بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه پیام نور
دانشکده علوم پایه
مرکز تهران شرق

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد
رشته علوم جانوری
گروه علمی زیست شناسی

عنوان پایان نامه:

# بررسی اثر عصاره هیدروالکلی گیاه سیاه دانه (*Nigella sativa* L.) بر آسیب DNA ناشی از محرومیت سرم/گلوکز در سلول های PC12

**بهشته بابازاده**

استاد راهنمای اول: **دکترحمید رضا صادق نیا**

استاد راهنمای همکار: **دکتر الهام صفرپور کپورچال**

استاد مشاور: **دکتر سیما نصری**

شهریور ۱۳۹۰

# تقدیم

# به آستان پر مهر

# علی بن موسی الرضا(ع)

سپاس ایزد منان که توفیق گام نهادن در مسیر علم و دانش را به من عنایت فرمود و لطف و کرمش، کوشش مرا به ثمر رساند. در این جا لازم است از کلیه کسانی که وجودشان باعث به ثمر رساندن این تحقیق شد تشکر نمایم.

خالصانه ترین تقدیرها را نثار استاد محترم جناب آقای دکتر حمید رضا صادق نیا می نمایم که یاری و همراهی ایشان موجب به انجام رسیدن این پروژه شد.

سپاس و قدردانی خود را خدمت استاد محترم سرکار خانم دکتر الهام صفرپور که از راهنمایی های ایشان در مراحل مختلف این تحقیق بهره های فراوان بردم ، تقدیم می کنم.

از سرکار خانم دکتر زهرا طیرانی که علم و تجربه فراوانشان را بی دریغ در اختیارم نهادند قدردانی می کنم و از خداوند بزرگ توفیق و سلامتی ایشان را خواهانم.

از استاد محترم سرکار خانم دکتر سیما نصری که از مشورت و هم فکری ایشان در تنظیم هر چه بهتر این پایان نامه سود جستم، قدردانی می نمایم. همچنین از جناب آقای دکتر رضا حاجی حسینی که قبول زحمت فرموده و داوری پایان نامه را پذیرفتند سپاسگزارم. لازم است از جناب آقای دکتر حیدر پارسایی مدیر گروه فارماکولوژی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشکده پزشکی مشهد که با فراهم کردن امکانات لازم باعث به ثمر رسیدن این پروژه شدند، همچنین از دانشکده داروسازی مشهد جهت مساعدت های مورد نیاز تشکر نمایم.

از سرکار خانم مژگان اصغری که از تجربیات ایشان بهره گرفتم همچنین از کلیه کارکنان آموزش تحصیلات تکمیلی دانشگاه پیام نور مرکز تهران شرق که در برگزاری جلسه دفاع همکاری فراوان نمودند قدردانی می نمایم.

گذشته چراغ راه آینده است امیدوارم تلاش اینجانب گامی کوچک در جهت برداشتن گام های بلند بعدی باشد..

# چکیده

محرومیت از سرم/گلوکز باعث آسیب مولکول DNA در سلول های PC12 می شود. این مدل برای بررسی ایسکمی مغزی و بیماری هایی که با تخریب نورون ها مرتبط هستند، مدل بسیار خوبی است. دانه سیاه دانه (*Nigella sativa*) و تیموکینون (TQ) که جزء عمده آن است، به عنوان آنتی اکسیدانت شناخته شده اند. در این مطالعه تاثیر احتمالی محافظت ژنی عصاره سیاه دانه و تیموکینون را بر آسیب DNA سلول های PC12 تحت شرایط محرومیت از سرم/گلوکز بررسی کردیم. سلول های PC12 درDMEM حاوی ۱۰٪ سرم جنینی و آنتی بیوتیک (پنی سیلین-استرپتومایسین) کشت داده شدند، پس از ٦ ساعت پیش تیمار سلول ها در شرایط محرومیت از سرم/گلوکز برای مدت ۱۸ ساعت قرار داده شدند.

