بسم الله الرحمن الرحیم

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

خانم **زهره فائزی زاده** رشته **بیوشیمی بالینی** رساله **دکتری** خود را با عنوان « **بررسی اثر سیلیمارین بر میزان فعالیت آنزیم تلومراز و میزان بیان mRNA ژن کد کننده زیرواحد کاتالیتیک آنزیم تلومراز (HTERT) در رده سلول لوسمی انسان (K ۵۶۲)** » در تاریخ **۱۳۹۱/۴/۱۷** ارائه کردند.

بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	امضاء
استاد راهنما	دکتر سید علیرضا مصباح نمین	
استاد مشاور	دکتر عبدالامیر علامه	
استاد ناظر	دکتر فاطمه صغری کرمی تهرانی	
استاد ناظر	دکتر محسن فیروز رای	
استاد ناظر	دکتر زهرا - سهیلا سهیلی	
استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر محمد جواد رسایی	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی
دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می‌باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجو مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می‌باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب، نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده‌ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده‌ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته‌ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

««اینجانب زهره فائزی زاده دانشجوی رشته بیوشیمی بالینی ورودی سال تحصیلی۱۳۸۶ مقطع دکتری دانشکده پزشکی متعهد می‌شوم کلیه نکات مندرج در آئین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش‌های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته‌های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آئین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می‌دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هر گونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله بر اساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هر گونه اعتراض را از خود سلب نمودم»

امضا:

تاریخ: ۹۱/۴/۱۷

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل **رساله دکتری** نگارنده در رشته **بیوشیمی بالینی** است که در سال **۹۱** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر سیدعلیرضا مصباح نمین**، مشاوره **دکتر عبدالامیر علامه** از آن دفاع شده است.

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

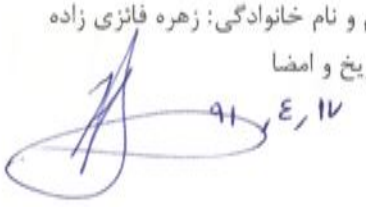
ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶: اینجانب **زهره فائزی زاده** دانشجوی رشته **بیوشیمی بالینی** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی: زهره فائزی زاده

تاریخ و امضا

۹۱/۴/۱۷



دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph. D.) در رشته بیوشیمی بالینی

عنوان

بررسی اثر سیلیمارین بر میزان فعالیت آنزیم تلومراز و میزان بیان mRNA ژن کد کننده زیر واحد کاتالیتیک آنزیم تلومراز (hTERT) در رده سلول لوسمی انسان (K562)

نگارش

زهره فائزی زاده

استاد راهنما

دکتر علیرضا مصباح نمین

استاد مشاور

دکتر عبدالامیر علامه

تابستان ۱۳۹۱

ای مهربانی که در پی احسانت پاداش نمی طلبی و در پس بخششت نادم نمی شوی و در پاداش دادنت به مقدار عمل بنده بسنده نمی کنی. احسانت دلیل نمی خواهد، عفوت شایستگی نمی طلبد، کیفرت از سر عدل است و تقدیرت از سر خیر و نیکی. گاه بخشودگی زلال عطایت را به کدورت منّت کدر نکنی و در حرمان بنده ستم روا نداری. شاکرت را سپاس می گویی، حال آنکه آن سپاس را تو خود بر زبانش نهاده ای و شکرگذارت را پاداش می دهی با آنکه شکرگذاری را تو به او آموخته ای.

صحیفه سجادیه

تقدیم به:

پدر، مادر و همسرم؛

به پاس تعبیر عظیم و انسانی شان از کلمه ایثار

به پاس عاطفه سرشار و گرمای امید بخش وجودشان که بهترین پشتیبان است

به پاس قلب های بزرگشان که فریادرس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گراید

و به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند

و

آموزگارانی که برایم زندگی؛ بودن و انسان بودن را معنا کردند.

تشکر و قدردانی

نگارنده بر خود واجب می داند که از زحمات بی دریغ، تلاش های بی وقفه و راهنمایی های ارزشمند استاد گرامی جناب آقای دکتر سید علیرضا مصباح نمین استوره اخلاق در راستای انجام این پروژه تشکر و قدردانی نماید.

