

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری



موسسه آموزش عالی کابین  
شیرودلی - شیراز

## گروه زیست‌شناسی

بررسی میزان بیان ژن **MiR19-b** مشتق شده از آگزوزوم های نمونه حیوانی  
بر اثر القای سکته قلبی با تعیین شاخص‌های بافتی

شماره ثبت:

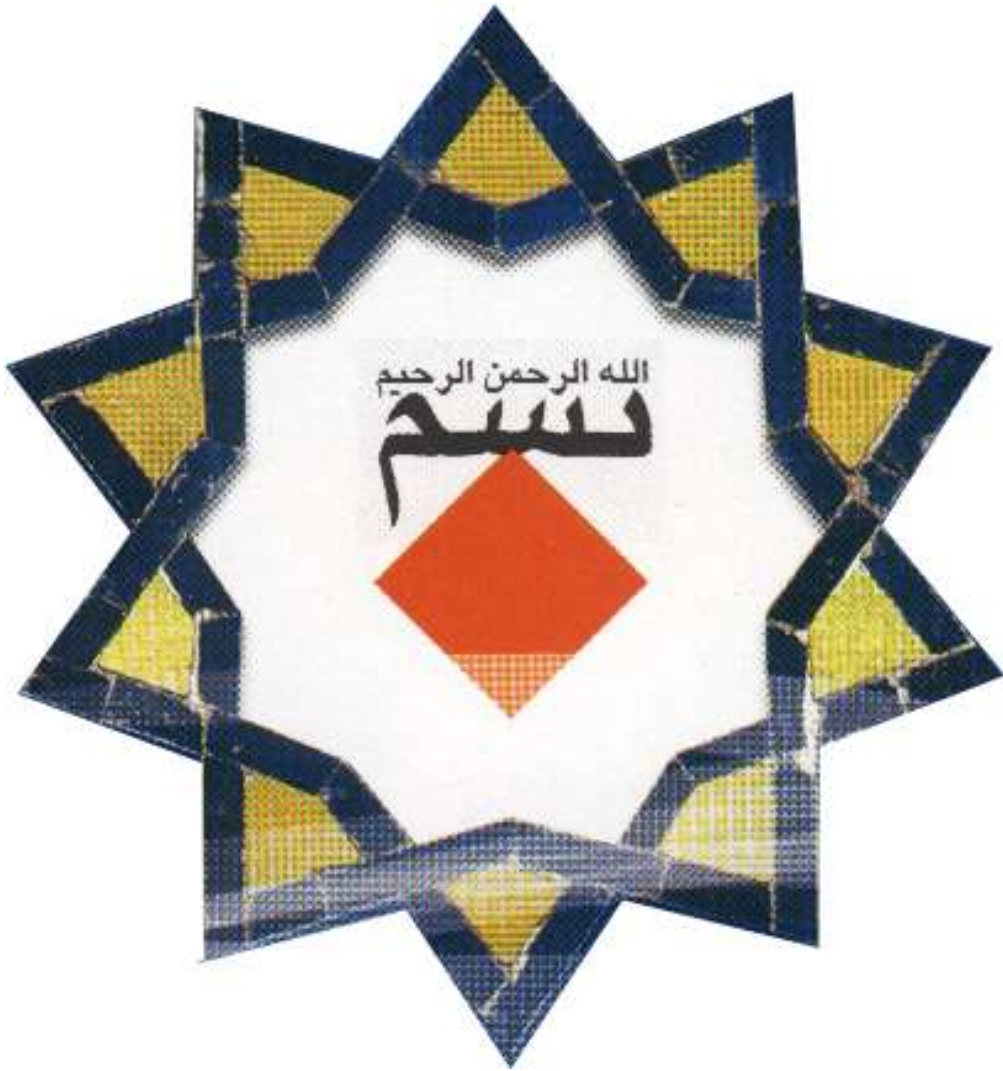
به کوشش:

اکرم زوار سهل آبادی

استاد راهنما

دکتر سعیده ثمره موسوی

پاییز ۱۴۰۰



## اظهارنامه (مربوط به انتشار پایان‌نامه)

اینجانب اکرم زوار سهل‌آبادی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته سلولی و مولکولی گروه زیست‌شناسی مؤسسه آموزش عالی کاویان مشهد نویسنده پایان‌نامه برر سی میزان بیان ژن MiR19-b مشتق شده از آگزوزوم های حیوانی اثر بر اثر القای سخته قلبی با تعیین شاخص‌های بافتی تحت راهنمایی دکتر سعیده ثمره موسوی متعهد می‌شوم:

- تحقیقات در این پایان‌نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهش‌های محققان دیگر به مرجع مورداستفاده استناد کرده‌ام.
- مطالب مندرج در پایان‌نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نگردیده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به مؤسسه آموزش عالی کاویان مشهد است. مقالات مستخرج بانام «گروه زیست‌شناسی مؤسسه آموزش عالی کاویان مشهد» و یا « **Department of Biology, Kavian Institute of Higher Education, Mashhad, Iran** » به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان‌نامه تأثیرگذار بوده‌اند را در مقالات مستخرج از پایان‌نامه رعایت کنم و در تمامی آن‌ها نام استاد (ان) راهنما به‌عنوان نویسنده مسئول و نیز نام استاد (ان) مشاور و نشانی الکترونیکی دانشگاهی آنان را قید نمایم.
- در کلیه مراحل انجام این پایان‌نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی داشته یا از آن‌ها استفاده کرده‌ام، اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق پژوهشی را رعایت نموده‌ام.

