دانشگاه علوم پزشکی اردبیل
دانشکده پزشکی و پیراپزشکی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد(M.Sc)

گرایش: بیوشیمی بالینی

عنوان:

بررسی تاثیر آندروگرافولید روی بیان هم اکسیژناز1 در سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی

اساتید راهنما:

دکتر رضا علی پناه مقدم

دکتر علی نعمتی

استاد مشاور:

آقای ودود ملک زاده

نگارش:

مریم خدائی

آبان1395

شماره پایان نامه:024

بسم الله الرحمن الرحیم

تقدیم

به آنان که مهر آسمانی شان آرام بخش آلام زمینی ام است

به استوارترین تکیه گاهم

به دستان پرمهر پدرم

به سبزترین نگاه زندگیم که هرچه آموختم در مکتب عشق شما آموختم و هرچه بکوشم قطره ای از دریای بی کران مهربانیتان

راسپاس نتوانم بگویم .

امروز هستی ام به امید شماست.

بار الها توفیقم ده که هر لحظه شکر گزارشان باشم و ثانیه های عمرم را در عصای دست بودنشان بگذرانم .

تقدیر و تشکر

به رسم ادب و حق شناسی، نهایت سپاس خود را نسبت به استاد گرانقدر جناب آقای دکتر رضا علی پناه مقدم که در طی انجام این پروژه مرا مورد لطف و عنایت قرار داده و حمایت هایشان هموار کننده راهم بوده، ابراز می دارم.

از جناب آقای دکتر علی نعمتی به خاطر رهنمودهای ارزنده ایشان که قدردانی می کنم.

همچنین از استاد گرامی جناب آقای ودود ملک زاده برای مشاوره این پایان نامه کمال تشکر را دارم.

از اساتید محترم جناب اقای دکتر ماذنی، جناب اقای دکتر نجف زاده و جناب آقای دکتر امیر شاهرخی که داوری این پایان نامه را بر عهده داشتند سپاسگزارم.

و در پایان از تمامی دوستانم خانم شریفی خانم منافی و خانم محمودی که هریک به نوبه خود خالق بهترین و به یادماندنی ترین خاطراتم هستند صمیمانه سپاسگذارم".

مریم خدائی-پاییز 95

بررسی تاثیر آندروگرافولید بر بیان هم اکسیژناز 1 در سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی

چکیده

سابقه و هدف: بررسی ها نشان داده است که درصد بقای سلول های بنیادی مزانشیم به دلیل شرایط نامطلوب ریز محیط پیوندی از جمله حضور رادیکال های آزاد، هایپوکسی و فقر غذایی کاهش می یابد. به دلیل اهمیت موضوع، در این مطالعه اثر پیش القایی هم اکسیژناز1، توسط آندروگرافولید بر بقای سلول های بنیادی مزانشیم در مواجهه با استرس اکسیداتیو و مواجهه با محرومیت سرمی بررسی شد.

مواد و روش ها: سلول های بنیادی مزانشیم از مغز استخوان موش صحرایی استخراج و در طی چندین پاساژ تکثیر گردید. هویت سلول های بنیادی مزانشیم به کمک مشاهدات مورفولوژیک، تست های تمایزی، فلوسایتومتری، مورد تائید قرار گرفت. سلول های پاساژچهارم با غلظت های مختلف آندروگرافولید تیمار شدند، سپس سلول های تیمار شده با محرومیت سرمی و هیدروژن پراکسید مواجه شده و میزان حیات سلول های تیمار شده با روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت بررسی میزان بیان HO-1 در سلول های بنیادی مزانشیم تیمار شده از تکنیک Real time PCR استفاده شد.

یافته ها: سلول های جدا شده از نظر ریخت شناسی، فیبروبلاستی بودند. این سلول ها، در کشت تمایز استخوان، توده های استخوانی تشکیل داده که با آلیزارین رد، قرمزرنگ شده و در کشت تمایز چربی، در سیتوپلاسم سلول ها قطرات چربی تجمع یافت که با رنگ آمیزی اویل رد، قرمز شدند. در بررسی فلوسایتومتری وجود آنتی ژن اختصاصی CD105 و عدم حضور CD14 CD45 تائید گردید. نتایج حاصل از روش MTT نشان داد، پیش تیمار سلول های بنیادی مزانشیم با آندروگرافولید بصورت وابسته به دوز سبب افزایش بقا و مقاومت این سلول ها دربرابر استرس سلولی ناشی از هیدروژن پراکسید و محرومیت سرمی شد. نتایج Real Time PCR نیز بیانگر افزایش معنی دار بیان ژن هم اکسیژناز1 در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل است ($p<0/05$).