- از استاد مشاور گرامی ام، جناب آقای دکتر عبدالامیر علامه، که شایسته سپاسی بیکران هستند.
- از سایر اساتید محترمی که افتخار شاگردی ایشان همچون یادگاری ارزشمند در تمام مراحل زندگی همراهم خواهد بود؛ سرکار خانم دکتر کرمی تهرانی، جناب آقای دکتر رسایی، سرکار خانم دکتر بطحایی، جناب آقای دکتر لطفی و بویژه آقای دکتر تقی خانی.
- از هیات رئیسه و داوران محترمی که قبول زحمت فرموده و رساله اینجانب را با صبر و حوصله داوری نمودند، کمال تشکر و قدردانی به عمل می آورم.
- از همسرم جناب آقای قریب که بدون صبر و بردباری و کمک های ایشان، این رساله به سامان نمی رسید، صمیمانه تشکر و قدردانی می کنم.
- از جناب آقای دکتر محمد کاظم پی پل زاده و خواهرم که در تمام دوران تحصیل از دبیرستان تا دانشگاه همواره مشوق من بودند، صمیمانه تشکر و قدردانی به عمل می آورم.
- از کارشناسان گروه بیوشیمی بالینی سرکار خانم ها اعتمادی و افشار به خاطر تمام همکاریهای شان در تمام مراحل انجام کار، از دانشجویان گروه بیوشیمی بالینی و سایر گروه ها به خاطر، همنوه ها و راهنمایی هایشان تشکر و قدردانی به عمل می آورم.
- و در نهایت از سایر پرسنل محترم دانشگاه که بستر مناسب برای انجام این پروژه را فراهم نمودند.

چکیده:

تلومراز یک آنزیم نسخه‌برداری معکوس است که تکرارهای تلومریک را با استفاده از الگـوی RNA خـود بـه منظـور جبران از دست دادن DNA که در طی همانندسازی رخ می‌دهد به تلومر اضافه مـی‌کنـد. تلـومراز از دو زیـر واحـد اساسی و متفاوت تشکیل شده است که یکی زیر واحد کاتالیتیک (hTERT) و دیگری جزء RNA (TERC) می‌باشد. فعالیت تلومراز ارتباط مستقیمی با بیان زیر واحـد hTERT دارد کـه بیـان آن در بسـیاری از سـلول‌هـای سـرطانی افزایش یافته است. ارتباط میان فعالیت تلومراز و مقاومت به آپوپتوز اثبات شده است. بنابراین مهار فعالیت تلـومراز یک هدف جدید و بالقوه در درمان سرطان محسوب می‌شود. بسیاری از ترکیبـات گیـاهی از طریـق مهـار تلـومراز باعث القاء آپوپتوز می‌شوند. سیلیمارین مخلوط استاندارد شده فلاولیگنان‌های گیاه دارویـی خـار مـریم اسـت کـه اثرات قوی بر علیه انواع سلول‌های سرطانی دارد، اما اثر آن بر مهار فعالیـت تلـومراز در سـلول‌هـای لوسـمی K562 مطالعه نشده است. