دانشگاه علوم پزشکی و
خدمات بهداشتی درمانی استان اردبیل

وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی

عنوان:

اثر ۲،۴ دی کلروفنوکسی استیک اسید بر بقا و آپوپتوز سلول های فیبروبلاست مشتق از سیستم عصبی محیطی موش صحرایی

اساتید راهنما:

دکتر علی نیاپور

دکتر محمد مأذنی

استاد مشاور:

دکتر سید فرشاد حسینی شیرازی

نگارنده:

مرضیه شریفی پاسندی

شماره پایان نامه: ۰۱۹

شهریور ۱۳۹۵

بسم الله الرحمن الرحیم

به نام یگانه خالق هستی

تقدیم به:

محضر ارزشمند سنگ صبورم، بهترین دوست زندگیم

پدر عزیزم

او که جرأتم می بخشد، روشنم میدارد.

تقدیم به روح آسمانی

مادر عزیزم

او که از غرق شدن در دریای بی کران فداکاری و مهربانی اش محرومم.

تقدیم به

برادران و خواهر عزیزم

آنان که در تمام لحظات رفیقان راهم بودند.

و تقدیم به استاد بزرگوارم

جناب آقای دکتر علی نیاپور

او که با سعه ی صدرش آموخت مرا تا بیاموزم.

تقدیر و سپاس

سپاس ویژه دارم از انسانی فرهیخته که بعد از الطاف الهی، مرهون راهنمایی های دلسوزانه ایشان هستم؛

استاد بزرگوار و ارجمند راهنمای اول؛

جناب : آقای دکتر علی نیاپور

از راهنمایی‌های‌دلسوزانه ی استاد محترم راهنمای دوم؛

جناب: آقای دکتر محمد مأذنی

و مساعدت بی دریغ استاد محترم مشاور؛

جناب : آقای دکتر سید فرشاد حسینی شیرازی

کمال تشکر را دارم.

هم چنین از استاد ارجمند؛

جناب: آقای دکتر بهنام محمدی

بخاطر توجهات و محبت بی دریغشان سپاسگزارم.

از اساتید فرزانه ؛

جناب آقای دکتر نوروز نجف زاده، جناب آقای دکتر رضا علی پناه مقدم و جناب آقای دکتر پرهام محمدی

که زحمت داوری این رساله را متقبل شدند؛

صمیمانه تشکّر و قدردانی میکنم.

هم چنین از مساعدت کارشناس آزمایشگاه جناب آقای متولی و سرکار خانم حسین زاده

و از بذل محبتها و الطاف خالصانه ی تمام دوستان عزیزم؛

سرکار خانم ها سمیرا محمودی نیا، فریده منافی، مریم خدایی، شیما فراشی، آقایان یاور محمودزاده، آرش مهری و دانشجویان ارشد بیوشیمی بالینی ورودی ۹۳

کمال تشکر را دارم وامیدوارم با بضاعت مزجات بنده، این پایان‌نامه مقبول طبع دقیق و نکته‌سنج آنان و همه دانش پژوهان واقع شود.

مرضیه شریفی

تابستان ۱۳۹۵

اثر ۲،۴ دی کلروفنوکسی استیک اسید بر بقا و آپوپتوز سلول های فیبروبلاست مشتق از سیستم عصبی محیطی موش صحرایی

چکیده:

مقدمه: ۲و٤ دی کلروفنوکسی استیک اسید(2,4-D) اکسین سنتزی است که به طور انتخابی علف های هرز را در محیط اطراف منازل مسکونی و زمین های کشاورزی از بین می برد. مواجهه با 2,4-D و بروز تظاهرات بالینی سیستم عصب محیطی مانند دژنراسیون آکسونال و پلی نوروپاتی محیطی مساله ای نگران کننده است. اما شواهد کافی درباره ی مکانیسم آسیب 2,4-D به عصب محیطی در شرایط In vitro و In vivo وجود ندارد. این مطالعه با هدف بررسی مکانیسم سمیت 2,4-D در مجموعه ی سلول های عصب محیطی انجام شد.

مواد و روش کار: سلول های فیبروبلاست عصب محیطی، شوان، HGF2، HUVEC و سلول های تمایز یافته ی PC12 با غلظت های ۰/۱ میکرومولار تا ۵ میلی مولار ماده ی 2,4-D تیمار شدند. بقای سلولی و میزان رشد سلولی توسط تکنیک MTT و شمارش سلولی بررسی شد. توزیع جمعیت سلول ها در فازهای مختلف چرخه ی سلولی توسط تکنیک فلوسایتومتری ارزیابی شد. تغییرات مورفولوژیکی در سلول های آسیب دیده با رنگ آمیزی آکریدین اورنج/اتیدیوم بروماید و رنگ آمیزی DAPI بررسی شد. آپوپتوز توسط اندازه گیری فعالیت آنزیم های کاسپاز ۳ و۷ بررسی شد. تغییرات بیوشیمیایی آنزیم های آنتی اکسیدان SOD و GPx و هم چنین سطح MDA بعد از تیمار با 2,4-D مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج با استفاده از آنالیز آماری one-way ANOVA انجام شد.