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد آندروگرافولید می تواند باعث افزایش کارایی سلول های بنیادی مزانشیم با تحریک تولید هم اکسیژناز1 شود. این امر ممکن است بعنوان یک راهکار به منظور افزایش کارآمدی سلول درمانی مطرح شود.

کلمات کلیدی: سلول های بنیادی مزانشیم، هم اکسیژناز1، آندروگرافولید

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول:طرح تحقیق

1-1-مقدمه و بیان مساله 2

1-2-اهداف و فرضیات 5

1-3-تعریف واژه ها 6

فصل دوم : پیشینه تحقیق

2-1- تاریخچه تحقیقات سلول های بنیادی..... 8

2-2-تقسیم بندی سلول های بنیادی بر اساس توان تمایزی 9

2-2-1-همه توان 9

2-2-2-پر توان 9

2-2-3-چند توان 9

2-3-شناسایی سلول های بنیادی 9

2-4-انواع سلول های بنیادی 10

2-4-1- سلول های بنیادی رویانی 10

2-4-1-1-محدودیت مرتبط با سلول های بنیادی رویانی..... 11

2-4-2- سلول های بنیادی بالغ 12

2-4-2-1- سلول های بنیادی مغز استخوان..... 12

2-4-2-1-1- سلول های بنیادی خون ساز مغز استخوان 13

2-4-2-1-2- سلول های بنیادی استرومایی مغز استخوان..... 13

2-5- سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان..... 13

2-5-1- جداسازی بنیادی مزانشیم مغز استخوان..... 14

2-5-2-مارکر های سطحی سلول های بنیادی مزانشیم 13

2-5-3-سلول و ژن درمانی با استفاده از سلول های بنیادی مزانشیم..... 15

2-6-مشخصات آندروگرافیس پانیکولاتا 16

2-6-1-آندروگرافولید 17

2-6-2-کاربرد آندروگرافیس پانیکولاتا در طب سنتس و طب نوین 17

2-6-3- خواص آنتی اکسیدانی آندروگرافیس پانیکولاتا 18

2-7-استرس اکسیداتیو..... 18

2-7-1-نعریف رادیکال آزاد..... 18

2-7-2- منابع ROS و RNS..... 19

2-7-3-سیستم دفاع آنتی اکسیدانی 19

2-8-هم اکسیژناز..... 21

2-9-بررسی متون..... 23

فصل سوم:مواد و روش ها

3-1-نوع مطالعه 26

3-2-ملاحظات اخلاقی 26

3-3-مکان و زمان مطالعه 26

3-4-تجهیزات مورد استفاده..... 26

3-5-مواد مورد استفاده 28

3-6-ظروف مصرفی 29
3-7-روش تهیه مواد مورد استفاده در تحقیق 29
3-7-1-محلول PBS 29
3-7-2-محیط کشت DMEM 30
3-7-3-محلول MTT 30
3-8-روش انجام کار 31
3-8-1-کشت سلولی 31
3-8-1-1-استخراج سلول های بنیادی مزانشیم از مغز استخوان موش صحرایی 31
3-8-1-2-پاساژ سلول های بنیادی مزانشیم 31
3-8-1-3-تعویض محیط کشت 32
3-8-1-4-فریز کردن سلول ها 33
3-8-1-5-ذوب کردن ویال حاوسلول 33
3-8-2-تایید استخراج سلول های بنیادی مزانشیم 34
3-8-2-1-تمایز سلول های بنیادی مزانشیم به استخوان 34
3-8-2-2-تمایز سلول های بنیادی مزانشیم به چربی 34
3-8-2-فلوسایتومتری برای تایید نشانگر سطح سلولی 35
3-8-3-شمارش سلولی به روش تریپان بلو 36
3-8-4-سنجش میزان حیات سلولی با روش MTT 36
3-8-4-1-روش انجام MTT 37
3-8-4-2-تعیین غلظت موثر هیدروژن پراکسید بر روی سلول های بنیادی مزانشیم 38

3-8-4-3-بررسی اثر تیمارآندرو گرافولیدو مواجهه با غلظت موثر هیدروژن پراکسید بر روی MSC ... 38