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی مکانیسـم اثـر سـیلیمارین در القـاء آپوپتـوز در رده سـلول K562 با تاکید ویژه بـر روی نقـش آن در مهـار تلـومراز، میـزان بیـان mRNA-hTERT و فعالیـت آنـزیم در بخـش هسته‌ای (جایگاه عملکردی و فیزیولوژیک) می‌باشد. اثرات ضد تکثیر سیلیمارین بر روی سلول‌هـای K562 بوسـیله تست MTT بررسی شد. برای اندازه‌گیری آپوپتوز، از رنگ‌آمیزی هوخست ۳۳۳۴۲ و فلوسایتومتری استفاده شـد. از روش TRAP-ELISA برای تعیین فعالیت آنزیم تلومراز استفاده گردید. بیانmRNA-hTERT بوسـیله تکنیـک نیمـه کمیRT-PCR تعیین شد. تیمار سلول‌های K562 با سیلیمارین نشان داد که سیلیماین به طور قابل توجهی رشـد و تکثیر سلول‌ها را در یک روش وابسته به دوز و زمان (تا ۴۸ ساعت) نسبت به سلول‌های کنتـرل کـاهش مـی دهـد ($p<۰/۰۵$). میزان بقا سلول‌های تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سـیلیمارین بعـد از ۴۸ سـاعت، تقریباً ۷۳ درصد نسبت به کنترل کاهش یافت ($p<۰/۰۰۱$). درصد سلول های آپوپتوزی به صورت وابسته بـه دوز و زمان(تا ۴۸ ساعت) افزایش یافت. افزایش قابل توجه سلول‌های آپوپتوزی تا حـد ۷۵/۵۶ درصـد بعـد از تیمـار بـا غلظت ۱۰۰ میکروگرم برمیلی لیتر سیلیمارین در مقایسه با گروه کنتـرل مشـاهده گردیـد ($p<۰/۰۰۱$). فعالیـت آنزیم تلومراز و بیان mRNA-hTERT در مقایسه با گروه کنترل بـه صـورت وابسـته بـه دوز و زمـان تـا سـاعت ۴۸ کاهش یافت ($p<۰/۰۵$). تقریبا ۷۸ درصد مهار فعالیت تلـومراز و حـدود ۷۹/۸۵ درصـد کـاهش در بیـان mRNA-hTERT بعد از تیمار سلول‌ها با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بـر میلـی لیتـر سـیلیمارین مشـاهده گردیـد ($p<۰/۰۰۱$). فعالیت آنزیم تلومراز در بخش هسته سلول‌های K562 تیمار شده با سیلیمارین به صورت وابسته به دوز و زمان (تـا ۴۸ ساعت) کاهش نشان داد. فعالیت آنزیم تلومراز در هسته سلول های تیمار شده بـا غلظـت ۱۰۰ میکروگـرم بـر میلی لیتر در مقایسه با کنترل بیش از ۹۵ درصد کاهش یافـت. از طـرف دیگـر میـزان فعالیـت آنـزیم تلـومراز در سیتوپلاسم سلول‌های تیمار شده در مقایسه با کنترل تفاوت معنی داری نشان نـداد ($p>۰/۰۵$). مهمتـرین یافتـه این تحقیق این بود که یک ارتباط مستقیم میان مهار فعالیت تلومراز و القاء آپوپتوز در سلول‌هـای K562 مشـاهده گردید. علاوه بر این مهار فعالیت تلومراز در سلول‌های تیمار شده با سـیلیمارین بـا سـرکوب بیـانmRNA-hTERT همراه بود. یافته مهم دیگر حاصل از این مطالعه این بود که فعالیت آنزیم تلـومراز در بخـش هسـته‌ای سـلول‌هـای تیمار شده با سیلیمارین به روش وابسته به دوز کاهش نشان داد. این نتـایج یـک مکانیسـم جدیـد ضـد سـرطانی سیلیمارین در سلول‌های لوسمی K562 را بیان می‌نماید کـه ممکـن اسـت پایـه‌ای بـرای ایجـاد درمـان‌هـای ضـد تلومرازی در آینده باشد.