سلول ها با غلظت های مختلف سیاه دانه ( ۲۵۰ µg/ml، ۵۰، ۱۰) و تیموکینون (۱۰ µg/ml، ۵، ۱) پیش تیمار شدند. ابتدا توانایی حیات سلول ها با تست MTT ارزیابی شد. سپس توسط آزمون کامت آسیب القاء شده در مولکول DNA بررسی گردید. در مقایسه با گروه محروم از سرم/گلوکز (SGD) سیاه دانه و تیموکینون بترتیب در دوزهای(۲۵۰ µg/ml و ۵۰) و (۱۰µg/ml و ۵) در برابر آسیب DNA اثر محافظتی نشان دادند. در این مطالعه گاما-توکوفرول بعنوان کنترل مثبت استفاده شد.

# فهرست مطالب

عنوان صفحه


فصل اول: مقدمه و کلیات ..... ۱..

۱-۱) پیش گفتار ..... ۲..

۱-۱-۱) سابقه تحقیق ..... ۳..

۱-۱-۲) هدف تحقیق ..... ۳..

۱-۲) کلیات ..... ٤...

۱-۲-۱)مختصری در مورد گیاه سیاه دانه ..... ٤

۱-۲-۲) ترکیب شیمیایی سیاه دانه ..... ٦..

۱-۲-۳) یافته های داروشناسی ..... ۹..

۱-۳) ویژگیهای سلولهای PC12 ..... ۹..

۱-٤) رادیکالهای آزاد و آسیب اکسیداتیو ..... ۱۱.

۱-۵) نقش فقدان مواد غذایی و فاکتورهای رشد در تولید ROS ..... ۱۳.

۱-٦) آسیب DNA ..... ۱٦.

۱-٦-۱) آسیب اکسیداتیو DNA ..... ۱٦.

۱-٦-۲) روشهای دفاعی سلول در برا بر آسیب اکسیداتیو DNA..... ۲۰.

۱-۷) آنتی اکسیدان ها ..... ۲۲.

۱-۸) روشهای ارزیابی آسیب اکسیداتیو ..... ۲۳.

۱-۸-۱) اندازه گیری بیومارکرهای ناشی از اکسیداسیون چربیها..... ۲۳

۱-۸-۲) اندازه گیری بیومارکرهای ناشی از اکسیداسیون پروتئینها ..... ۲٤.

۱-۸-۳) اندازه گیری بیومارکرهای ناشی از اکسیداسیون DNA ..... ۲۵.

۱-۸-٤) اندازه گیری رادیکال آزاد اکسیژن توسط روش فلوسایتومتری..... ۲٦.

فصل دوم: بررسی متون ..... ۲۷
۲-۱) خواص دارویی گیاه سیاه دانه ..... ۲۸
۲-۱-۱) خاصیت ضد التهاب ..... ۲۸
۲-۱-۲) اثرآنتی اکسیدانی ..... ۲۸
۲-۱-۳) تاثیرات عصبی ..... ۳۲
۲-۱-٤) خواص حفاظت کننده عصبی ..... ۳۳
۲-۱-۵) خواص ضد میکروبی ..... ۳٤
۲-۱-٦) اثرات ضد ویروس ..... ۳٤
۲-۱-۷) اثرات ضد سرطان و ضد موتاژنیک ..... ۳۵
۲-۱-۸) تاثیرات ضد دیابت ..... ۳٦
۲-۱-۹) تاثیرات تنفسی و ایمنی ..... ۳۷
۲-۱-۱۰) تاثیر بر سیستم قلبی- عروقی و خون ..... ۳۹
۲-۱-۱۱) خاصیت سم شناسی ..... ۳۹
۲-۲) تیموکینون ($C_{10}H_{12}O_2$) ..... ٤۰
۲-۲-۱) فعالیتهای شیمیایی تیموکینونTQ ..... ٤۰
۲-۲-۲) فعالیتهای بیولوژیکی تیموکینون ..... ٤۱
۲-۲-۲-۱) اثر آنتی اکسیدانی ..... ٤۱
۲-۲-۲-۲) اثرات ضدالتهاب ..... ٤۲
۲-۲-۲-۳) تاثیر ضدسرطان و القا کننده آپپتوز ..... ٤۲
۲-۲-۲-٤) خواص فارماکوکینتیک ..... ٤٤
۲-۲-۲-۵) خاصیت سم شناسی ..... ٤۵
فصل سوم مواد و روشها ..... ٤٦
۳-۱) مواد و روشهای تحقیق ..... ٤۷
۳-۱-۱) سلولها ..... ٤۷