نتایج: بقای سلول ها به طور قابل توجهی در غلظت های بالا به صورت وابسته به دوز طی مواجهه با 2,4-D کاهش یافت. 2,4-D باعث توقف سیکل سلولی در فاز G1 شد. ارزیابی تغییرات مورفولوژیکی با رنگ آمیزی DAPI و AO/EB افزایش در تعداد سلول های دچار آپوپتوز اولیه و ثانویه را نشان داد. آپوپتوز با افزایش فعالیت آنزیم های کاسپاز ۳ و ۷ به عنوان آنزیم های اجرایی مرگ برنامه ریزی شده ی سلولی تایید شد. فعالیت آنزیم GPx و میزان MDA افزایش و میزان SOD کاهش یافت.

نتیجه گیری: نتایج ما مشخص می کند که 2,4-D برای عوامل سلولی عصب محیطی در شرایط کشت سمی محسوب مـی شـود. سمیت 2,4-D وابسته به دوز است، چرا که باعث مهار رشد سلول در غلظت های پایین و عامل القـای آپوپتـوز در غلظـت هـای بالاتر می شود. نتایج ما شواهدی را فراهم می کند که می تواند تا حدودی نشان دهد که از بین رفتن هموستاز عصب محیطـی بـه دلیل نقص در ساختار سد خونی- عصبی می تواند مکانیسم پایه در ایجاد صدمه به عصب به دنبال مواجهه با 2,4-D باشد.

کلمات کلیدی: فیبروبلاست عصب محیطی، سلول شوان، 2,4-D، تزاید سلولی، آپوپتوز

	فهرست مطالب
صفحه	عنوان
	فصل اول: طرح تحقیق
۲	۱-۱- مقدمه.....
۳	۱-۲- بیان مساله.....
۵	۱-۳- اهداف، فرضیات و سوالات اساسی تحقیق.....
۵	۱-۳-۱- هدف اصلی.....
۵	۱-۳-۲- اهداف اختصاصی.....
۶	۱-۳-۳- فرضیات تحقیق .....
۶	۱-۳-۴- اهداف کاربردی.....
۷	۱-۳-۵- تعریف واژه.....
	فصل دوم : پیشینه تحقیق
۹	۲-۱- تعریف اکسین .....
۹	۲-۲- کاربرد اکسین در گیاهان.....
۱۰	۲-۳- کاربرد اکسین در درمان بیماری های سرطان.....
۱۱	۲-۴-2,4-D .....
۱۱	۲-۵- تاریخچه‌ی 2,4-D .....
۱۲	۲-۶- اشکال متنوع 2,4-D.....
۱۲	۲-۷- مواجهه انسان با 2,4-D.....
۱۳	۲-۸- سیستم عصب محیطی.....

عنوان	صفحه
۹-۲- نوروپاتی محیطی.....	۱۴
۱۰-۲- نوروپاتی سمی.....	۱۵
۱۱-۲- مسمومیت با ترکیبات ارگانوفسفره.....	۱۶
۱۲-۲- سمیت عصبی 2,4-D.....	۱۷
۱۳-۲- مکانیسم سمیت 2,4-D.....	۱۸
۱۴-۲- تشکیل متابولیت های فعال در سمیت 2,4-D.....	۱۸
۱۵-۲- چرخه‌ی سلولی.....	۱۹
۱۶-۲- استرس اکسیداتیو.....	۲۰
۱۷-۲- اکسیدان ها.....	۲۱
۱۸-۲- آنتی اکسیدان ها.....	۲۲
۱۹-۲- آپوپتوز.....	۲۳
۲۰-۲- تفاوت نکروز با آپوپتوز.....	۲۳
۲۱-۲- مسیر آپوپتوز	۲۴
۲۲-۲- مسیر خارج سلولی آپوپتوز.....	۲۵
۲۳-۲- مسیر داخل سلولی آپوپتوز.....	۲۶
۲۴-۲- تغییرات بیوشیمیایی آپوپتوز.....	۲۶
۲۵-۲- بررسی متون.....	۲۷
فصل سوم: مواد و روش ها	
۱-۳- نوع مطالعه.....	۳۲
۲-۳- ملاحظات اخلاقی.....	۳۲