واژگان‌کلیدی: سیلیمارین، مهار تلومراز، آپوپتوز، زیر واحد کاتالیتیک آنزیم تلومراز (hTERT)

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱. مقدمه ۲

۱-۱-۱. سیلیمارین و اهمیت ترکیبات گیاهی ۲

۱-۱-۱-۱. سیلیمارین: ساختار شیمیایی و آنالوگ‌ها ۳

۱-۱-۱-۲. مکانیسم‌های احتمالی در رابطه با خاصیت ضد سرطانی سیلیمارین ۴

۱-۱-۱-۲-۱. القاء آپوپتوز بوسیله سیلیمارین ۶

۱-۱-۱-۲-۲. تعدیل پیشرفت سیکل سلولی بوسیله سیلیمارین ۶

۱-۱-۱-۲-۳. اثرات ضد التهابی سیلیمارین ۶

۱-۱-۱-۲-۴. اثرات ضد متاستازی سیلیمارین ۶

۱-۱-۱-۲-۵. اثرات ضد آنژیوژنز سیلیمارین ۷

۱-۱-۱-۲-۶. فعالیت آنتی اکسیدانی سیلیمارین ۷

۱-۲. مروری بر سرطان و لوسمی ۷

۱-۲-۱. لوسمی میلوئید مزمن ۸

۱-۳. انواع مرگ سلولی ۱۰

۱-۳-۱. مرگ میتوزی ۱۰

۱-۳-۲. مرگ غیرمیتوزی ۱۰

۱-۴. تغییرات ویژه در مرفولوژی سلول‌های آپوپتوزی ۱۰

۱-۵. ارزیابی آپوپتوز ۱۳

۱-۵-۱. ارزیابی مرفولوژیک مرگ سلولی ۱۳

۱-۵-۲. تغییرات غشا پلاسمایی در طول آپوپتوز ۱۴

۱-۵-۳. آنالیز قطعه قطعه شدن DNA ۱۵

۱-۶. آپوپتوز و درمان سرطان ۱۵

۱-۷. آنزیم تلومراز و آپوپتوز ۱۶
۱-۷-۱. تلومراز و تلومر ۱۶
۱-۷-۲. کمپلکس تلومر/ تلومراز ۱۸
۱-۷-۳. کلاهک گذاری / غیر کلاهک گذاری تلومر ۱۹
۱-۷-۴. همانندسازی بخش تلومریکDNA ۱۹
۱-۷-۵. تلومراز و مهار آن ۲۲
۱-۷-۶. استراتژی‌های ضد تلومرازی ۲۳
۱-۷-۶-۱. استراتژی‌هایی که زیر واحد کاتالیتیک (hTERT) را هدف قرار می‌دهند. ۲۳
۱-۷-۶-۲. استراتژی ضد تلومرازی با هدف قرار دادن hTR/hTERC ۲۶
۱-۷-۶-۳. هدف قرار دادن پروتئین‌های همراه با تلومراز و مسیرهای سیگنالینگ ۲۹
۱-۷-۶-۴. عواملی که تلومر را هدف قرار می‌دهند(TTA) ۲۹
۱-۷-۷. مهار تلومراز و ترکیبات گیاهی ۳۱
۱-۸. سیلیمارین و لوسمی میلوئید مزمن ۳۲
۱-۹. اهداف و فرضیات تحقیق ۳۳
۱-۹-۱. اهداف ۳۳
۱-۹-۲. فرضیات ۳۴
۱-۹-۳. سوالات ۳۵
۱-۹-۴. ترتیب روش‌ها برای رسیدن به اهداف ۳۵

فصل دوم: مواد و روش‌ها ۳۶
۲-۱. رده سلول لوسمی K562 ۳۷
۲-۱-۱. رده سلولی K562 و شرایط کشت و نگهداری آنها ۳۷
۲-۱-۱-۱. محیط کشت کامل ۳۷
۲-۱-۱-۲. محلول PBS ۳۸
۲-۱-۱-۳. روش کشت سلول‌های K562 ۳۸

۲-۱-۲. نحوه انجماد، فریز کردن و ذوب سلول ها ۳۸
۲-۱-۲-۱. محلول فریزینگ ۳۸
۲-۱-۲-۲. روش انجماد و ذوب سلول ها ۳۹
۲-۲. جداسازی لنفوسیت خون ۳۹
۲-۳. شمارش سلولی ۳۹
۲-۴. تست تعیین درصد سلول‌های زنده به کمک تست تریپان بلو ۴۰
۲-۴-۱. محلول ترپیان بلو ۰/۴ درصد ۴۰
۲-۴-۲. اصول و روش کار ۴۰
۲-۴-۳. تیمار سلول‌های K562 با سیلیمارین و شمارش سلول‌های زنده ۴۱
۲-۴-۳-۱. محلول سیلیمارین ۴۱
۲-۴-۳-۲. روش کار ۴۱
۲-۵. ارزیابی میزان رشد سلول‌ها در حضور سیلیمارین به کمک تستMTT ۴۱
۲-۵-۱. محلول MTT ۴۱
۲-۵-۲. اصول تست MTT ۴۱
۲-۵-۳. روش کار ۴۲
۲-۶. تشخیص انواع مرگ سلولی به روش فلوسایتومتری ۴۳
۲-۶-۱. اصول فلوسایتومتری ۴۳
۲-۶-۲. روش کار ۴۴
۲-۷. رنگ‌آمیزی هوخست ۳۳۳۴۲ ۴۵
۲-۷-۱. اصول ۴۵
۲-۷-۲. محلول استوک هوخست (۱/۲mg/ml) ۴۶
۲-۷-۳. روش رنگ‌آمیزی سلول‌ها ۴۶
۲-۸. بررسی اثر سلیمارین بر میزان بیان mRNA- hTERT ۴۶
۲-۸-۱. استخراج RNA ۴۷
۲-۸-۱-۱. اصول استخراج RNA و نکات لازم ۴۷

