





دانشگاه علوم پزشکی و  
خدمات بهداشتی درمانی استان اردبیل

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی

عنوان:

اثر 2،4 دی کلرو فنوکسی استیک اسید (2,4-D) بر بقا و آپوپتوز سلول های

بنیادی مشتق از پالپ دندان انسانی

اساتید راهنما:

دکتر علی نیاپور

دکتر محمد مآذنی

نگارش و پژوهش:

سمیرا محمودی نیا

شماره پایان نامه: 025

پاییز 1395

## به نام خداوند لوح و قلم

ستایش مخصوص خداوندی است که درهای علم و دانش را برای آشنائی بار بوییت خویش بر روی ما  
گشوده است. خدا را بر احسان بزرگش، برهان آشکارش، فراوانی فضل و آنچه بدان بر من منت نهاده  
است، می ستایم.

از استاد ارجمند جناب آقای دکتر علی نیاپور که بارها همیانی های دلسوزانه خود، همواره راهنما و راه گشای من  
در امر پایان نامه بودند کمال قدر دانی را دارم.

از استاد فریخته جناب آقای دکتر محمد مازنی بخاطر رهنمودهای دلسوزانه می ایشان در تهیه می این تحقیق  
کمال قدر دانی را دارم.

از اساتید فریخته و فرزانه؛ جناب آقای دکتر پرهام محمدی، جناب آقای دکتر محسن سقا و جناب آقای  
دکتر رضا علی پناه مقدم که زحمت داوری این رساله را متقبل شدند؛ کمال تشکر و قدردانی را دارم.  
هم چنین از دوستان گران بایه ام خانم ممرضیه شیرینی، فریده منافی، مریم خدایی، شیافراشی و آقای  
یاور محمودزاده که مرا صمیمانه و مشفقانه یاری داده اند و همه کسانی که به نوعی مراد به انجام رساندن این پایان  
نامه یاری نموده اند بی نهایت سپاسگزارم.

سمیرا محمودی نیا

پاییز 1395

تقدیم به:

دوستاره پرفروغی که در تاریکی شب های تارنهراسیدند و در مسیر پرپیچ و خم کمال، همواره یار و مددکارم بوده

اند، کسانی که همیشه و در همه جا مایه اعتبار و مایه آرامشم بوده اند؛

پدر عزیزم استوارترین تکیه گاهم که مفهوم بی دریغ مهربانی و صداقت است، او که وسعت افق های

پیش رویم همه از نگاه های بلندش روشن می شود.

مادر مهربانم که آینه تمام نمای شور زندگی است، او که دنجوشی های امروزم را مایه تشویق های دیروز و

دلواپسی های همیشگی اش، هستم.

برادران عزیزم به پاس حمایت های دلگرم کننده شان، که برایشان آرزوی شادکامی و موفقیت دارم.

خواهر عزیزم به پاس مهربانی و محبت هایش که برایش روزگاری سراسر سعادت و نیکبختی آرزو مندم.

خواهرزاده های عزیزم منما که در نگاهش امید به زندگی موج میزند.

محضر استاد فرزانه جناب آقای دکتر علی نیاپور که در راه کسب علم و معرفت مرایاری نمودند.

و هم چنین به دوست عزیزم مرضیه شریفی که در طول این دوره مرا همراهی و مهدی نمودند.

## اثر 2,4 دی کلرو فنوکسی استیک اسید (2,4-D) بر بقا و آپوپتوز سلول های

### بنیادی مشتق از پالپ دندان انسانی

#### چکیده:

**سابقه و هدف:** علف کش 2 و 4 دی کلرو فنوکسی استیک اسید با نام تجاری 2,4-D، یکی از پرمصرف ترین علف کش های فنوکسی می باشد که برای کنترل علف های هرز در کشاورزی، اطراف منازل مسکونی، باغات، پارک ها، زمین های چمن و گلف استفاده می شود. استفاده بی رویه از این علف کش، سلامت انسان و محیط زیست را به مخاطره می اندازد. در مطالعه ی حاضر به بررسی اثرات این علف کش بر روی سلول های بنیادی مشتق از پالپ دندان انسانی، پرداخته شد.

