دارم از خانواده گرانقدرم و دوستان عزیزم که در تمام این سال ها یار و یاور من بوده اند.**

## چکیده

**مقدمه** : سومایتها توده هایی از سلولهای مزودرمی در طرفین لوله عصبی هستند که به دنده ها، مهره ها و عضلات تمایز می یابند. نوتوکورد نیز به عنوان مزودرم محوری در زیر لوله عصبی در محیط بدن سبب بقاء و تمایز سلول‌های سومایتی می شود. هدف از این مطالعه، بررسی نقش آنتی آپوپتوتیک نوتوکورد در محیط آزمایشگاهی به دنبال هم کشتی با سومایت جنین جوجه بود.

**مواد و روشها:** پس از جداسازی سومایت‌ها و نوتوکوردها از جنین جوجه مراحل ۷-۱۲ سومایتی، نوتوکوردها در قطرات آلژینات قرار داده شده و به نسبت ۱:۲ با سومایتها (۲ عدد سومایت: ۱ عدد نوتوکورد) در محیط کشت DMEM/F12+٪۱۰FBS به مدت ۲ ، ٤ ، ٦ ، ۱۰ روز هم کشتی داده شدند. در گروه دوم سومایتها با محیط فراهم شده از نوتوکورد و در گروه کنترل نیز سومایتها بدون نوتوکورد کشت داده شدند. در نهایت میزان حیات و تکثیر سومایت‌های همه گروهها به روش MTT و میزان بیان ژنهای مختلف به روش RT-PCR و سنجش فعالیت آنزیم Caspase2 به روش اسپکتروفتومتری مورد ارزیابی قرار گرفتند.

**نتایج** : درصد سلول‌های زنده بر اساس روز صفر سومایت‌ها در روز ۲ برای گروههای سومایت همراه با نوتوکورد ، سومایت بدون نوتوکورد و سومایت حاوی CM به ترتیب ٪۵۹ ، ٪۵۱/۳ و ٪٦٤/۱ بود ، برای روز ٤ همانند ترتیب بالا ٪۷٤/٤ ، ٪۲۸/۲ و ٪۵۱/۳ و بعد از ٦ روز هم‌کشتی درصد سلول‌های زنده به ترتیب ٪۸۹/۷ ، ٪۵۳/۸ و ٪۳۵/۹ برآورد شد. نتایج RT-PCR نشان داد که در گروه حاوی نوتوکورد *Caspase2* بیان نشده و بیان *Bcl2* نیز شدیدتر از سایر گروهها بود. در گروه سومایت حاوی نوتوکورد بیان بیشتر *Pax1* همزمان با کاهش بیان *MyoD* مشاهده گردید. یافته های اسپکتروفتومتری نیز نشان داد میران فعالیت آنزیم Caspase-2 در گروههای سومایت حاوی نوتوکورد، سومایت بدون نوتوکورد به ترتیب فعالیت آنزیم۱/۲و۱/۵ برابر سومایت های روز صفر بود.

**نتیجه گیری:** نوتوکورد در محیط آزمایشگاهی و در شرایط هم‌کشتی باعث بقـا سـلول‌هـای سـومایتی و کاهش آپوپتوز می شود و در تمایز سلول‌های سومایتی به سلولهای اسکلروتومی نقش دارد .

**واژگان کلیدی** : هم‌کشتی ، نوتوکورد ، سومایت ، آپوپتوز ، جنین جوجه .

## اختصارات

| | |
|---|---|
| SHH | Sonic hedgehog |
| FGF | Fibroblast growth factor |
| BMP4 | Bone morphogenetic protein |
| RA | Retinoic acid |
| TGF-β | Transforming growth factor β |
| CM | Condition medium |
| HSPGS | Heparan sulfate proteoglycans |
| Bcl2 | B-cell lymphoma 2 |
| Caspase | Cystein-dependent aspartat specific proteas |
| DR | Death reseptor |
| DED | Death effect domain |
| Disc | Death inducing signaling complex |
| MTT | Methyl thiazolyl blue tetrazolium bromide |
| PSM | Presomitic mesoderm |
| PBS | Phosphate buffer sulfate |
| L15 | Leibovit'z 15 |
| EDTA | Ethylenediaminetetraacetic acid |
| FBS | Fetal Bovine Serum |
| NEAA | Non- essential amino acid |
| Pen/Strep | Penicillin / streptomycin |
| RT-PCR | Reveres transcription- polymerase chain reaction |
| TBE | Tris borate EDTA |