تاریخ:

امضای دانشجو

### مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم‌افزارها و تجهیزات ساخته شده) متعلق به مؤسسه آموزش عالی کاویان مشهد می‌باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوط ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان‌نامه بدون ذکر مرجع مجاز نیست.

به نام خدا

## گواهی اعضای کمیته‌ی پایان‌نامه

بررسی میزان بیان ژن **MiR19-b** مشتق شده از آگزوزوم های نمونه حیوانی  
بر اثر القای سکته قلبی با تعیین شاخص های بافتی

به کوشش:

اکرم زوار سهل آبادی

## پایان‌نامه

ارائه شده به تحصیلات تکمیلی مؤسسه آموزش عالی کاویان مشهد به عنوان بخشی از فعالیت‌های  
تحصیلی لازم جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته‌ی:

زیست‌شناسی سلولی و مولکولی

از مؤسسه آموزش عالی کاویان مشهد

جمهوری اسلامی ایران

---

ارزیابی کمیته‌ی پایان‌نامه، با درجه: Choose an item؛ و نمره: Click here to enter text.

دکتر نام را وارد نمایید، مرتبه دانشگاهی نام موسسه یا گروه.....

دکتر نام را وارد نمایید، مرتبه دانشگاهی نام موسسه یا گروه.....

دکتر نام را وارد نمایید، مرتبه دانشگاهی نام موسسه یا گروه.....

دکتر نام را وارد نمایید، مرتبه دانشگاهی نام موسسه یا گروه.....

دکتر نام را وارد نمایید، مرتبه دانشگاهی نام موسسه یا گروه.....

Choose an item. ماه Choose an item.

این پایان نامه را تقدیم می‌کنم به:

تقدیم به پدرم

کوهی استوار و حامی من در طول تمام زندگی

به مادرم

سنگ صبوری که فضای زندگی به من آموخت

به همسرم

که در سایه بیماری و مهدلی او به این منظور نائل شدم.

تقدیم به دلبندان عزیزم، هستی و هالیون

امید بخش جانم که آسایش و آرامش من هستند.

## سپاسگزاری

سپاس بی‌کران پروردگاریت را که هستی‌مان بخشید و به طریق علم و دانش را بنمونمان شد

و به هم نشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه‌چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت.

به مصداق «من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق» بسی شایسته است از استاد

راهنمای فریخته و فرزانه سرکار خانم دکتر سعیده ثمره موسوی و جناب آقای دکتر رضا صاحبی

که با کرامتی چون خورشید، سرزمین دل را روشنی بخشید و گلشن سرای علم و

دانش را بار اهنمایی‌های کارساز و سازنده بارور ساختند؛ تقدیر و تشکر نمایم.

## چکیده

بررسی میزان بیان ژن MiR19-b مشتق شده از اگزوزوم های نمونه حیوانی  
بر اثر القای سکته قلبی با تعیین شاخص های بافتی

به کوشش:

### اکرم زوار سهل آبادی

از آنجایی که اگزوزوم ها حاوی ترکیبات مختلفی از جمله MicroRNA ها بوده و بسیاری از این ترکیبات از طریق مسیرهای مختلف سلولی می توانند در بازسازی سلول های آسیب دیده ناشی از سکته قلبی نقش کلیدی داشته باشند، لذا هدف از پژوهش حاضر شناسایی MiR19-b به عنوان روشی جهت تشخیص زودهنگام سکته قلبی می باشد.

**روش کار:** در پژوهش حاضر، برای ایجاد سکته حاد قلبی، تزریق زیر جلدی ایزوپرنالین انجام گرفت. جهت تأیید نهایی سکته، از سنجش تست های آزمایشگاهی CPK-M-B و تروپونین استفاده گردید. همچنین ساختار بافتی فیبرهای قلبی قبل و پس از ایجاد سکته مورد ارزیابی قرار گرفت. مطابق با پروتوکل شرکت سازنده کیت و پس از انجام چندین دور سانتریفیوژ اگزوزوم ها استخراج شدند. برای مشاهده مورفولوژی و شکل ظاهری اگزوزوم ها و تعیین اندازه آن ها به ترتیب از روش های عکس برداری میکروسکوپ الکترونی عبوری و روش پراکنندگی دینامیکی نور استفاده گردید. با کمک نانودراپ غلظت و خلوص RNA استخراج شده سنجیده و در نتیجه MiR19-b استخراج و بیان آن توسط واکنش Real-TimePCR قبل و پس از سکته حاد قلبی مورد ارزیابی قرار گرفت.