۲-۸-۱-۲. مواد و تجهیزات مورد نیاز ۴۷
۲-۸-۱-۳. روش استخراج RNA ۴۸
۲-۸-۱-۴. بررسی RNA استخراج شده ۴۹
۲-۸-۱-۴-۱. بررسی RNA استخراج شده به روش اسپکتروفتومتری ۴۹
۲-۸-۱-۴-۲. بررسی RNA استخراج شده به روش الکتروفورز ژل آگارز ۵۰
۲-۸-۱-۴-۲-۱. محلول‌ها و بافرهای مورد نیاز برای الکتروفورز ۵۰
۲-۸-۱-۴-۲-۲. مراحل کار ۵۱
۲-۸-۲. تیمار RNA با DNase ۵۲
۲-۸-۲-۱. مواد و وسایل مورد نیاز ۵۲
۲-۸-۲-۲. روش کار ۵۲
۲-۸-۳. ساخت cDNA ۵۳
۲-۸-۳-۱. اصول ساخت cDNA ۵۳
۲-۸-۳-۲. مواد و وسایل مورد نیاز برای سنتز cDNA ۵۳
۲-۸-۳-۳. روش کار ۵۳
۲-۸-۴. واکنش PCR ۵۴
۲-۸-۴-۱. اصول کار ۵۴
۲-۸-۴-۲. طراحی پرایمر ۵۵
۲-۸-۴-۳. مواد مورد نیاز برای واکنش PCR ۵۵
۲-۸-۴-۴. یافتن دمای Annealing مناسب برای پرایمرها ۵۶
۲-۸-۴-۵. روش کار در تکنیک PCR ۵۶
۲-۸-۴-۶. کنترل‌ها در PCR ۵۷
۲-۸-۴-۷. الکتروفورز نمونه‌های PCR شده بر روی ژل آگارز ۵۷
۲-۸-۴-۸. آنالیز نیمه کمی محصولات حاصل از RT-PCR ۵۸
۲-۹. اندازه‌گیری غلظت پروتئین به روش برادفورد ۵۸
۲-۹-۱. محلول‌های مورد نیاز ۵۸

۲-۹-۲. اصول سنجش غلظت پروتئین به روش برادفورد ۵۹
۲-۹-۳. روش کار ۵۹
۲-۱۰. بررسی اثر سیلیمارین بر میزان فعالیت آنزیم تلومراز ۵۹
۲-۱۰-۱. محلول‌ها و تجهیزات موجود در کیت اندازه‌گیری فعالیت تلومراز ۶۰
۲-۱۰-۲. اساس آزمایش ۶۱
۲-۱۰-۳. مزایای روش PCR-ELISA ۶۳
۲-۱۰-۴. کنترل‌ها ۶۳
۲-۱۰-۴-۱. کنترل داخلی (IS) ۶۳
۲-۱۰-۴-۲. کنترل منفی ۶۴
۲-۱۰-۴-۳. کنترل مثبت (TS8) ۶۵
۲-۱۰-۵. روش اندازه‌گیری فعالیت آنزیم تلومراز ۶۵
۲-۱۰-۵-۱. تهیه لیزات سلولی ۶۵
۲-۱۰-۵-۲. واکنش TRAP ۶۶
۲-۱۰-۵-۲-۱. مراحل انجام واکنش TRAP ۶۶
۲-۱۰-۵-۲-۲. تائید محصولات واکنش TRAP: ۶۷
۲-۱۰-۵-۲-۲-۱. معرفها و بافرهای مورد نیاز برای ۱۰٪ PAGE و رنگ‌آمیزی ژل ۶۷
۲-۱۰-۵-۲-۲-۲. روش کار انجام الکتروفورز PAGE ۱۰ درصد ۶۸
۲-۱۰-۵-۳. هیبریداسیون و الیزا ۶۸
۲-۱۰-۵-۳-۱. روش هیبریداسیون و الیزا ۶۹
۲-۱۰-۵-۴. تفسیر نتایج ۷۰
۲-۱۰-۵-۴-۱. کنترل منفی ۷۰
۲-۱۰-۵-۴-۲. کنترل مثبت ۷۰
۲-۱۰-۵-۴-۳. نمونه‌ها ۷۰
۲-۱۱. اثرسیلیمارین بر میزان فعالیت آنزیم تلومراز در هسته و سیتوپلاسم سلول‌های تیمار شده ۷۱

۲-۱۱-۱. اجزاء کیت استخراج پروتئین‌های هسته و سیتوپلاسم (فرمنتاز) ۷۱
۲-۱۱-۲. روش کار ۷۲
۲-۱۱-۲-۱. لیز سلولی ۷۲
۲-۱۱-۲-۲. استخراج پروتئین‌های سیتوپلاسم ۷۲
۲-۱۱-۲-۳. شستشوی هسته‌ها ۷۳
۲-۱۱-۲-۴. لیز هسته‌ها ۷۳
۲-۱۲. آنالیز آماری ۷۳