۳-۱-۲) مواد و وسایل..... ٤٧
۳-۱-۳) روش کار .....٥٢
۳-۱-۳-۱) کشت سلول و تست MTT.....٥٢
۳-۱-۳-۲)تست کامت.....٥٤
فصل چهارم نتایج .....٥٧
٤-۱) اثر سیاه دانه و تیموکینون بر سمیت ایجاد شده در سلول های PC12 ناشی از محرومیت سرم/گلوکز..... .....٥٨
٤-۱-۱) اثر سیاه دانه بر درصد زنده ماندن سلول هایPC12 به دنبال آسیب ایسکمیک (SGD).....٥٨
٤-۱-۲) اثر تیموکینون بر درصد زنده ماندن سلول هایPC12 به دنبال آسیب ایسکمیک.....٦٠
٤-۲) ارزیابی اثر محافظتی عصاره سیاهدانه و تیموکینون بر آسیب DNA در شرایط محرومیت از سرم/گلوکز.....٦٣
٤-۲-۱)اثر محافظتی عصاره سیاهدانه بر آسیب DNA در شرایط محرومیت از سرم/گلوکز.....٦٣
٤-۲-۲) ارزیابی اثر محافظتی تیموکینون بر آسیب DNA در شرایط محرومیت از سرم/گلوکز.....٦٣
٤-۲-۳) تاثیر محافظتی گاما توکوفرول در ممانعت از آسیب DNA در شرایط ایسکمیک(SGD)..... .....٦٦.
فصل پنجم.....٦٩
٥-۱) بحث و نتیجه گیری.....٧٠
٥-۲) نتیجه گیری کلی .....٧٦
٥-۳) پیشنهادات.....٧٧
فصل ششم پیوست .....٧٨

٦-١)روش های استفاده شده در این تحقیق .....٧٩
٦-١-١)کشت سلول.....٧٩
٦-١-٢) تستMTT.....٨٤
٦-١-٣) تست کامت.....٨٥
منابع .....٩٢