**نتایج:** بررسی بافت شناسی با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین بر روی بافت میوکارد گروه کنترل (شاهد) و گروه مدل نشان داد که ساختار مورفولوژیکی طبیعی قلب تغییر کرده و علائم نکروز، نفوذ سلول های لکوسیتی و عدم انسجام فیبرهای عضلانی قلبی مشاهده شد. همچنین سایر نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد، بیان MiR19-b در گروه تحت سکته نسبت به گروه کنترل بالاتر بوده اگرچه این اختلاف در سطح  $(P < 0.05)$  معنادار نبوده است. به نظر می رسد تفاوت در نحوه ی القای سکته، عدم استفاده هم زمان از سایر MicroRNA های دخیل در بیماری های قلبی- عروقی و استفاده از RNA مشتق شده از اگزوزوم (در مقابل استفاده مستقیم از RNA موجود در سلول) از جمله دلایل تفاوت بیان ژن، در مطالعه حاضر است. لذا پیشنهاد می گردد این پژوهش به منظور درک بهتر فرایندهای سلولی، برهم کنش بین ژن های مرتبط با بیماری و بررسی بیان هم زمان چند ژن با هم ادامه یابد.

واژه های کلیدی: بیماری قلبی- عروقی، سکته حاد قلبی، اگزوزوم، MicroRNA، MiR19-b

## فهرست مطالب

### بررسی میزان بیان ژن MiR19-b مشتق شده از اگزوزوم های نمونه حیوانی بر اثر القای سکته قلبی با تعیین شاخص های بافتی

عنوان شماره صفحه

---

اهداف پروژه	۱
۱-۱ بیماری های قلبی - عروقی	۳
۱-۱-۱ تعریف بیماری قلبی - عروقی	۳
۲-۱-۱ سکته قلبی	۳
۱-۲-۱-۱ علت حمله قلبی	۳
۱-۱-۲-۱-۱ علائم سکته قلبی یا انفارکتوس حاد قلب	۳
۲-۲-۱-۱ عوامل مسدودکننده عروق کرونری	۴
۳-۲-۱-۱ ریسک فاکتورها Risk factors	۴
۱-۳-۲-۱-۱ ریسک فاکتورهای قابل اصلاح Modifiable risk factor	۵
۲-۳-۲-۱-۱ ریسک فاکتورهای غیرقابل اصلاح Non- Modifiable risk factor	۵
۲-۱ معرفی برخی از بیماری های قلبی - عروقی	۵
۳-۱ سکته حاد قلبی (AMI)	۵
۴-۱ وزیکول های خارج سلولی (EV)	۶
۱-۴-۱ تعریف اگزوزوم	۷
۲-۴-۱ تشکیل و ترشح اگزوزوم ها	۷
۳-۴-۱ برهم کنش اگزوزوم ها با سلول هدف	۹
۴-۴-۱ عملکرد بیولوژی اگزوزوم ها	۹
۵-۴-۱ مزیت اگزوزوم ها به عنوان حامل	۹



۱۰	۶-۴-۱	اگزوزوم ها و بیماری
۱۰	۵-۱	میکرو RNA ها
۱۰	۱-۵-۱	معرفی میکرو RNA
۱۰	۲-۵-۱	تولید miRNA
۱۱	۳-۵-۱	شکل گیری MicroRNA
۱۲	۴-۵-۱	اهمیت میکرو RNA های قلبی
۱۲	۵-۵-۱	ارتباط میکرو RNA ها و بیماری های قلبی - عروقی
۱۳	۶-۵-۱	معرفی MiR-19b
۱۳	۱-۶-۵-۱	نقش بیولوژیکی شاخه MiR-17-92
۱۴	۲-۶-۵-۱	خوشه MiR-17-92 و بیماری های مادرزادی قلب (CHD)
۱۴	۳-۶-۵-۱	نقش خوشه MiR-17-92 در MI یا Myocardial Infarction
۱۴	۷-۵-۱	معرفی اختصاصی MiR19-b
۱۵	۶-۱	معرفی بافت شناسی قلب
۱۶	۷-۱	مروری بر تحقیقات گذشته در زمینه ی پروژه حاضر
۲۰	۱-۲	مراحل عمومی آزمایش
۲۰	۱-۱-۲	فهرست وسایل مورد استفاده
۲۱	۲-۱-۲	فهرست مواد مورد استفاده
۲۲	۲-۲	پرورش و نگهداری موش به عنوان حیوان آزمایشگاهی
۲۳	۳-۲	تزریق داروی القای سکتة قلبی
۲۴	۴-۲	استخراج اگزوزوم
۲۵	۱-۴-۲	تعیین خصوصیات اگزوزوم های جدا شده از نمونه سرم
۲۵	۱-۱-۴-۲	عکس برداری توسط میکروسکوپ الکترونی
۲۶	۲-۱-۴-۲	تعیین اندازه و درصد اگزوزوم با استفاده از روش پراکندگی دینامیکی نور (DLS)
۲۷	۵-۲	استخراج RNA
۲۹	۶-۲	تعیین غلظت RNA توسط Micro-voluspectrophotometer (نانودراپ)
۲۹	۷-۲	سنتز cDNA
۳۲	۸-۲	واکنش Real- Time PCR