فصل سوم: نتایج و یافته‌ها ۷۴

۳-۱. نتایج تیمار سلول‌های K562 با سیلیمارین ۷۵
۳-۲. بررسی تغییرات مرفولوژی سلول‌های K562 تیمار شده با سیلیمارین ۷۵
۳-۳. نتایج حاصل از بررسی اثر سیلیمارین بر میزان رشد و تکثیر سلول‌های K_{562} به کمک تست MTT ۷۶
۳-۴. نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی تریپان بلو ۷۸
۳-۵. نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی هوخست ۳۳۳۴۲ سلول‌های K_{562} ۷۹
۳-۶. نتایج حاصل از فلوسایتومتری ۸۱
۳-۷. نتایج بررسی اثر سیلیمارین بر بیان mRNA-hTERT به روش RT-PCR ۹۰
۳-۷-۱. تایید کمی و کیفی RNA توتال بدست آمده از سلول‌های K_{562} ۹۰
۳-۷-۲. ساخت cDNA و بهینه سازی شرایط PCR برای ژن hTERT در حضور کنترل داخلی بتا اکتین از روی RNA توتال ۹۰
۳-۷-۳. ساخت cDNA و PCR ژن hTERT در حضور کنترل داخلی بتااکتین در سلول‌های تیمار شده با سیلیمارین ۹۱
۳-۸. نتایج بررسی اثر سیلیمارین بر میزان فعالیت آنزیم تلومراز ۹۴
۳-۸-۱. نتایج بررسی اثر غلظت های مختلف سیلیمارین بر میزان فعالیت آنزیم تلومراز در سلول‌های K562 ..... ۹۴

۳-۸-۲. نتایج بررسی اثر زمان‌های مختلف انکوباسیون سلول‌های K562 تیمار شده با سیلیمارین بر میزان فعالیت آنزیم تلومراز ۹۷
۳-۹. بررسی میزان فعالیت آنزیم تلومراز در هسته و سیتوپلاسم سلول های تیمار شده با سیلیمارین ۹۹
۳-۹-۱. بررسی اثر غلظت‌های مختلف سیلیمارین بر میزان فعالیت آنزیم تلومراز در هسته و سیتوپلاسم سلول‌های K562 ۹۹
۳-۹-۲. بررسی اثر زمان های مختلف انکوباسیون با سیلیمارین بر میزان فعالیت آنزیم در هسته و سیتوپلاسم سلول‌های K562 ۱۰۱

فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۱۰۴
۴-۱. بحث و نتیجه‌گیری ۱۰۵
۴-۲. پیشنهادها ۱۱۲

فهرست منابع ۱۱۳
چکیده انگلیسی ۱۲۴

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱. توالی پرایمرهای طراحی شده برای واکنش PCR ژن hTERT و بتااکتین..... ۵۵

جدول ۲-۲. تهیه Master mix برای یک واکنش PCR..... ۵۶

جدول ۲-۳. پروتکل واکنش PCR..... ۵۷

جدول ۲-۴. نمونه های شرکت کننده در واکنش TRAP شامل sample، کنترل منفی، کنترل مثبت و بلانک (شاهد) می‌باشند..... ۶۷

جدول ۲-۵. پروتکل واکنش TRAP..... ۶۷

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱. گیاه خار مریم ۳

شکل۱-۲. ساختمان اجزای اصلی سیلیمارین: سیلیبینA، سیلیبینB، ایزوسیلیبینA، ایزوسیلیبینB، سیلیکریستین، ایزوسیلیکریستین، سیلیدیانین و ایزوسیلیدیانین. ۴

شکل۱-۳. مکانیسم‌های احتمالی اثر سیلیمارین. ۵

شکل ۱-۴. کروموزوم فیلادلفیا در اثر جابجایی بین کروموزوم ۹ و ۲۲ در سلول‌های پیش ساز مغز استخوان ایجاد می‌شود ۹

شکل۱-۵. تغییرات مورفولوژیک در سلول در حال آپوپتوز. ۱۱

شکل ۱-۶. تفاوت آپوپتوز در مقایسه با نکروز ۱۳

شکل۱-۷. آنزیم تلومراز از دو جزء پروتئینی و RNA الگو تشکیل شده است. ۱۶

شکل۱-۸. ساختار تلومر شامل دو حلقه T (T loop) و D (D loop). قرارگیری مجموعه‌های پروتئینی TRF1 و TRF2 بر روی DNAتلومری (A). قرار گیری مجموعه پروتئین‌های همراه با تلومراز(B). ۱۸