# فهرست شکلها

عنوان صفحه


شکل های فصل اول

شکل ۱- ۱) اجزای گیاه سیاه دانه.....۵

شکل ۱- ۲) ساختمان شیمیایی بعضی از مواد تشکیل دهنده دانه های سیاه دانه.....۸

شکل ۱- ۳) سلولهای PC12.....۱۰

شکل ۱- ٤) مدلی از وقایع مولکولی در طی ایسکمی و ریرفیوژن.....۱۵

شکل ۱- ۵) مراحل تولید گونه های فعال نیتروژن (RNS) .....۱۷

شکل ۱- ٦) نمایش ساختار تغییرات اکسیداتیو اصلی.....۱۸

شکل ۱-۷) نمایی از آلد ییدهای ناشی از پراکسیداسیون لیپیدی.....۱۹

شکل ۱- ۸) نمایی شماتیک از مدل فرضها نمایی شماتیک از مدل فرضها .....۲۰

شکل ۱- ۹) مسیرهای ترمیم آسیبهای اکسیداتDNA .....۲۱

شکل ۱- ۱۰) نحوه اثررادیکال های آزاد اکسیژن برH2 DCF-DA .....۲٦

شکل های فصل دوم

شکل ۲- ۱) مسیرهای اصلی تولید ROS و RNS .....۳۲

شکل ۲- ۲) ساختمان شیمیایی تیموکینون..... ٤۱

شکل های فصل سوم

شکل ۳- ۱) هود .....۵۰

شکل ۳-۲) Eliza reader.....۵۰

شکل ۳- ۳)تانک الکتروفروز.....۵۱

شکل ۳- ٤) میکروسکپ فلورسنت.....۵۱

شکل های فصل چهارم

شکل ٤- ۱) اثرسیاه دانه بروی سمیت ایسکمیک.....۵۹

شکل ٤– ٢) اثر تیموکینون بروی آسیب ایسکمیک.....٦١
شکل ٤– ٣)تاثیر درمانی سیاه دانه و تیموکینون بروی سلول های PC12 .....٦٢
شکل ٤– ٤)درصد DNA در دم در گروههای مختلف درمانی با غلظتهای متفاوت سیاه دانه...٦٤
شکل ٤– ٥)درصد DNA در دم در گروههای مختلف درمانی با غلظتهای متفاوت تیموکینون.٦٥
شکل ٤– ٦) اثر پیش تیمار با γ –tocopherol.....٦٧
شکل ٤– ٧) تصاویر کامتهای ایجاد شده پس از ١٨ ساعت محرومیت از سرم گلوکز و اثرات محافظتی سیاهدانه و تیموکینون در سلولهای PC12 .....٦٨
شکل های فصل ششم
شکل ٦–١) تبدیل MTT به فورمازان .....٨٤
شکل ٦–٢) اصول پایه آزمون کامت.....٨٨
شکل ٦–٣) تصاویر کامت در بیمار آلزایمری.....٩١

# فهرست جداول

عنوان صفحه

جدول ۱-۱ آنالیز هفت نمونه سیاه دانه با روش Gc-MS.....۷
جدول ۱-۲ تشکیل و غیر فعالسازی گونه های فعال اکسیژن (ROS).....۱۲
جدول ٦-۱ مهمترین آنزیم های مورد استفاده در آزمون کامت.....۹۰

## Abbreviation

ACF= Aberrant crypt foci
5Azc= 5-azacytidine
AMP= AMP-activated protein kinase
AOM= Azoxymethan
APAF1= Apoptotic protease activating factor 1
AP= Apurine and Apyrimidine
AS= Alkaline sensitive
ATP= Adnosine Three Phosphate
Bad= BCL2-associated agonist of cell death
Bax= Bcl-2–associated X protein
Bcl2= B-cell lymphoma-2
BER= Base excision repair
BSS= Balanced Salt Solution
CA= Chromosomal aberration
CASP= Comet Assay Software Project
CAT= Catalase
CMV= Cytomegalovirus
CNS= Centeral Nervous System
DNA= Deoxyribonucleic acid
DHTQ = dihydrothymoquinone
DMSO= Dimethyl sulfoxide
DMEM= Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTPs= Deoxynucleoside Three Phosphates
DOX= Doxorubicin
DPPH= Diphenylpicryl hydrazine
CHOP= C/EBP homologous protein
COX2= Cyclooxygenase-2
DSB= Double strand breaks
EAA = Excitatory Amino Acid
EGF= Epidermal Growth Factor
eIF4G= Eukariotic translation initiation factor 4 gamma
eIF2a= Eukaryotic translation initiation factor 2a
ER= Endoplasmic reticulum
ELIZA= Enzyme-Linked Immunusorbent Assay
FCS=Fetal Calfe serum
5-Fu=5-Flurouracil
GC-mass= Gass Chromatography –Mass
GPX=Glutathione Peroxidase
GSH= Reduced Glutathione

5-HETE= 5- hydroxyeicosa-tetraenaoic
4-HNE= 4-Hydroxynonenal
HPLC= High performance liquid chromatography
H2DCF-DA= 2′,7′-dichlorodihydrofluorescein diacetate
HSA= Human Serum Albomin
$IC_{50}$= Inhibitory half concentration
IFN-γ= Iinterferon- γ
IL-4= Interleukin-4
Inos= Inducible nitric oxide
5-LOX= 5-lipoxygenase
LMP= Low melting point
LPS = Lipopolysaccharide
LT= Leukotriens
LMWA= Low Molecular Weight Antioxidants (LMWA)
MC= methylcholanthere
MDA= Malondialdehyd
MDR= Multipledrug resistants
MN= Micronuclei
MPO= Myeloperoxidase
mRNA= Messenger RNA
MS= Multiple sclerosis
MTT= (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium)
NF-κB=Nuclear Factor Kappa B
NGF= Nerve Growth Factor
NK= Natural killer
NO= Nitric oxide
NMP= Normal melting point
NOS= Nitric Oxide Synthase
NS= Nigella sativa
NSO= Nigella sativa oil
OSI= Oxidative stress index
PBS= Phosphate Buffered Saline
PC12= Pheochromocytoma 12
PCV= packet cell value
PKA= Protein kinase A
PFT= Pulmonary function tests
PP1= Protein Phosphatase 1
PPARs= proliferator-activated receptors
PUFA=Poly Unsaturated Fatty Acids
QR= Reductase
RNA= Ribonucleic acid