۳۲	..... QPCR ۱-۷-۲ واکنش
۳۳	..... ۹-۲ مطالعات بافت‌شناسی
۳۳	..... ۲-۹-۱ پاساژ بافت
۳۳	..... ۲-۹-۱-۱ ثابت کردن
۳۴	..... ۲-۹-۱-۲ آب‌گیری
۳۴	..... ۲-۹-۱-۳ شفاف‌سازی
۳۴	..... ۲-۹-۱-۴ قالب‌گیری و آغشتگی با پارافین
۳۴	..... ۲-۹-۲ تهیه مقطع بافتی
۳۵	..... ۲-۹-۲-۱ برش‌گیری
۳۶	..... ۲-۹-۳ رنگ‌آمیزی
۳۶	..... ۱-۳-۹-۲ رنگ هماتوکسیلین ائوزین (E&H)
۳۹	..... ۱-۳ بخش اول نتایج حاصل از اندازه‌گیری آنزیم‌های قلبی
۳۹	..... ۱-۱-۳ آزمایش کراتینین فسفو کیناز
۳۹	..... ۲-۱-۳ آزمایش تروپونین
۴۲	..... ۱-۳-۱-۳ بررسی هیستولوژی بافت قلب
DLS	..... ۲-۳ بخش دوم بررسی نتایج حاصل از تصاویر میکروسکوپ الکترونی و اندازه‌گیری اگزوزوم‌ها با روش
۴۲	.....
۴۲	..... ۱-۲-۳ بررسی اگزوزوم‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری
۴۳	..... ۲-۲-۳ بررسی اگزوزوم‌ها با استفاده از روش پراکندگی دینامیکی نور (DLS)
۴۵	..... ۳-۳ نتایج حاصل از Real Time به‌منظور بررسی میزان بیان ژن MiR-19b
۴۶	..... ۴-۳ بخش چهارم آنالیز آماری
۴۸	..... ۱-۴ اهداف پروژه
۵۰	..... ۲-۴ بررسی پروتوکل‌های مورد مطالعه جهت القای سکنه قلبی و استخراج اگزوزوم
۵۱	..... ۳-۴ بررسی پروتوکل‌های مورد مطالعه جهت استخراج RNA و سنتز cDNA
۵۱	..... ۱-۳-۴ روش‌های شناسایی MiRNA ها
۵۲	..... ۴-۴ پیشنهادات

## فهرست جداول

عنوان و شماره ..... صفحه

---

جدول ۱-۱	مروری بر خوشه‌ی MiR-17-92	۱۳
جدول ۱-۲	مشخصات وسایل استفاده‌شده	۲۰
جدول ۲-۲	مواد مورد استفاده	۲۱
جدول ۴-۲	مواد مورد استفاده برای واکنش پلی آدنیلایسیون	۲۹
جدول ۵-۲	مقادیر و مواد لازم برای تهیه مخلوط کلی واکنش سنتز miRNA cDNA	۳۰
جدول ۶-۲	چرخه دمایی جهت سنتز miRNA cDNA	۳۰
جدول ۷-۲	مقادیر و مواد لازم برای تهیه miRNA real time PCR master mix	۳۲
جدول ۸-۲	چرخه نمایی واکنش miRNA real time PCR	۳۳
جدول ۹-۲	PCR پرایمر مورد استفاده در واکنش Real -Time	۳۳

## فهرست اشکال

عنوان و شماره ..... صفحه

- شکل ۱-۱ مقایسه‌ی مراحل تشکیل میکروویزیکول‌ها و آگزوزوم ..... ۷
- شکل ۱-۲ بیوزنز و شناسایی آگزوزم ها ..... ۸
- شکل ۱-۳ مراحل تولید MicroRNA ..... ۱۱
- شکل ۱-۴ ارتباط MicroRNA ها و بیماری‌های قلبی - عروقی ..... ۱۲
- شکل ۱-۵ عضله قلب از سلول‌های شاخه نامنظم تشکیل شده است که به وسیله‌ی دیسک‌های طولی هم متصل و انقباض شدید و غیرارادی را نشان می‌دهد ..... ۱۵
- شکل ۱-۲ موش نر نژاد ویستار ..... ۲۲
- جدول ۲-۳ رده‌بندی موش نژاد Wstar ..... ۲۳
- شکل ۲-۲ روند استخراج آگزوزوم از نمونه‌ی سرم (A) محلول A و B کیت استخراج آگزوزوم. (B) نگهداری محلول A در آب با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد. (C) سانتریوفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد. (D) دو فاز شدن پس از سانتریوفیوژ ..... ۲۵
- شکل ۳-۲ میکروسکوپ الکترونی عبوری مورداستفاده در آزمایشگاه مرکزی - دانشگاه فردوسی ..... ۲۶
- شکل ۴-۲ تصویر دستگاه پارتیکل سائز (تعیین اندازه ذرات) مورداستفاده در آزمایشگاه مرکزی - دانشگاه فردوسی ..... ۲۷
- شکل ۵-۲ روند استخراج RNA (A) قبل از اضافه کردن کیت استخراج RNA (B) محلول کیت استخراج RNA- PLUS ..... ۲۸
- (C) اضافه کردن کیت استخراج RNA به نمونه (D) نمونه حاصل پس از استخراج RNA ..... ۲۸
- شکل ۶-۲ نمودار بررسی تعیین غلظت RNA با نانودراپ ..... ۲۹
- شکل ۷-۲ روند سنتز cDNA (کیت سنتز cDNA B) بافر آنزیم (C) آداپتور، dNTP، آنزیم (D) دستگاه ترموسایکلر ..... ۳۱
- شکل ۸-۲ ژلاتینه کردن لام ها ..... ۳۵
- شکل ۹-۲ مراحل برش گیری ..... ۳۵
- شکل ۱-۳ (A) نمودار مقایسه فعالیت آنزیم کراتین کیناز در گروه کنترل و سکنه (B) نمودار مقایسه غلظت تروپونین در گروه کنترل و سکنه ..... ۴۰
- شکل ۲-۳ (A) مقطع طولی بافت قلب سالم. فیبرهای قلبی بانظم مشخص در کنار یکدیگر قرار دارند ..... ۴۱
- (B) مقطع طولی بافت نمونه با ایجاد سکنه قلبی. به هم ریختگی در توالی استقرار فیبرهای قلبی مشاهده می‌شود. ..... ۴۱