شکل۱-۹. تلومر، تلومراز و پروتئین‌های همراه آنها. ۱۹

شکل۱-۱۰. به خاطر فعال بودن تلومراز طول تلومر در سلول‌های زایا به حفظ می‌شود. ۲۰

شکل ۱-۱۱. آنزیم تلومراز توالی TTAGGG را به انتهای زنجیره تک رشته اضافه می کند، در حالی که نواحی دو رشته‌ای بوسیله آنزیم پلی مراز همانندسازی می‌شوند. ۲۱

شکل ۱-۱۲. طول تلومر در سلول سرطانی در مقایسه با سلول‌های رده زایا و بنیادی کوتاهتر می‌باشد. ۲۳

شکل ۱-۱۳. سه استراتژی که زیر واحد hTERT را هدف قرار می دهند با شماره در داخل شکل مشخص شده‌اند. ۲۴

شکل۱-۱۴. ساختمان آزیدوتیمیدین و BIBR1532 دو مولکول با فعالیت ضد تلومرازی. ۲۵

شکل ۱-۱۵. مواجه سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن (APC) با قطعه‌هایی از آنزیم تلومراز ۲۶

شکل ۱-۱۶. استراتژی‌هایی که مولکول hTR را هدف قرار می‌دهند ۲۶

شکل ۱-۱۷. ساختمان برخی از اولیگونوکلئوتیدهای آنتی سنس با فعالیت ضد تلومرازی ۲۷

شکل ۱-۱۸. ساختار مولکول‌های اولیگونوکلئوتیدی GRN163 و GRN163L و مکانیسم عمل GRN163L ۲۸

شکل ۱-۱۹. ساختار یک ریبوزیم (teloRZ) با فعالیت ضد تلومرازی. ۲۹

شکل ۱-۲۰. ساختمان G-quadruplex در قسمت بالای شکل دیده می‌شود. لیگاندهای G-quadruplex که باعث پایداری ساختمان آن می‌شوند عبارتند از: ۳۰

شکل ۱-۲۱. ترکیباتی که تلومر را هدف قرار می‌دهند (TTA) باعث پایدار شدن ساختارچهارتایی G شده و فعالیت تلومراز را کاهش می‌دهند ۳۱

شکل ۲-۱. احیا نمک زرد رنگ دی متیل تیازول دی فنیل تترازولیوم بروماید به وسیله آنزیم میتوکندریایی سوکسینات دهیدروژناز ۴۲

شکل ۲-۲. اساس اندازه‌گیری فعالیت تلومراز به روش TRAP-ELISA ۶۲

شکل ۳-۱. نتایج اثر غلظت‌های مختلف سیلیمارین بر مورفولوژی سلول های K562 ..... ۷۶

شکل ۳-۲. بررسی اثر غلظت‌های متفاوت سیلیمارین در زمان‌های متفاوت (۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت) بر رشد و تکثیر سلول‌های لوسمی K562 ..... ۷۷

شکل۳-۳. بررسی اثر غلظت‌های متفاوت سیلیمارین در زمان‌های متفاوت (۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت) بر رشد و تکثیر سلول‌های لنفوسیت نرمال ۷۸

شکل ۳- ۴. سلول های K562 تیمار شده با سیلیمارین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بعد از ۴۸ ساعت (A) و سلول‌های کنترل بعد از ۴۸ ساعت (B) ۷۸

شکل ۳-۵. بررسی اثر غلظت‌های مختلف سیلیمارین بر تعداد سلول‌های K562 در زمان‌های مختلف ۷۹

شکل ۳-۶. بررسی مرفولوژی هسته سلول‌های K562 تیمار شده با غلظت‌های مختلف سیلیمارین با رنگ‌آمیزی هوخست ۳۳۳۴۲ ..... ۸۰

شکل ۳-۷. بررسی درصد آپوپتوز سلول های K562 بعد از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت انکوباسیون در حضور غلظت‌های متفاوت سیلیمارین به کمک رنگ‌آمیزی هوخست۳۳۳۴۲..... ۸۰

شکل۳-۸. بررسی درصد آپوپتوز سلول های لنفوسیت نرمال بعد از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت انکوباسیون در حضور غلظت‌های متفاوت سیلیمارین به کمک رنگ‌آمیزی هوخست ۳۳۳۴۲..... ۸۱