## فهرست مطالب

عنوان صفحه

**فصل اول: کلیات**


**۱-۱ سومایت و سومایت زایی** ..... ۱

۱-۱-۱ مزودرم پیش سومایتی ..... ۲

۱-۱-۲ سومایت زایی ..... ۳

۱-۱-۳ تشکیل سومایت ..... ۵

۱-۱-٤ تمایز سومایت‌ها ..... ٦

۱-۱-۵ مورفوژنهای حاصل از مزودرم پاراگزیال ..... ۷

**۱-۲ نوتوکورد** ..... ۸

۱-۲-۱ منشاء نوتوکورد ..... ۸

۱-۲-۲ مکانیسم‌های مولکولی درگیر در تشکیل نوتوکورد ..... ۱۰

۱-۲-۳ اعمال نوتوکورد ..... ۱۱

۱-۲-٤ سرنوشت نوتوکورد ..... ۱۲

**۱-۳ SHH** ..... ۱۲

۱-۳-۱ مسیر پیام رسانی SHH ..... ۱٤

**۱-٤ Gli** ..... ۱۶

**۱-۵ آپوپتوزیس** ..... ۱۷

۱-۵-۱ مکانیسم و مولکول های دخیل در آپوپتوز ..... ۱۹

۱-۵-۲ کسپازها ..... ۱۹

۱-۵-۳ آپوپتوز دو مسیر خارجی و داخلی دارد ..... ۲۰

۱-۵-٤ BCL 2 ..... ۲۳

**۱-٦ اثرات نوتوکورد و SHH** ..... ۲٤

**۱-۷ هم‌کشتی** ..... ۲٦


**فصل دوم : اهداف و فرضیات**


**۲-۱ ضرورت اجرای طرح** ..... ۲۸

**۲-۲ اهداف** ..... ۲۹

۲-۲-۱ هدف کلی طرح ..... ۲۹

۲-۲-۲ اهداف اختصاصی ..... ۲۹
۳-۲-۲ اهداف کاربردی ..... ۳۰
٤-۲-۲ فرضیات یا سؤالات تحقیق ..... ۳۰
**فصل سوم : مواد و روشها**
**۱-۳ مواد و دستگاهها** ..... ۳۱
**۲-۳ روشها** ..... ۳٦
۱-۲-۳ انکوباسیون تخم مرغ و جدا سازی جنین جوجه از تخم مرغ ..... ۳٦
**۳-۳ قرار دادن نوتوکوردها در قطرات آلژینات** ..... ٤۰
**٤-۳ تهیه CM از نوتوکورد** ..... ٤۰
**٥-۳ گروههای مورد مطالعه** ..... ٤۰
**٦-۳ تست MTT** ..... ٤۱
۱-٦-۳ روش آزمایش ..... ٤۲
۲-٦-۳ فرایند آزمایش ..... ٤۲
**۷-۳ نسخه برداری معکوس واکنش زنجیره ای پلیمراز(RT-PCR)** ..... ٤۲
۱-۷-۳ استخراج RNA ..... ٤۲
۱-۱-۷-۳ تعیین غلظت RNA استخراج شده ..... ٤٤
۲-۷-۳ ساختن cDNA ..... ٤٤
۱-۲-۷-۳ مراحل انجام کار ..... ٤٤
۳-۷-۳ PCR ..... ٤٥
٤-۷-۳ تهیه ژل آگارز ..... ٤۸
۱-٤-۷-۳ طرز تهیه بافرTBE (5x) ..... ٤۸
۲-٤-۷-۳ طرز تهیه بافر EDTA (0.5M) ..... ٤۸
٥-۷-۳ الکتروفورز محصول PCR ..... ٤۹
**۸-۳ اسپکتروفتومتری** ..... ٤۹
۱-۸-۳ فرایند اسپکتروفتومتری ..... ٤۹
**فصل چهارم : نتایج**
**۱-٤ کشت سومایت‌ها و نوتوکوردهای جدا شده از جنین جوجه** ..... ٥۱

۲-٤ نتایج مشاهدات مورفولوژیکی ..... ٥١
۳-٤ نتایج **MTT** ..... ٥٢
٤-٤ نتایج **RT-PCR** ..... ٥٤
٥-٤ سنجش میزان فعالیت آنزیم **Caspase2** با روش اسپکتروفتومتری ..... ٥٥
**فصل پنجم : بحث و نتیجه گیری**
١-٥ هم‌کشتی بافتهای سومایتی و نوتوکورد جدا شده از جنین جوجه ..... ٧٠
٢-٥ تاثیر نوتوکورد بر روی حفظ حیات سومایت‌ها ..... ٧١
٣-٥ تاثیر نوتوکورد بر روی تمایز سومایت‌ها ..... ٧٧
٤-٥ نتیجه گیری ..... ٨٣
**فصل ششم: پیشنهادات**
**فصل هفتم : منابع**

# فهرست جداول و نمودارها

عنوان صفحه

جدول ۱-۳ . مراحل تکوین جنین جوجه بر اساس مدل هامبورگر - همیلتون ..... ۳۷

جدول ۲-۳. فهرست پرامرهای مورد استفاده همراه با تعداد جفت بازها( Base pair ; bp ) ، دمای Annealing ..... ٤۷

جدول ۱-٤. مقایسه میانگین درصد حیات سلولهای سومایتی در گروههای مختلف طی زمان های مختلف ..... ٦۷

