



دانشگاه علوم پزشکی و
خدمات بهداشتی درمانی استان اردبیل

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی

عنوان:

**تأثیر آنتی ژن های توموری حاوی پروتئین های شوک حرارتی در
حضور آگزوزوم های سلول های بنیادی مزانشیمال نوع 1 بر میزان
سلول کشتی لنفوسیت های T تحریک شده با سلول های
دندریتیک**

اساتید راهنما:

دکتر علی پناه مقدم

دکتر نوروز دلیرژ

استاد مشاور:

دکتر محمد مآذنی

نگارنده:

نسیم رحمانی کوکبا

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

تقدیم به:

خداوندی که از روی کرم، پدر و مادری فداکار نصیم ساخته تا در سایه درخت پربار وجودشان بیاسایم و از ریشه آن شاخ و برگ بگیرم و در سایه وجودشان در راه کسب علم و دانش تلاش نمایم. والدینی که وجودشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر وجودم، چرا که این دو وجود، پس از پروردگار، مایه هستی ام بوده اند، دستم را گرفتند و راه رفتن را در این وادی زندگی پر از فراز و نشیب به من آموختند. آموزگارانی که برایم زندگی، بودن و انسان بودن را معنا کردند. خواهی به من داده از عاطفه سرشار که وجودش برای من ترنم زندگیست.

و برادرانی که قلبان برای هم می تپد و بودنشان نبض زندگی من است.

تشکر میکنم از:

استاد عزیز و بزرگوارم جناب آقای دکتر نوروز دلیرز که در تمام مراحل انجام این پژوهش در کنارم بوده و پله پله اندیشیدن را به من آموخت و از کمک و همفکری شان بهره های فراوان بردم، بی نهایت متشکر و قدردانم.

از جناب آقای دکتر رضا علی پناه مقدم که زحمت راهنمایی این پایان نامه را بر عهده داشتند، و استاد مشاور محترم جناب آقای دکتر محمد ماذنی کمال سپاس را دارم.

از جناب آقای دکتر نقی زاده که با عنایت و لطفشان بنده را در امر تصحیح و تکمیل آن یاری نمودند.

همچنین از مسئول محترم آزمایشگاه ایمنی شناسی جناب آقای مهندس علیاری که در طی اجرای این تحقیق، همکاری دلسوزانه ای با من داشتند و در تمام مراحل از هیچ مشورت و کمکی دریغ نکرده اند.

و در خاتمه از دوستان گرانقدر که مرا در انجام این تحقیق یاری و همراهی نمودند، قدردانی و تشکر می نمایم.

باشد که خداوند عزوجل به عزت این عزیزان بیفزاید..

تأثیر آنتی ژن های توموری حاوی پروتئین های شوک حرارتی در حضور
اگزوزوم های سلول های بنیادی مزانشیمال نوع 1 بر میزان سلول کشی لنفوسیت
های T تحریک شده با سلول های دندریتیک

چکیده:

مقدمه: ایمونوتراپی سرطان یک روش درمانی امیدوارکننده برای فعال کردن سیستم ایمنی علیه سلول های توموری می باشد. مطالعات اخیر نشان می دهد که کمپلکس پروتئین شوک حرارتی-آنتی ژن در هدایت و عرضه آنتی ژن ها از طریق MHC class I و القاء پاسخ های سلول های TCD8+ نقش مهمی دارند. از آنجاییکه شواهد مطالعاتی اخیر بیانگر این است که سلول های بنیادی مزانشیمال تحریک شده با TLR-4 فاکتورهای پیش التهابی آزاد می کنند و میکروویکل های (MVs) مشتق از MSC، در مقایسه با خود MSC، علاوه بر ایجاد سیگنال های قوی، با ثبات تر بوده و با گذشت زمان

ح

عملکرد خود را از دست نمی دهند، در این مطالعه بر آن شدیم از سلول های دندریتیک حاصل از منوسیت های خون محیطی برای تحریک لنفوسیت های T در حضور MV های مشتق از MSC1 در سرطان گلیال رت بطور *In vitro* استفاده کنیم.