RNS= Radical nitrogen spices
ROS= Reactive oxygen species
SCGE= Single Cell Gel Electrophoresis
SCI=spinal cord injury
SOD =Superoxide Dismutase
SGD= Serum glucose deprivation
SSB= Single strand breaks
STZ=Streptozotocin
TAC= Total Antioxidant Capacity
TBA= Thiobarbituric acid
TBARS= Thiobarbituric acid-reactive substances
TBHQ= Tertiary Butyl Hydroquinone
Th1= T helper 1
TNFα= Tumor Necrose Factor α
TOS= Total oxidative status
TQ= Thymoquinone

# فصل اول

# مقدمه و کلیات

## ۱-۱) پیش گفتار

گیاه سیاه دانه با نام علمی *Nigella sativa* از دیر باز در طب سنتی به منظور درمان انواعی از اختلالات مورد استفاده قرار گرفته است. علاوه بر این مطالعات دارو شناسی جدید نشان داده است که عصاره این گیاه و یا بعضی از ترکیبات موجود در آن دارای اثرات درمانی متعددی می باشند (۱). سیاه دانه در طب سنتی به عنوان درمان امراضی چون تنگی نفس، فشارخون، دیابت، التهاب، سرفه، برونشیت، سردرد، اگزما، تب، سرگیجه و آنفلوانزا بکار می رفته است (۲). سیاه دانه و ماده فعال حاصل از آن، تیموکینون[1] از پراکسیداسیون غیرآنزیمی چربیها در لیپوزومها ممانعت کرده و بطور قابل ملاحظه ای خاصیت جمع آوری رادیکالهای آزاد را به عهده دارند (۳). سیاه دانه و تیموکینون همچنین سلولهای PC12 [2] را در برابرمرگ سلولی ناشی از سمیت محرومیت سرم/گلوکز حمایت کردند (٤). سیاه دانه اثرات محافظتی در برابر آسیب بافت ماهیچه اسکلتی دارد (٥)، همچنین در جلوگیری از آسیب اکسیداتیو کلیه و کبد در حالت ایسکمی رپرفیوژن نقش موثری دارد (٦، ۷). رادیکالهای آزاد اکسیژن در برخی شرایط وبیماریها در بافتهای بدن بوجود می آیند، بنابراین خواص آنتی اکسیدان سیاه دانه باعث شده در طب سنتی جزو داروهای مفید واقع شود. علیرغم پیشرفتهای قابل ملاحظه در پیشگیری و درمان ایسکمی یا ضربه مغزی هنوز علتی وجود دارد که منجر به مرگ و عدم توانایی در افراد سالخورده می گردد. محرومیت سرم/گلوکز(SGD)[3] مدل بسیار خوبی برای درک مکانیسم های مولکولی آسیب سلولی در طی ایسکمی مغزی و نیز توسعه داروهای محافظت کننده عصبی در برابر آسیب مغزی ناشی از ایسکمی می باشد (٤، ۱۰).

احتمالا گونه های فعال اکسیژن(ROS)[4] در آسیب سلول عصبی ناشی از ایسکمی بصورت اختلالات نورودژنراتیو نقش دارند و در رده های سلولی عصبی مختلف مانند PC12 نیز می توانند سبب آسیب DNA [5] و نهایتا مرگ شوند از اینرو در این مطالعه از مدل سلولی PC12 استفاده شده است (٤). به

[1] Thymoquinone
[2] Pheochromocytoma
[3] Serum Glucose Deprivation
[4] Reactive Oxygen Species
[5] Deoxyribonucleic acid

این منظور با دیدگاهی جدید به خواص دارویی سیاه دانه و ماده مؤثره آن تیموکینون، این تحقیق که سیاه دانه می تواند از آسیب DNA سلولهای PC12 در برابر سمیت سلولی ناشی ازمحرومیت سرم/گلوکز حمایت کنند انجام گردید.