- (C) و (D) مقاطع طولی نکرروز بافتی و به هم ریختگی بافتی در بین فیبرهای قلبی در نمونه‌های سخته مشاهده می‌شود. ۴۱.....
- شکل ۳-۳ (A) تصویر میکروسکوپی اگزوزوم توسط میکروسکوپ TEM (رنگ‌آمیزی یورانیل استات) با بزرگنمایی ۱۰۰ nm (B) تصویر میکروسکوپی اگزوزوم با تکنیک TEM (رنگ‌آمیزی یورانیل استات) با بزرگنمایی ۲۰۰ nm ۴۲.....
- شکل ۳-۴ سنجش اندازه اگزوزوم ها توسط DLS، توزیع زنگوله‌ای شکل با نقطه‌ی اوج ۸۰ نانومتری را نشان داد. ۴۳.....
- شکل ۳-۵ نمودار منحنی ذوب. وجود باندهای تک نشان می‌دهد تک‌محصول اختصاصی و بدون مشکل تکثیر شده است. ۴۴.....
- شکل ۳-۶ نمودار منحنی تکثیر ژن. نشان‌دهنده تکثیر با اختصاصیت بالا ۴۵.....
- شکل ۳-۷ نمودار بیان نسبی MiR-19b در دو گروه کنترل و گروه تحت سخته قلبی ۴۶.....
- Control: نمونه بدون سخته CAD: نمونه همراه با سخته قلبی ۴۶.....

﴿مقدمه﴾

بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO) بیماری‌های قلبی - عروقی مهم‌ترین علل مرگ‌ومیر در جهان هستند و پیش بینی می‌شود تا سال ۲۰۳۰ حدود ۳۰ میلیون نفر در سال جان خود را به دلیل این بیماری از دست خواهند داد. درمان‌های طولانی‌مدت و هزینه‌های هنگفت درمان این بیماران چالش مالی بسیار بزرگی برای خانواده‌ها و نظام سلامت کشورهایی است که افراد مبتلا در آن‌ها بیشتر است. سکتة قلبی یک وضعیت تهدیدکننده زندگی است و زمانی رخ می‌دهد که جریان خون به عضله قلب ناگهان قطع شده و این امر آسیب بافتی را به همراه خواهد داشت. شریان‌های عروق کرونر به طور خاص خون را به عضله قلب می‌رسانند. هنگامی که این سرخرگ‌ها به علت ایجاد پلاک، مسدود شده یا تنگ می‌شوند، جریان خون به قلب به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد و یا به طور کامل متوقف می‌شود. علائم اولیه بالینی یا کلینیکی، شامل درد قفسه سینه، تنگی نفس و... است و روش‌های تشخیصی معمول سکتة یا انفارکتوس قلبی شامل: تست‌های آزمایشگاهی، روش الکتروکاردیوم، تصویربرداری (اکو) و... می‌باشد، که البته در بسیاری از این موارد مانند تست‌های تشخیصی آزمایشگاهی (تست تروپونین) و تست (CK-MB) قبل از ایجاد سکتة ارزش تشخیصی ندارند و معمولاً پس از ایجاد سکتة قابل اندازه‌گیری هستند.

اگزوزوم‌ها و ویزیکول‌های کوچک با توپولوژی شبیه غشای پلاسمایی هستند که در تعداد زیادی از مایعات سلول‌های یوکاریوت شامل: خون، ادرار، بزاق، مایع منی، سرم و غیره وجود دارند. عموماً اندازه اگزوزوم‌ها ۱۰۰-۴۰ نانومتر است. علاوه بر پروتئین‌ها، اگزوزوم‌ها شامل لیپیدهای درگیر در انتقال سلول، mRNA ها ی ترجمه شونده همچنین RNA های کوچک هستند. در میان RNA های کوچک، miRNA ها با نسبت بیشتری در اگزوزوم‌ها وجود دارند.

MicroRNA ها یا به اختصار miRNA مولکول‌های RNA کوتاه با طول ۱۹ تا ۲۳ نوکلوتید هستند که از طریق کنترل بیان ژن‌های مختلف به عنوان تنظیم‌کننده‌ی اصلی گسترده عمل می‌کنند و تنظیم نامنظم آن‌ها منجر به بروز و توسعه بیماری‌ها می‌شود. امروزه میکرو RNA ها به عنوان نشانگرهای زیستی و پیش‌آگاهی بیماری‌ها و همچنین در طبقه‌بندی شناسایی انواع مختلف سرطان‌ها کاربرد دارند.