روش ها: رده توموری B92 کشت و به مدت 90 دقیقه برای تهیه عصاره توموری در بن ماری C 43⁰ قرار گرفت. در مرحله بعد پس از جداسازی، تکثیر و تیمار سلول های بنیادی مزانشیمال، MV ها با اولتراسانتریفوژ مختلف جدا شدند. سلول های T جدا شده از سلول های غیر چسبیده در طول روند تولید MoDC، با DC اختصاصی تومور در حضور میکروویکول های مشتق از MSC انکوبه شدند. در مرحله آخر سلول های توموری و لنفوسیت های T در پلیت 96 خانه به منظور سنجش لیز ویژه توسط فلوسایتومتری، انکوبه گردیدند.

نتایج: نتایج بدست آمده نشان داد که سلول کشی سلول های T تحریک شده با آنتی ژن توموری و MV مشتق از MSC1، سلول های توموری بیشتری را از بین می برد ولی این افزایش در میزان مرگ سلول های توموری نسبت به گروه های کنترل معنی دار نمی باشد ($P > 0.05$).

نتیجه گیری: با انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه، شاید در آینده بتوان امید داشت که آنتی ژن های توموری حرارت دیده به همراه MV های مشتق از MSC1 اثر بهتری در میزان سلول کشی لنفوسیت T داشته باشند.

واژه های کلیدی: کمپلکس آنتی ژن- HSP، MSC1، اگزوزوم، لنفوسیت T، سلول دندریتیک

فهرست مطالب

1	فصل اول: طرح تحقیق.....
2	1-1-مقدمه و بیان مسئله
5	2-1-تعریف واژه ها
5	3-1-اهداف.....
6	4-1-فرضیات
7	فصل دوم: پیشینه تحقیق
7	1-2-گلیوما
8	2-2-ایمونوتراپی
9	1-2-2-آنتی ژن های توموری
10	2-2-2-شناسایی آنتی ژن های توموری.....
12	3-2-لنفوسیت T سایتوتوکسیک CD8+.....
12	1-3-2-اعمال اجرایی لنفوسیت T سایتوتوکسیک CD8+
13	2-3-2-پاسخ ایمنی ذاتی لنفوسیت T به تومورها
15	4-2-پروتئین های شوک حرارتی و سرطان.....
17	5-2-سلول های دندریتیک

- 17 1-5-2- بیولوژی سلول های دندرتیک
- 18 2-5-2- عرضه آنتی ژن و تحریک لنفوسیت T
- 23 3-5-2- سلول دندرتیک و بیماری ها
- 26 4-5-2- سلول های دندرتیک و ایمونوترای سرطان
- 32 6-5-2- تولید سلول های دندرتیک در شرایط آزمایشگاهی
- 36 6-2- سلول های بنیادی
- 37 7-2- سلول های بنیادی مزانشیمال (MSC)
- 38 1-7-2- منبع سلول های بنیادی مزانشیمال
- 39 2-7-2- جداسازی سلول های بنیادی مزانشیمال
- 40 3-7-2- آنتی ژن های فنوتیک سلول های بنیادی مزانشیمال
- 41 4-7-2- استفاده درمانی از سلول های بنیادی مزانشیمال
- 41 5-7-2- سلول بنیادی مزانشیمال و سرطان
- 45 6-7-2- محدودیت های استفاده از سلول های بنیادی مزانشیمال
- 47 8-2- اگزوزوم
- 49 1-8-2- فرایند تشکیل اگزوزوم ها
- 50 2-8-2- ترکیب اگزوزوم ها
- 52 3-8-2- مکانیسم عملکرد اگزوزوم ها
- 57 9-2- انواع مرگ سلولی
- 58 1-9-2- آپوپتوز
- 59 1-1-9-2- مسیرهای آپوپتوزی