عنوان	صفحه
۳-۳- مکان و زمان انجام مطالعه.....	۳۲
۳-۴- مواد و ترکیبات شیمیایی و کیت های آنزیمی مورد استفاده در تحقیق.....	۳۲
۳-۵- تجهیزات الکتریکی مورد استفاده.....	۳۴
۳-۶- نام ظروف و وسایل مورد استفاده.....	۳۴
۳-۷- رده های سلولی.....	۳۵
۳-۸- روش تهیه ی مواد استفاده شده در تحقیق.....	۳۵
۳-۸-۱- محلول PBS^- (1X)	۳۵
۳-۸-۲- محیط کشت DMEM (High Glucose)	۳۶
۳-۸-۳- محلول رنگی MTT (۵ mg/mL).....	۳۶
۳-۸-۴- محلول استاندارد DAPI با پایه PBS^- (۱۰ µg/ml).....	۳۷
۳-۸-۵- محلول استاندارد آکریدین اورنج (Acridin Orange, ۱۰۰ µg/ml).....	۳۸
۳-۸-۶- محلول استاندارد اتیدیوم بروماید (Ethidium Bromide, ۱۰۰ µg/ml)	۳۸
۳-۸-۷- محلول استاندارد (2,4-D, ۱ mol/L).....	۳۷
۳-۸-۸- محلول کلاژناز IV (۳ mg/mL).....	۳۸
۳-۸-۹- تری کلرواستیک اسید (۲۰٪ TCA).....	۳۸
۳-۸-۱۰- تیوباربیتوریک اسید (۶۷٪ TBA).....	۳۸
۳-۸-۱۱- محلول تریپان بلو ۰/۴ ٪	۳۸
۳-۸-۱۲- محلول بافر Tris-HCl (۱۰ mM).....	۳۹
۳-۸-۱۳- پارافرمالدهید ۴٪.....	۳۹

عنوان	صفحه
۹-۳- روش کار	۳۹
۱-۹-۳- کشت سلول های فیبروبلاست و شوان مشتق از سیستم عصبی محیطی موش صحرایی.....	۳۹
۱-۱-۹-۳- روش جراحی.....	۳۹
۲-۱-۹-۳- تهیه‌ی اکسپلنت و کشت اولیه.....	۴۰
۲-۹-۳- پاساژ سلول ها.....	۴۱
۳-۹-۳- تعویض محیط کشت.....	۴۲
۴-۹-۳- فریز کردن سلول ها.....	۴۲
۵-۹-۳- خارج کردن سلول ها از فریز.....	۴۳
۶-۹-۳- تمایز سلول های PC12 به سلول های عصبی.....	۴۳
۷-۹-۳- مواجهه ی سلول ها با ماده ی 2,4-D.....	۴۴
۸-۹-۳- روش سمیت MTT.....	۴۵
۹-۹-۳- تعیین درصد سلول های زنده با روش تریپان بلو.....	۴۶
۱۰-۹-۳- بررسی روند چرخه‌ی سلولی با تکنیک فلوسایتومتری.....	۴۷
۱۱-۹-۳- رنگ آمیزی با محلول DAPI.....	۴۸
۱۲-۹-۳- تکنیک رنگ آمیزی آکریدین اورنج-اتیدیوم بروماید (AO/EB)	۴۹
۱۳-۹-۳- بررسی فعالیت کاسپاز ۷و ۳ در روند آپوپتوز با استفاده از کیت Caspase-Glo® 3/7 Assay.....	۵۰
۱۴-۹-۳- ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) و سوپراکسیددیسموتاز (SOD).....	۵۱
۱۵-۹-۳- ارزیابی سطح مالون دی آلدهید	۵۳
۱۰-۳- آنالیز آماری.....	۵۴
فصل چهارم: نتایج	