یکی از اولین MiRNA های انکوژنتیک شناخته‌شده، خوشه MiRNA-17-92 است که در انسان بر روی جایگاه کروموزومی 13q31.3 قرار گرفته و از یک رونوشت پلی سیسترونیک به هفت شاخه شامل: MiR-17-5P و MiR-17-3P و MiR-18a و MiR-19a و MiR-19b و MiR-20 , MiR-92a و تقسیم بندی می‌شود. امروزه تأیید شده است که مقدار شاخه MiR-17-92 در بسیاری از بیماری‌های قلبی - عروقی مثل سکتة قلبی، کاردیومیوپاتی، نامنظمی ضربان قلب و... تغییر می‌کند اگرچه مکانیسم عملکرد آن‌ها هنوز به طور کامل شناخته نشده است. این خوشه پروسه‌های مختلفی را در طی ترمیم عضله‌ی قلب تنظیم کرده و تعدادی از اعضای این خوشه، به ویژه MiR19-b به عنوان تنظیم‌کننده‌های درمانی ارزشمند در درمان بیماری ایسکیمیک قلب شناخته شده‌اند. MiR19-b، در بین اعضای خوشه‌ی MiR-17-92 فرایند تکثیر سلول‌های کاردیومیسیت را افزایش داده که این امر حفاظت قلب از آسیب‌های ناشی از سکتة قلبی را به همراه خواهد داشت.

## اهداف پروژه

هدف از انجام این پروژه در مرحله اول، استخراج و جداسازی اگزوزوم ها از نمونه سرم خون مدل حیوانی، تأیید نهایی سکتة با سنجش تست‌های آزمایشگاهی و مقایسه بافت‌شناسی توسط تکنیک رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین می‌باشد. پروتوکل استخراج اگزوزوم از نمونه سرم می‌تواند به‌عنوان مدل مناسبی جهت تحقیقات کارهای آزمایشگاهی تخصصی مورد استفاده قرار گیرد. از اهداف دیگر این پروژه، استخراج MiR19-b و مقایسه میزان بیان آن قبل و پس از القای سکتة حاد قلبی بوده است.



# فصل اول

مروری بر تحقیقات انجام شده

## ۱-۱ بیماری‌های قلبی - عروقی

### ۱-۱-۱ تعریف بیماری قلبی - عروقی

قلب، عضو اصلی سیستم قلبی - عروقی است که شامل تعداد زیادی عروق خونی است. برخی از مهم‌ترین عروق، شریان‌هایی هستند که خون را از قلب به تمام قسمت‌های بدن می‌رسانند (۱).  
بیماری‌های قلبی - عروقی به‌عنوان محدوده‌ای از شرایطی در نظر گرفته می‌شوند که بر روی کیفیت زندگی ما اثر می‌گذارند و علت اصلی مرگ‌ومیر در جهان به‌حساب می‌آیند. بیماری‌های قلبی - عروقی معمولاً شامل شرایطی هستند که در آن جریان خون در رگ‌ها مسدود و یا تنگ‌شده که ممکن است به سکته قلبی منجر شود (۲).

### ۱-۱-۲ سکته قلبی

سکته قلبی با اصطلاح پزشکی انفارکتوس حاد میوکارد شناخته‌شده است (۳). سکته قلبی یک وضعیت تهدیدکننده زندگی است و زمانی رخ می‌دهد که جریان خون به عضله قلب ناگهان قطع شده و این امر آسیب بافتی را به همراه دارد (۴). شریان‌های عروق کرونر به‌طور خاص خون را به عضله قلب می‌رسانند. هنگامی که این سرخرگ‌ها به علت ایجاد پلاک، مسدود شده یا تنگ می‌شوند، جریان خون به قلب به‌طور قابل‌توجهی کاهش می‌یابد و یا به‌طور کامل متوقف می‌شود. پلاک، ماده‌ای است که عمدتاً از چربی، کلسترول و مواد زائد سلولی تشکیل شده است (۲).

### ۱-۱-۲-۱ علت حمله قلبی

#### الف) بیماری عروق کرونری قلب

حمله قلبی زمانی اتفاق می‌افتد که جریان خون حاوی اکسیژن، به قسمتی از قلب مسدود شود و ماهیچه‌های قلب به‌اندازه‌ی کافی اکسیژن دریافت نکنند. اکثر موارد حمله قلبی بر اثر بیماری عروق کرونری قلب رخ می‌دهد (۲، ۵).

#### ب) اسپاسم و گرفتگی عروق کرونری قلب

یک دلیل کمتر شایع برای حمله قلبی، اسپاسم شدید و تنگ شدن عروق کرونری قلب است. این اسپاسم باعث مسدود شدن جریان خون در رگ می‌شود. اسپاسم و گرفتگی عروق قلب می‌تواند بر اثر تجمع رسوب در رگ‌ها نباشد اما علت اسپاسم همیشه مشخص نیست (۵).

### ۱-۱-۲-۱-۱ علائم سکته قلبی یا انفارکتوس حاد قلب

یکی از علائم کلاسیک سکته قلبی، ایجاد درد در ناحیه قفسه سینه است؛ اما علائم می‌تواند کاملاً متفاوت باشند.

شایع‌ترین علائم سکته قلبی عبارت‌اند از:

- احساس فشار یا تنگی در قسمت قفسه سینه

- احساس درد در قفسه سینه، پشت و یا سایر قسمت‌های فوقانی بدن که ممکن است چند دقیقه طول بکشد یا هر چند وقت یک‌بار مجدداً احساس درد ایجاد شود.