## ۱-۱-۱) سابقه تحقیق:

مطالعه حاضر جهت بررسی اثر محافظت کننده احتمالی عصاره سیاه دانه در برابر آسیب DNA ناشی از محرومیت سرم/گلوکز در سلولهای عصبی PC12 که یک مدل برون تن از ایسکمی مغزی است انجام گردید (۱۰). اثر سیاه دانه بر رادیکالهای آزاد (ROS) به عنوان مدیاتور نوروتوکسیسیته ناشی از محرومیت سرم/گلوکز در سلولهای PC12 بررسی شده است (٤) اما تاکنون تاثیر محافظتی سیاه دانه برمولکول DNA بررسی نگردیده است.

## ۱-۱-۲) هدف تحقیق:

علاوه بر رادیکالهای آزاد اکسیژن که در نتیجه متابولیسم اکسیداتیو در بدن بصورت درونزاد تولید میشوند، موجودات زنده تحت تاثیر فشارهای اکسیداتیو بسیاری در محیط اطراف خود هستند، مولکول DNA هسته ای و بویژه DNA میتوکندریایی از مولکولهای هدف اصلی این فشارهای اکسیداتیو می باشند و همگی آنها باعث ایجاد جهش در DNA شده که در صورت عدم بکارگیری بموقع و صحیح مکانیسمهای ترمیمی می توانند منجر به ایجاد اختلالات سلولی و همچنین ایجاد سرطان شوند (۳٦).

در مطالعات فراوانی ثابت شده یکی از روشهای مقابله با ژنوتوکسینها استفاده از آنتی اکسیدانتها میباشد (۲۷). در مطالعات بسیاری اثرات آنتی اکسیدانتی سیاه دانه و ماده موثره آن تیموکینون به اثبات رسیده است (۹، ۳). از اینرو بر آن شدیم اثر آنتی اکسیدانی سیاه دانه و تیموکینون را از نظر محافظت کنندگی آن بر آسیبهای اکسیداتیو DNA در شرایط محرومیت از سرم/گلوکز در محیط آزمایشگاه[1] بروش کامت [2]بررسی کنیم.

---

[1] Invitro
[2] Comet

## ۱–۲) کلیات

### ۱–۲–۱) مختصری در مورد گیاه سیاه دانه *Nigella sativa*

یکی از چیز هایی که در مقبره توتن خامن پیدا شد سیاه دانه بود. این گونه در ناحیه مدیترانه و کشورهای غرب آسیا نظیر هند و پاکستان و افغانستان رشد می کند. در بعضی از مذاهب قدیمی و طب پیشین از آن یاد شده است، مثلا بقراط از آن تحت عنوان "ملانتیون" نام برده است، در دین اسلام نیز به عنوان یکی از مهمترین داروهای شفابخش نام برده شده است .

*Nigella sativa* یا گیاه سیاه دانه جزو گیاهان دارویی بسیار پر مصرف می باشد، این گیاه متعلق به خانواده*Ranunculacea* یا آلاله ها می باشد. گیاهی است علفی، پا کوتاه و گل آذین بصورت انتهایی می باشد (۱). گونه های آن در حدود ۳۰–۲۰ سانتیمتر رشد می کنند و گلها به رنگهای صورتی، آبی و ارغوانی کمرنگ با ۱۰–۵ گلبرگ هستند، میوه به صورت کپسول و شامل چند واحد فولیکولی است که هر کدام شامل چندین دانه بسته به نوع گیاه می باشد. کپسول بزرگ و باد کرده است. بخشی از گیاه که برای درمان استفاده می شود دانه ها هستند که محتوی اسانس با طعم تلخ و تند و گزنده می باشند. دانه ها بطور معمول به عنوان چاشنی و نگهدارنده غذا استفاده می شوند (۱). این گیاه دارای ١٤ گونه است برخی از گونه های آن عبارتند از: *N.hispanica ,N.arvensis, N. sativa ,N.orientali ,N.nigellastrum ,N.integrifoli ,N.ciliari* (۸).