- 63 10-2-فلوسایتومتري
- 74 فصل سوم: شیوه اجرای تحقیق
- 76 1-3-تهیه عصاره سلول های توموری از سوسپانسیون سلولی B92
- 78 1-1-3- کشت رده سلولی سرطانی B92
- 80 2-1-3- دمادهی سلول های B92
- 80 3-1-3- تهیه عصاره سلول های توموری
- 81 4-1-3- تعیین میزان پروتئین
- 82 2-3- کشت سلول های بنیادی مزانشیمال (MSC)
- 83 1-2-3-جداسازی و کشت MSC
- 84 2-2-3-ایجاد سلول های MSC1
- 85 3-2-3-جداسازی و خالص سازی آگزوزوم
- 86 4-2-3-بررسی مورفولوژی و اندازه آگزوزوم ها
- 87 3-3-تهیه سلول های دندریتیک
- 89 1-3-3-خونگیری
- 90 2-3-3-جداسازی سلول های تک هسته ایی خون محیطی
- 91 3-3-3-تولید سلول های دندریتیک (DC)
- 92 4-3-3-بررسی شکل و اندازه سلول های دندریتیک در طی مراحل تمایز
- 92 5-3-3-حساس سازی لنفوسیت های T
- 93 4-3-سنجش قدرت لیز لنفوسیت های T حساس شده
- 95 1-4-3-اضافه کردن لنفوسیت T تحریک شده به محیط کشت سلول های B92

95 3-4-2-آزمایش سنجش قدرت لیز

98 3-5-روش تجزیه تحلیل داده ها و بررسی آماری

98 فصل چهارم: نتایج

102 4-1-بررسی مورفولوژیک سلول های دندریتیک

103 4-2-مورفولوژی سلول های بنیادی مزانشیمال

105 4-3-مورفولوژی و اندازه آگزوزوم ها

106 4-5-تولید لنفوسیت های T اختصاصی به آنتی ژن توموری

106 4-6-بررسی میزان سلول کشی لنفوسیت های T

116 فصل پنجم: بحث، نتیجه گیری

117 5-1-بحث

126 5-2-نتیجه گیری

126 5-3-محدودیت ها

127 5-4-پیشنهادات

128 5-5-منابع

فهرست اشکال، جداول و نمودار

20 شکل 2-1. اتصال پروتئین های استرس به گیرنده های اختصاصی در سطح DC.

21 شکل 2-2. بلوغ و مهاجرت سلول های دندریتیک.

27 شکل 2-3. ایمونوتراپی با استفاده از سلول های دندریتیک.

34 شکل 2-4. دو مسیر مختلف تولید سلول های دندریتیک.

- شکل 2-5. طرح ساده از تولید سلول های دندریتیک 35
- شکل 2-6. جداسازی سلول های بنیادی مزانشیمال از مغز استخوان بالغ. 39
- جدول 2-1. انواع مختلف وزیکل های غشایی. 48
- شکل 2-7. پروسه شکل گیری آگزوزوم ها 50
- شکل 2-8. ترکیب پروتئینی یک آگزوزوم متعارف. 52
- شکل 2-9. تعامل بین وزیکل های ترشحی غشایی و سلول های گیرنده 54
- شکل 2-10. تعامل های مختلف وزیکل های غشایی با سلول های ایمنی 55
- تصویر 1-4: شکل سلول های دندریتیک تولید شده 103
- تصویر 2-4. کشت سلول مزانشیم رت 104
- تصویر 3-4. تصویر میکروسکوپ الکترونی آگزوزوم ها 105
- نمودار 1-4. نتایج حاصل از روش فلوسایتومتری 108
- نمودار 2-4. مقایسه کاهش زنده مانی در سلول های هدف 108
- نمودار 3-4. مقایسه آپوپتوز و نکروز در سلول های هدف 109
- نمودار 4-4. مقایسه آپوپتوز اولیه و تأخیری در سلول های هدف 109
- نمودار 5-4. مقایسه قدرت لیز سلول های هدف 110
- شکل 4-4. نمونه ایی از نمودار هیستوگرام 111