- تنگی نفس
- عرق کردن
- حالت تهوع
- ضربان شدید قلب
- سرفه
- سرگیجه

باید توجه داشت که تمام افرادی که دچار سکته قلبی می‌شوند، همگی همه‌ی علائم با همان شدت را تجربه نمی‌کند. یکی از علائم مشابه بین زنان و مردان درد در ناحیه قفسه سینه است (۵، ۶).

### ۱-۲-۲ عوامل مسدودکننده عروق کرونری

#### کلسترول بد Low Density Lipoprotein

کلسترول بد، که لیپوپروتئین (LDL) نیز نامیده می‌شود، یکی از دلیل اصلی انسداد در شریان‌ها هستند. کلسترول ماده‌ی بی‌رنگ است که در غذای روزانه وجود دارد. همه‌ی کلسترول‌ها بد نیستند، اما کلسترول LDL می‌تواند به دیواره‌ی شریان‌ها بچسبد و پلاک تولید کند (۴).

#### چربی اشباع‌شده

چربی‌های اشباع‌شده ممکن است به ایجاد پلاک در عروق کرونری کمک کنند. چربی اشباع‌شده بیشتر در محصولات گوشتی و لبنی، از جمله گوشت گاو، کره و پنیر یافت می‌شود. این چربی‌ها با افزایش کلسترول بد در سیستم خون و کاهش میزان کلسترول خوب می‌تواند منجر به انسداد شریان‌ها شود (۴).

#### ترانس چرب

نوع دیگری از چربی که سبب مسدود شدن عروق می‌شود چربی ترانس یا چربی هیدروژنه است. ترانس چربی معمولاً مصنوعی تولید می‌شود و می‌تواند در انواع غذاهای فرآوری شده یافت شود. چربی ترانس معمولاً بر روی برچسب‌های مواد غذایی به‌عنوان روغن هیدروژنه نام‌برده می‌شود (۷).

### ۱-۲-۳ ریسک فاکتورها Risk factors

برخی از عوامل مستعد کننده سکته قلبی و یا بیماری‌های قلبی - عروقی قابل‌پیشگیری و اصلاح‌پذیر بوده و در مقابل گروهی از این عوامل قابل اصلاح و قابل‌پیشگیری نمی‌باشند (۸).

### ۱-۱-۲-۳-۱-۱ ریسک فاکتورهای قابل اصلاح Modifiable risk factor

فعالیت ورزشی

تنظیم وزن

رژیم غذایی

مصرف دخانیات (۲، ۵، ۷).

### ۱-۱-۲-۳-۱-۲ Non- Modifiable risk factor ریسک فاکتورهای غیر قابل اصلاح

سن

جنسیت

سابقه خانوادگی

داروهای شیمیایی و پرتودرمانی در سرطان (۹، ۲، ۵، ۷).

## ۱-۲ معرفی برخی از بیماری‌های قلبی - عروقی

بیماری عروق کرونری Coronary artery diseases

در این بیماری شریان‌هایی که اکسیژن و خون را به قلب می‌رسانند باریک می‌شوند (۹).

بیماری دریچه‌ای قلب Valvar heart disease

ممکن است یک یا چند دریچه قلب به خوبی عمل نکنند (۱۰).

بیماری مادرزادی قلب Congenital Heart Detect

آریتمی‌های قلبی یا نامنظمی ریتم قلب heart arrhythmia

نارسایی قلبی Heart failure

در این بیماری عضله قلب نمی‌تواند با قدرت و به اندازه کافی خون را پمپاژ کند (۱۰).

بیماری‌های مربوط به عضله قلب Heart muscle

در این نوع نارسایی معمولاً دیواره قلب ضخیم شده و یا خود عضله قلب از حد نرمال بزرگ‌تر می‌شود (۵).

## ۱-۳-۱ سکته حاد قلبی (AMI)<sup>۱</sup>

بیماری عروق کرونر قلب شامل طیف گسترده‌ای می‌باشد که یک سر آن، آسیب قابل برگشت میوکارد و انتهای دیگر آن شامل، انفارکتوس حاد میوکارد است (۱۱). از آنجایی که بیماری‌های قلبی - عروقی بار سنگین بر دوش سیستم سلامت می‌گذارند، لذا تشخیص به موقع آن‌ها می‌تواند بسیار مهم باشد. به دنبال انسداد عروق قلبی در محدوده ۱۵ تا ۲۰ دقیقه آسیب‌های

<sup>1</sup> Acute myocardial infarction

برگشت ناپذیر بر ماهیچه قلب وارد می‌شود (۱۲). امروزه با شناخته شدن بیو مارکرهای جدید می‌توان از آن‌ها در ارزیابی و پیش‌آگهی کوتاه‌مدت و طولانی‌مدت انواع بیماری‌ها از جمله سکتة قلبی استفاده نمود (۱۲، ۱۳). علائم اولیه بالینی یا کلینیکی جهت تشخیص اولیه بیماری، شامل درد قفسه سینه و روش‌های تشخیصی معمول سکتة یا آنفارکتوس قلبی شامل: تست‌های آزمایشگاهی، روش الکتروکاردیوم، تصویربرداری (اکو) و... می‌باشد، که البته در بسیاری از این موارد مانند تست‌های تشخیصی آزمایشگاهی (تست تروپونین و تست CPK-MB) قبل از ایجاد سکتة ارزش تشخیصی ندارند و معمولاً پس از ایجاد سکتة قابل‌اندازه‌گیری هستند. بنابراین بیومارکرها به عنوان فاکتورهای تشخیصی در درمان برخی بیماری‌ها و جلوگیری از سکتة حاد قلبی مؤثر هستند (۶).