عنوان	صفحه
۱-۴- کشت سلول های فیبروبلاست عصب محیطی و سلول های شوان.....	۵۶
۲-۴- تمایز سلول های PC12 به عصب	۵۷
۳-۴- تاثیر غلظت های مختلف 2,4-D بر میزان حیات سلول های فیبروبلاست عصب محیطی، سلول های شوان، رده های سلولی HUVEC، HGF2 و سلول های تمایز یافته‌ی عصبی رده‌ی PC12	۵۸
۴-۴- تاثیر ماده‌ی 2,4-D بر میزان کاهش رشد سلول های فیبروبلاست عصب محیطی با روش رنگ آمیزی تریپان بلو.....	۶۰
۵-۴- بررسی روند پیشرفت چرخه‌ی سلولی سلول های فیبروبلاست عصب محیطی با روش فلوسایتومتری.....	۶۱
۶-۴- بررسی اثر آپوپتوزی 2,4-D بر ریخت شناسی هسته‌ی سلول های فیبروبلاست عصب محیطی با استفاده از رنگ آمیزی DAPI	٦٤
۷-۴- بررسی اثر آپوپتوزی 2,4-D بر ریخت شناسی هسته سلول های فیبروبلاست عصب محیطی با استفاده از رنگ آمیزی آکریدین اورنج-اتیدیوم بروماید (AO/EB).....	۶۵
۸-۴- اثر ماده‌ی 2,4-D بر میزان سطح فعالیت آنزیم های کاسپاز ۳و۷ در سلول های فیبروبلاست عصب محیطی با استفاده از کیت Caspase-Glo 3/7.....	۶۷
۹-۴- بررسی میزان فعالیت آنزیم های آنتی‌اکسیدان GPx و SOD در سلول های فیبروبلاست عصب محیطی.....	۶۸
۱۰-۴- تعیین سطح مالون دی‌آلدهید به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی در سلول های فیبروبلاست عصب محیطی.....	۶۹
فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری	
۱-۵-بحث.....	۷۱
۲-۵- نتیجه گیری.....	۸۰
۳-۵- محدودیت ها.....	۸۰
۴-۵- پیشنهادات.....	۸۱
۵-۵- منابع.....	۸۲

فهرست تصاویر و نمودارها

تصویر۱-۳- تمایز عصبی سلول های رده ی PC12 به عنوان مدل سلول عصبی.....	۴۴
تصویر۲-۳- طرح زمانی جداسازی تخلیص سلول های فیبروبلاست عصب محیطی و شوان و فرایند تیمار سلول های PC12، HGF2، HUVEC، سلول فیبروبلاست عصب محیطی و شوان با ماده ی 2,4-D.....	۴۶
تصویر۱-٤- استخراج سلول های فیبروبلاست عصب محیطی و شوان.....	۵۷
تصویر۲-٤- تمایز سلول های PC12 به عصب	۵۸
تصویر۳-٤- تاثیر غلظت های مختلف 2,4-D بر میزان فعالیت متابولیکی سلول های فیبروبلاست عصب محیطی، شوان، سلول های رده‌ی HUVEC، HGF2 و سلول های تمایز یافته‌ی عصبی رده‌ی PC12 به روش MTT.....	۵۹
تصویر٤-٤- تعیین درصد سلول های زنده به روش رنگ آمیزی تریپان بلو.....	۶۱
تصویر٥-٤- Population histogram و فلوسایتومتری در سلول های فیبروبلاست عصب محیطی.....	۶۳
تصویر٦-٤- بررسی تغییرات ریخت شناسی هسته سلول های فیبروبلاست عصب محیطی پیرو تیمار با 2,4-D توسط رنگ آمیزی DAPI	۶۴
تصویر۷-٤- بررسی تغییرات مورفولوژیکی هسته سلول ها توسط رنگ آمیزی آکریدین اورنج-اتیدیوم بروماید.....	۶۶
تصویر۸-٤- بررسی میزان فعالیت کاسپاز های ۳ و ۷.....	۶۷
تصویر۹-٤- میزان فعالیت آنزیم های استرس اکسیداتیو در سلول های فیبروبلاست عصب محیطی.....	۶۸
تصویر۱۰-٤- میزان مالون‌دی‌آلدهید به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی در سلول های فیبروبلاست عصب محیطی.....	۶۹

فهرست علایم اختصاری

2,4-D	2,4-Dichlrophenoxy acetic acid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagla Medium
FCS	Fetal Calf Serum
DAPI	2-(4-amidinophenyl)-1H -indole-6 carboxamidine
ASA	Ascorbic Acid
NT-3	Neurotrophin-3
NB	Neuro Basal
PBS	Phosphate Buffered Saline
TBA	Thiobarbituric acid
TCA	Trichloroacetic Acid
PC12	Rat pheochromocytoma
HGF2	Human gingival fibroblast cells
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
PNS	Peripheral Nere System
IAA	Indol-3 Acetic Acid
CNS	Central nerve system
BNB	Blood Nerve Barrier
ABP-1	Auxin binding protein 1
HRP	Horseradish peroxidase
MS	Murashige and Skoog medium
DRG	Dorsal root ganglia
FBS	Fetal Bovin Serum
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide
AO	Acridine Orange
EB	Ethidium Bromide
TEP	1,1,3,3-Tetraethoxypropane
ITS	Insulin transferrin selenium

KOSR	Knockout Serum Replacement
ASA	Ascorbic Acid
MDA	Malondialdehyde
PFA	Paraformaldehyde
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
LDL	Low- density lipoprotein
HDL	High- density lipoprotein
˚C	Centigrade
SOD	Super Oxide Dismotase
PLO/L	Poly-L-ornithine/ Laminin
GPx	Glutathion Peroxidase