**مواد و روش ها:** پس از تهیه دندان ها، اتاقک پالپ نمایان و بافت پالپ به وسیله آنزیم کلاژناز تیپ چهار، هضم گردید. سلول های جدا شده در محیط کشت  $\alpha$ MEM با 15٪ سرم جنین گاوی مخلوط شد و در دمای  $37^{\circ}\text{C}$ ، رطوبت 95٪ و 5٪  $\text{CO}_2$  کشت داده شده و با غلظت های مختلف 2,4-D تیمار شدند. میزان بقای سلولی با روش MTT، درصد زنده مانی سلول ها با رنگ آمیزی تریپان بلو، آنالیز چرخه سلولی با روش فلوسایتومتری، تغییرات مورفولوژی سلول ها با رنگ آمیزی آکریدین اورنج/تیدیوم بروماید و رنگ آمیزی DAPI، بررسی مرگ سلولی با کیت کاسپاز، تغییرات فعالیت آنتی اکسیدانی SOD و GPx، فعالیت آنزیم ALP و هم چنین سطح MDA مطالعه شدند. برای آنالیز داده ها از روش آماری استفاده شد.

**یافته ها:** میزان بقای سلولی در غلظت های 0/1 تا 100 میکرومولار 2,4-D، افزایش یافت اما در غلظت های بالا از 2,4-D، کاهش چشم گیری داشت. رنگ آمیزی آکریدین اورنج/تیدیوم بروماید نشان داد که غلظت های بالای 2,4-D سمیت خود را از طریق آپوپتوز اعمال می نمایند. بررسی چرخه ی سلولی با فلوسایتومتری

نشان داد که این علف کش قادر به القای سمیت از طریق توقف چرخه‌ی سلولی در فاز G1 می‌باشد. نتایج حاصل از رنگ آمیزی تریپان بلو نشان داد که میزان رشد سلول‌ها با افزایش غلظت 2,4-D کاهش پیدا کرد. نتایج حاصل از کیت کاسپاز 3 و 7 نشان داد که این علف کش باعث القای مرگ سلولی می‌شود. میزان فعالیت آنزیم‌های SOD، GPx و ALP بعد از تیمار با 2,4-D کاهش پیدا کرد. سطح MDA در سلول‌های تیمار شده، افزایش پیدا کرد.

**نتیجه گیری:** 2,4-D در سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسانی به صورت یک مکانیسم دو فازی عمل می‌کند، به این صورت که در غلظت‌های پایین، افزایش رشد سلولی و در غلظت‌های بالا، توانایی مهار رشد سلولی و القای آپوپتوز را دارد.

**کلمات کلیدی:** 2 و 4 دی کلرو فنوکسی استیک اسید، سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان انسانی، بقای سلولی، رشد سلولی، آپوپتوز



عنوان	صفحه
<b>فصل اول: طرح تحقیق</b>	
1-1- مقدمه و بیان مسأله .....	2
1-2- تعریف واژه .....	5
1-3- اهداف و فرضیات تحقیق .....	6
1-3-1- هدف اصلی .....	6
1-3-2- اهداف اختصاصی .....	6
1-3-3- اهداف کاربردی .....	7
1-3-4- فرضیات تحقیق .....	7
<b>فصل دوم: پیشینه تحقیق</b>	
2-1- تاریخچه‌ی سلول‌های بنیادی .....	9
2-2- تعریف سلول‌های بنیادی .....	9
2-3- ویژگی‌های سلول‌های بنیادی .....	10
2-4- طبقه بندی سلول‌های بنیادی .....	10
2-4-1- انواع سلول‌های بنیادی بر اساس پتانسیل تمایزی .....	10
2-4-2- انواع سلول‌های بنیادی بر اساس مراحل تکاملی .....	11

..... 2-4-2-1 سلول‌های بنیادی جنینی	11
..... 2-4-2-2 سلول‌های بنیادی بالغ	12
..... 2-5- تکامل بافت دندان	12
..... 2-6- بخش‌های مختلف دندان	14
..... 2-6-1 تاج دندان	14

صفحه

عنوان

..... 2-6-1-1 میثای دندان	14
..... 2-6-1-2 عاج دندان	15
..... 2-6-2 ریشه دندان	15
..... 2-6-2-1 سیمان	15
..... 2-6-2-2 پالپ دندان	15
..... 2-7- سلول‌های بنیادی دندان	16
..... 2-7-1 سلول‌های بنیادی پالپ دندان	16
..... 2-7-2 سلول‌های بنیادی دندان شیری افتاده (SHED)	17
..... 2-7-3 سلول‌های بنیادی قسمت اپیکال پایلای دندان (SCAP)	17