3-8-4-4- بررسی اثر تیمار آندرو گرافولیدو مواجهه بامحرومیت سرمی بر روی MSC 38

3-8-5-بررسی میزان بیان هم اکسیژناز با استفاده از تکنیک Real time PCR 39

3-8-5-1-استخراج RNA 40

3-8-5-2-تعیین غلظت RNA استخراج شده با استفاده از نانودراپ..... 41

3-8-5-3-بررسی کیفیت RNA 41

3-8-5-4-سنتز cDNA از RNA 42

3-8-5-5- توالی ژن های مورد مطالعه 43

3-8-5-6-واکنش RT-PCR برای پرایمر GAPDH..... 43

3-8-5-7-الکتروفورز محصول RT-PCR بر روی ژل آگارز 44

3-8-5-8- واکنش Real Time PCR 45

3-8-5-9-روش محاسباتی سنجش کمی نسبی 46

3-8-6-آنالیز آماری..... 47

فصل چهارم: نتایج

4-1-نتایج حاصل از جداسازی و کشت سلول های بنیادی مزانشیم..... 49

4-2-نتایج حاصل از تمایزسلول های بنیادی مزانشیم به چربی 49

4-3-نتایج تمایز سلول های بنیادی مزانشیم به استخوان..... 51

4-4-نتایج حاصل از بررسی بیان مارکرهای سطحی سلول های بنیادی مزانشیم 53

4-5- تاثیر غلظت های متفاوت هیدروژن پراکسید بر میزان حیات سلول های بنیادی مزانشیم..... 54

4-6-بررسی اثر تیمار با آندروگرافولید و مواجهه با هیدروژن پراکسید بر میزان حیاتMSC..... 55

4-7- بررسی اثر تیمار با آندروگرافولید و مواجهه بامحرومیت سرمی بر میزان حیاتMSC 56

4-8-نتایج غلظت RNA استخراج شده توسط نانودراپ..... 58

4-8-نتایج حاصل از الکتروفورز RNA..... 58

4-10-نتایج حاصل ازالکتروفورز محصولات PCR نمونه ها با پرایمر GAPDH..... 59

4-11-نتایج بررسی بیان ژن هم اکسیژناز1..... 59

4-12بررسی میزان بیان نسبی آنزیم هم اکسیژناز 1..... 61

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

5-1-بحث..... 64

5-1- نتیجه گیری 70

5-2-محدودیت ها..... 70

5-3- پیشنهادات..... 71

فهرست منابع 72

چکیده انگلیسی 84

فهرست اشکال جداول ونمودارها

عنوان صفحه

جدول 3-1-مواد مورد استفاده برای تهیه PBS..... 29

جدول 3-2- طرز تهیه محیط DMEM..... 30

جدول 3-3-طرز تهیه محلول MTT..... 30

جدول3-4-مراحل اول سنتز cDNA..... 43

جدول3-5-مراحل دوم سنتز cDNA..... 43

جدول3-6-توالی ژن های مورد استفاده در این مطالعه و دمای اتصال آنها..... 43

جدول3-7-واکنش RT-PCR برای GAPDH..... 43

جدول3-8-مراحل دمایی واکنش PCR برای پرایمر GAPDH..... 44

جدول3-9-تهیه Master Mix برای ژن GAPDH و HO-1..... 45

جدول3-10-پروتکل دمایی سه مرحله ای Real time برای ژن های GAPDH و HO-1..... 46

شکل 4-1-نمایی از سلول های بنیادی کشت داده شده 49

شکل4-2 -تمایز سلول MSC به رده آدیپوسیتی 50

شکل 4-3 -تمایز سلول MSC به رده استئوسیتی 52

شکل 4-4 -نتایج فلوسایتومتری برای تایید نشانگرسطح سلولی 53

نمودار 4-1- تاثیر غلظت های مختلف هیدروژن پراکسید بر میزان حیات MSC..... 54

نمودار4-2 – تاثیر غلظت های مختلف آندروگرافولید در مواجهه با غلظت موثر هیدروژن پراکسید بر میزان حیات MSC. 56

نمودار4-3- تاثیر غلظت های مختلف آندروگرافولید در مواجهه با محرومیت سرمی بر میزان حیات MSC..... 570

جدول4-1- نسبت جذب نوری RNA وغلظت نمونه ها در گروه های مختلف 58

شکل4-5 – الکتروفورز RNA بر روی ژل آگارز 58

جدول4-9 – بارگزاری محصول RT-PCR باپرایمر GAPDH بر روی ژل آگارز 59

شکل4-7 – منحنی ذوب هم اکسیژناز1..... 60

شکل4-8 – منحنی تکثیر هم اکسیژناز1..... 60

نمودار4-4 – مقایسه میزان بیان هم اکسیژناز 1 در گروه های مورد مطالعه 61

جدول 2-4 – آنالیز بیان ژن گروه تیمار شده با غلظت 10 میکرومولار آندروگرافولید..... 62

فهرست اختصارات

Abbreviation

AP ..... Andrographolide

DMEM ..... Dulbecco's Modified Eagle's medium

DMSO ..... Dimethyl Sulfoxide

FBS ..... Fetal Bovine Serum

HO-1 ..... Heme oxygenase1

IL6 ..... Interleukin 6

GAPDH ..... Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase

GFP ..... Green fluorescent protein

MTT ..... (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)

Nrf2 ..... Nuclear factor erythroid-derived 2 related factor 2

Oct4 ..... .Octamer-binding transcription factor 4

PBS ..... Phosphate buffered saline

TGFβ ..... Transforming growth factor beta