جدول ۲-٤. حیات سلولهای نوتورکوردی طی ۲ تا ٦ روز کشت بر مبنی نوتوکوردهای تازه جدا شده ( روز صفر) برابر ٦۸

نمودار ۱-٤ . مقایسه درصد سلول‌های سومایتی زنده ..... ٦۷

نمودار ۲-٤ . مقایسه میزان فعالیت آنزیم Caspase2 ..... ٦۸

# فهرست اشکال

عنوان صفحه


شکل ۱-۳ . انکوبه کردن تخم مرغ ها ..... ۳۶

شکل۲-۳ . قرار دادن تخم مرغ‌ها در ظروف استریل ..... ۳۸

شکل ۳-۳ . شکل A جنین مرحله ۱۰ شکل B سومایت‌ها پس از جدا کردن از جنین ..... ۳۹

شکل ۱-٤ . نوتوکورد(A) و سومایت‌های(B) جدا شده از جنین جوجه مراحل ۱۲-۷ قبل از شروع هم‌کشتی (روز صفر)..... ٥٦

شکل ۲-٤ . سلول‌های سومایتی که همراه با نوتوکورد(A) ، بدون حضور نوتوکورد(B) و یا با CM بدست آمده از نوتوکورد (C) بـه مدت ۲ روز کشت ..... ٥٨

شکل ۳-٤ . سلول‌های سومایتی که همراه با نوتوکورد(A) ، بدون حضور نوتوکورد (B) و یا با CM بدست آمده از نوتوکورد (C) به مدت ٤ روز کشت ..... ٦٠

شکل ٤-٤. سلول‌های سومایتی که همراه با نوتوکورد(A) ، بدون حضور نوتوکورد(B) و یا با CM بدست آمده از نوتوکـورد (C) بـه مدت ٦ روز کشت ..... ٦٢

شکل ٥-٤. سلول‌های سومایتی که همراه با نوتوکورد(A) ، بدون حضور نوتوکورد(B) و یا با CM بدست آمده از نوتوکـورد (C) بـه مدت ۱۰ روز کشت ..... ٦٤

شکل ٦-٤. نوتوکورد ، ۲ روز (A) ، ٤ روز (B) و ٦ روز بعد از کشت (C) ..... ٦٦

شکل ۷-٤. بیان ژن های GAPDH، PAX3،BMP4،BCL2،CASPASE2،PAX1وMyoD در گروههای کنترل (سومایت روز صفر) ، سومایت بدون نوتوکورد و سومایت همراه با نوتوکورد پس از ٦ روز هم‌کشتی به روش RT-PCR..... ٦٩

# فصل اول

# کلیات

## ۱-۱ سومایت و سومایت زایی

در مهره دارن طی فرآیند گاسترولاسیون ، لایه مزودرمی که بین اکتودرم و آندودرم قرار دارد مزودرم سری(صفحه پره کودال[۱]) و کوردامزودرم[۲] (نوتوکورد) را در زیر لوله عصبی می سازد. مزودرم در طرفین لوله عصبی مزودرم پاراگزیال[۳]را به وجود می آورد که در پرندگان صفحه سگمنتال[٤]و در پستان دارانی مانند موش مزودرم قطعه قطعه نشده[٥] نامیده می‌شود[۱]. مزودرم در طول محور قدامی- خلفی بدن تقسیم می‌شود که مرز این دو قسمت در جنین پرندگان وزیکول شنوایی می‌باشد. در ناحیه سری[٦] نسبت به وزیکول شنوایی مزودرم پارگزیال سری[۷]تشکیل می‌شود که هیچ گونه حالت بند بندی[۸]از خود نشان نمی‌دهد و مزودرمی که نسبت به وزیکول شنوایی در ناحیه دمی تر قرار می‌گیرد مزودرم دمی (سومایت و مزودرم پیش سومایتی[۹]) نامیده می‌شود [۲].

سومایت‌ها نخستین بار توسط مالپیگی در قرن هفدهم در جنین جوجه شناسایی شدند . آنها نه تنها در جنین پرندگان و پستانداران بلکه در جنین مهره دارن بی آرواره[۱۰] و آرواره داران[۱۱] و در جنین سر طنابدرارن[۱۲]نیز وجود دارند و حضور آنها ویژگی ابتدایی مهره دارن محسوب می‌شود[٤,۳] آنها همچنین باعث ایجاد سگمنتاسیون[۱۳] در جنین می شوند[٥,٤] که این حالت را می توان به وضوح در ستون فقرات و عضلات مربوط به آن و نیز دستگاه عصبی محیطی مشاهده نمود[٦].

1- prechordal plate
2 -chord amesoderm
3- paraxial mesoderm
4- segmental plate
5-unsegmented mesoderm
6- rostral
7- paraxial head mesoderm
8- metamerization
9- presomitic mesoderm(PSM)
10- agnatha
11- anathostome
12- cephalochordata
13- segmantation