..... (PDLSCs) پیوندتال لیگامان بنیادی سلول‌های	17
..... (DFSC) سلول‌های بنیادی فولیکول دندان‌ی	17
..... (DePDL) سلول‌های بنیادی لیگامان‌های پیوندتال دندان‌های پوسیده	18
..... اثرات هورمون‌های گیاهی بر روی سلول‌های بنیادی	18
..... هورمون اکسین	19
..... 2,4-D	20
..... 2,4-D مواجهه با	20
..... 2,4-D متابولیت‌های	21
..... 2,4-D مکانیسم‌های سمیت	21
..... 2,4-D اثرات مواجهه با	21
..... 2-15 اثرات فلزات سنگین بر روی سلول‌های بنیادی	23
..... 2-16 چرخه‌ی سلولی	23

صفحه

عنوان

..... 2-17 استرس اکسیداتیو	24
..... 2-18 آنتی‌اکسیدان‌ها	25

..... 2-19 آپوتوز	25
..... 2-20 نکروز	26
..... 2-21 تفاوت آپوتوز و نکروز	26
..... 2-22 مکانیسم سلولی و مولکولی آپوتوز	27
..... 2-22-1 ویژگی مولکولی کاسپازها	27
..... 2-22-2 فعال شدن کاسپازها	28
..... 2-22-3 مسیر خارجی یا مسیر گیرنده‌های مرگ	28
..... 2-22-4 مسیر داخلی یا مسیر میتوکندریایی	29
..... 2-2-25 پروتئین‌های خانواده‌ی BCL-2 و نقش آن‌ها در آپوتوز	31
..... 2-23 بررسی متون	32

### فصل سوم : مواد و روش ها

..... 3-1 نوع پژوهش	36
..... 3-2 ملاحظات اخلاقی	36
..... 3-3 مکان و زمان انجام مطالعه	36
..... 3-4 جمعیت سلولی مورد مطالعه	36

..... 2,4-D	3-5	36
.....	3-6	36
.....	3-7	38
.....	3-8	38

صفحه	عنوان
------	-------

.....	3-8-1	38
.....	3-8-2	39
.....	3-8-3	39
.....	3-8-4	40
.....	3-8-5	40
.....	3-8-6	40
.....	3-8-7	41
.....	3-8-8	41
.....	3-8-9	41
.....	3-8-10	41
.....	(TBA%67)	41

..... تری کلرواستیک اسید (20% TCA) 3-8-11	41
..... محلول استاندارد (2,4-D , 1 mol/L) 3-8-12	42
..... محلول کلاژناز IV (3 mg/mL) 3-8-13	42
..... روش کار 3-9	42
..... استخراج سلول‌های بنیادی از پالپ دندان انسان 3-9-1	42
..... روش نمونه گیری 3-9-1-1	42
..... جداسازی و کشت سلول 3-9-1-2	43
..... تعویض محیط کشت 3-9-2	44
..... کشت و پاساژ سلول‌های بنیادی پالپ دندان 3-9-3	44
..... انجماد سلول‌ها 3-9-4	45
..... ذوب کردن سلول‌های منجمد 3-9-5	45

صفحه

عنوان

..... تعیین مدت زمان دو برابر شدن سلول‌ها 3-9-6	46
..... تیمار کردن سلول‌ها با 2,4-D 3-9-7	46
..... سنجش فعالیت متابولیکی سلول 3-9-8	47

9-9-3- سنجش توانایی زیستی سلول‌ها با استفاده از رنگ آمیزی تریپان بلو

48.....

10-9-3- بررسی آنالیز چرخه‌ی سلولی با تکنیک فلوسایتومتری .....

49

11-9-3- ارزیابی آپوپتوز با رنگ آمیزی DAPI ..... 50

12-9-3- ارزیابی مورفولوژی سلولی با رنگ آمیزی اکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید

50.....

13-9-3- اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم کاسپاز 3/7

52.....

14-9-3- ارزیابی فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) .....

53

15-9-3- ارزیابی فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-Px) ..... 54

16-9-3- ارزیابی سطح مالون‌دی‌آلدهید .....

17-9-3- ارزیابی فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) ..... 55

10-3- آنالیز آماری .....

56

#### فصل چهارم: نتایج

1-4- کشت اولیه سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسان .....

58

2-4- زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی .....