شکل ۳-۹. بررسی انواع مرگ سلولی سلول های K562 به کمک دستگاه فلوسایتومتر پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون با غلظت‌های مختلف سیلیمارین..... ۸۲

شکل ۳-۱۰. بررسی انواع مرگ سلولی سلول های K562 به کمک دستگاه فلوسایتومتر پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون با غلظت‌های مختلف سیلیمارین..... ۸۳

شکل ۳-۱۱. بررسی انواع مرگ سلولی سلول های K562 به کمک دستگاه فلوسایتومتر پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون با غلظت‌های مختلف سیلیمارین..... ۸۴

شکل ۳-۱۲. بررسی انواع مرگ سلولی سلول های K562 به کمک دستگاه فلوسایتومتر پس از ۹۶ ساعت انکوباسیون با غلظت‌های مختلف سیلیمارین..... ۸۵

شکل ۳-۱۳. بررسی انواع مرگ سلولی سلول‌هایی لنفوسیت نرمال به کمک دستگاه فلوسایتومتر پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون با غلظت‌های مختلف سیلیمارین.....۸۶

شکل ۳-۱۴. بررسی انواع مرگ سلولی سلول‌هایی لنفوسیت نرمال به کمک دستگاه فلوسایتومتر پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون با غلظت‌های مختلف سیلیمارین..... ۸۷

شکل ۳-۱۵. بررسی انواع مرگ سلولی سلول‌هایی لنفوسیت نرمال به کمک دستگاه فلوسایتومتر پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون با غلظت‌های مختلف سیلیمارین..... ۸۸

شکل ۳-۱۶. بررسی انواع مرگ سلولی سلول‌هایی لنفوسیت نرمال به کمک دستگاه فلوسایتومتر پس از ۹۶ ساعت انکوباسیون با غلظت‌های مختلف سیلیمارین..... ۸۹

شکل ۳-۱۷. کنترل کیفی RNAهای توتال استخراج شده..... ۹۰

شکل ۳-۱۸. الکتروفورز محصول PCR گرادیانت hTERT و بتااکتین. ۹۱

شکل ۳-۱۹. بررسی اثر غلظت‌های مختلف سیلیمارین بر میزان بیان mRNA hTERTبه روش RT PCR در غلظت‌های مختلف ۹۳

شکل ۳-۲۰. بررسی اثر غلظت‌های مختلف سلیمارین بر میزان بیان mRNA hTERT در

سلول‌های لنفوسیت نرمال ۹۴

شکل ۳-۲۱. نتایج الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید ۱۰ درصد محصولات تکرارهای تلومریک ایجاد شده در واکنش TRAP ۹۵

شکل ۳-۲۲. بررسی اثر سیلیمارین در غلظت‌های مختلف بر میزان فعالیت تلومراز در سلول‌های K562 بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون..... ۹۶

شکل ۳-۲۳. بررسی اثر سیلیمارین در غلظت‌های مختلف بر میزان فعالیت تلومراز در سلول‌های لنفوسیت نرمال بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون. ۹۷

شکل ۳-۲۴. نتایج بررسی اثر زمان‌های مختلف انکوباسیون بر میزان فعالیت آنزیم تلومراز بعداز تیمار با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیلیمارین. ۹۸

شکل ۳-۲۵. نتایج بررسی اثر زمان‌های مختلف انکوباسیون بر میزان فعالیت تلومراز در سلول‌های لنفوسیت نرمال تیمار شده با غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر. ۹۸

شکل ۳-۲۶. بررسی اثر غلظت‌های مختلف سیلیمارین بر میزان فعالیت آنزیم تلومراز در بخش هسته و سیتوزول سلول های K562 بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون ۱۰۰

شکل ۳-۲۷. نتایج بررسی اثر غلظت های مختلف سیلیمارین بر میزان فعالیت آنزیم تلومراز در بخش هسته و سیتوزول سلول‌های لنفوسیت نرمال بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون..... ۱۰۱

شکل ۳-۲۸. نتایج بررسی اثر زمان‌های مختلف انکوباسیون بر درصد فعالیت نسبی آنزیم درهسته و سیتوپلاسم سلول‌های K562 تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیلیمارین..... ۱۰۲

شکل ۳-۲۹. نتایج اثر زمان های مختلف انکوباسیون بر درصد فعالیت نسبی آنزیم درهسته و سیتوپلاسم سلول‌های لنفوسیت نرمال تیمار شده غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر سیلیمارین... ۱۰۳