59

3-4- تاثیر 2,4-D بر مهار رشد و تقسیم سلولی در hDPSCs با روش MTT .....

59

4-4- نتایج سنجش توانایی زیستی سلول‌ها بر اساس رنگ آمیزی تریپان بلو پیرو تیمار با 2,4-D در hDPSCs .....

61

5-4- بررسی روند پیشرفت چرخه‌ی سلولی با روش فلوسایتومتری پیرو تیمار با 2,4-D در hDPSCs

63.....

4-6- بررسی اثر آپوتوزی 2,4-D در hDPSCs با استفاده از رنگ آمیزی DAPI	66.....
---	---------

<b>عنوان</b>	<b>صفحه</b>
--------------	-------------

4-7- بررسی مرگ سلولی در hDPSCs بعد از تیمار با غلظت‌های مختلف 2,4-D با استفاده از رنگ آمیزی اکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید (AO/EB)	67
4-8- تاثیر 2,4-D بر میزان سطح فعالیت آنزیم‌های کاسپاز 3/7 در hDPSCs	69
4-9- تاثیر 2,4-D بر میزان فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و گلوکوتاتیون پراکسیداز (GPx)	69.....
4-10- تاثیر 2,4-D بر میزان سطح مالون‌دی‌آلدهید در hDPSCs	71.....
4-11- تاثیر 2,4-D بر میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در hDPSCs	71.....

### فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

5-1- بحث	74
5-2- نتیجه گیری	82.....
5-3- محدودیت‌ها	83
5-4- پیشنهادات	83



## فهرست اشکال و تصاویر

..... شکل 1-2- مراحل تکامل بافت دندان	14
..... شکل 2-2- بافت دندان	18
..... شکل 3-2- مسیر خارجی و داخلی آپوتوز	32
..... شکل 1-3- طراحی مربوط به مطالعه و تیمار hDPSCs با ماده ی 2,4-D	47
..... شکل 1-4- کشت سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسانی	59
..... شکل 2-4- تاثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر میزان حیات سلولی hDPSCs با روش MTT	61
..... شکل 3-4- تعیین درصد سلول‌ها با رنگ آمیزی تریپان بلو	63
..... شکل 4-4- تاثیر 2,4-D در چرخه‌ی سلولی hDPSCs	65
..... شکل 5-4- بررسی تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسانی بعد از تیمار با 2,4-D با رنگ آمیزی DAPI	66
..... شکل 6-4- تغییرات مورفولوژیکی در سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسانی پیرو تیمار 2,4-D با رنگ آمیزی آکریدین اورنج- اتیدیوم بروماید	68
..... شکل 7-4- اثر 2,4-D بر میزان فعالیت کاسپاز 3/7 پیرو تیمار با 2,4-D در hDPSCs	69
..... شکل 8-4- فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی بعد از تیمار با 2,4-D در hDPSCs	70
..... شکل 9-4- میزان سطح MDA در hDPSCs پیرو تیمار با 2,4-D	71
..... شکل 10-4- میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در hDPSCs پیرو تیمار با 2,4-D	72

## هرست جداول

جدول 1-4- نتایج آماری تکنیک MTT.....	60
جدول 2-4- نتایج آماری شمارش سلولی با رنگ آمیزی تریپان بلو (نمودار A).....	62
جدول 3-4- نتایج آماری شمارش سلولی با رنگ آمیزی تریپان بلو (نمودار B).....	63
جدول 4-4- نتایج آماری رنگ آمیزی AO/EB.....	67

## فهرست اختصارات

**2,4-D:** 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid

**ALP:** Alkaline Phosphatase

**AO:** Acridine orange

**DAPI:** 4',6-diamino-2phenylindole

**DMSO:** Dimethyl Sulfoxide

**EB:** Ethidium bromide

**FBS:** Fetal Bovine Serum

**GPx:** Glutathion Peroxidase

**HDL:** High- density lipoprotein

**hDPSCs:** human dental pulp stem cells

**IAA:** Indol-3 Acetic Acid

**IC50:** Inhibit Cellular Proliferation by 50%

**LDL:** Low- density lipoprotein

**MDA:** Malondialdehyde

**PBS:** Phosphate buffer saline

**PFA:** Paraformaldehyde

**SOD:** Super Oxide Dismotase

**TBA:** Thiobarbituric Acid

**TCA:** Trichloroacetic Acid

**$\alpha$ MEM:**  $\alpha$  Modified Eagle Medium