#### ۴-۱ وزیکول‌های خارج سلولی (EV)

وزیکول‌های خارج سلولی شامل: اگزوزوم<sup>۴</sup>، میکروویزیکول‌ها<sup>۵</sup> و اجسام آپوپتوزی<sup>۶</sup> هستند (۱۴). اجسام آپوپتوزی زمانی تشکیل می‌شوند که سلول وارد فرایند آپوپتوز شده و ممکن است حاوی مواد داخل هسته، مانند هیستون و DNA باشند. اندازه اجسام آپوپتوزی بین ۱۰۰۰-۵۰۰ نانومتر است (۱۴).

میکروویزیکول‌ها، وزیکول‌های با اندازه ۱۰۰-۵۰ نانومتر هستند که به وسیله جوانه زدن از غشای پلاسمایی تشکیل می‌شوند (۱۵).

دسته سوم، اگزوزوم‌ها هستند که اندازه‌ای در حدود ۱۰۰-۳۰ نانومتر دارند. اگزوزوم‌ها به واسطه اندازه، مسیر تشکیل شدن و مارکرهای سطحی از میکروویزیکول‌ها و اجسام آپوپتوزی قابل تشخیص هستند (۱۴).

1 EKG (Electrocardiogram)

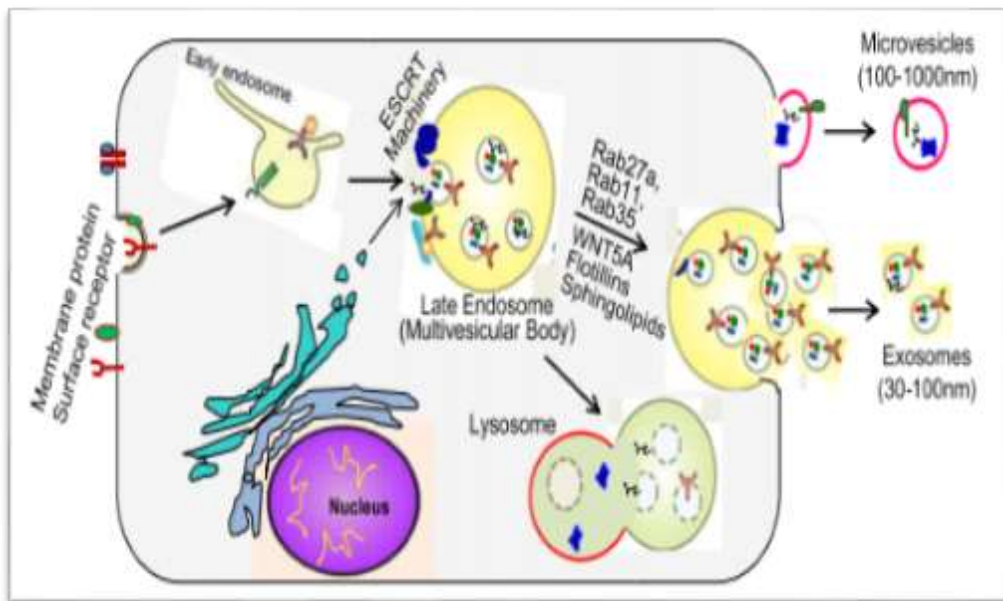
2 Creatine phosphokinase-MB

3 Extra cellular vesic

4 Exosome

5 micro vesicles

6 apoptotic bodies



شکل ۱-۱ مقایسه‌ی مراحل تشکیل میکروویزیکول‌ها و اگزوزوم (۱۶).

#### ۱-۴-۱ تعریف اگزوزوم

اگزوزوم‌ها و ویزیکول‌های کوچک با توپولوژی شبیه غشای پلاسمایی هستند که در تعداد زیادی و شاید همه مایعات سلول‌های یوکاریوت شامل: خون، ادرار، بزاق، مایع منی، سرم و غیره وجود دارند. عموماً اندازه اگزوزوم‌ها ۱۰۰-۴۰ نانومتر است. اگرچه در اندازه‌های بزرگ‌تر تا ۲۰۰ نانومتر نیز گزارش شده‌اند (۱۴، ۱۶). اگزوزوم‌ها شامل: انواعی از پروتئین‌ها مانند پروتئین‌های شک حرارتی (HSP70, HSP90)، ترانسپورترهای غشایی و اتصال (ATPase's و Annexin) و تتراسپانین‌ها (CD9, CD63, CD81, CD82) هستند (۱۷). علاوه بر پروتئین‌ها، اگزوزوم‌ها شامل لیپیدهای درگیر انتقال سلول، mRNA<sup>۱</sup>‌ها ی ترجمه شونده همچنین RNA های کوچک هستند. در میان RNA های کوچک، miRNA<sup>۲</sup>‌ها با نسبت بیشتری در اگزوزوم‌ها وجود دارند (۱۸).

#### ۲-۴-۱ تشکیل و ترشح اگزوزوم‌ها

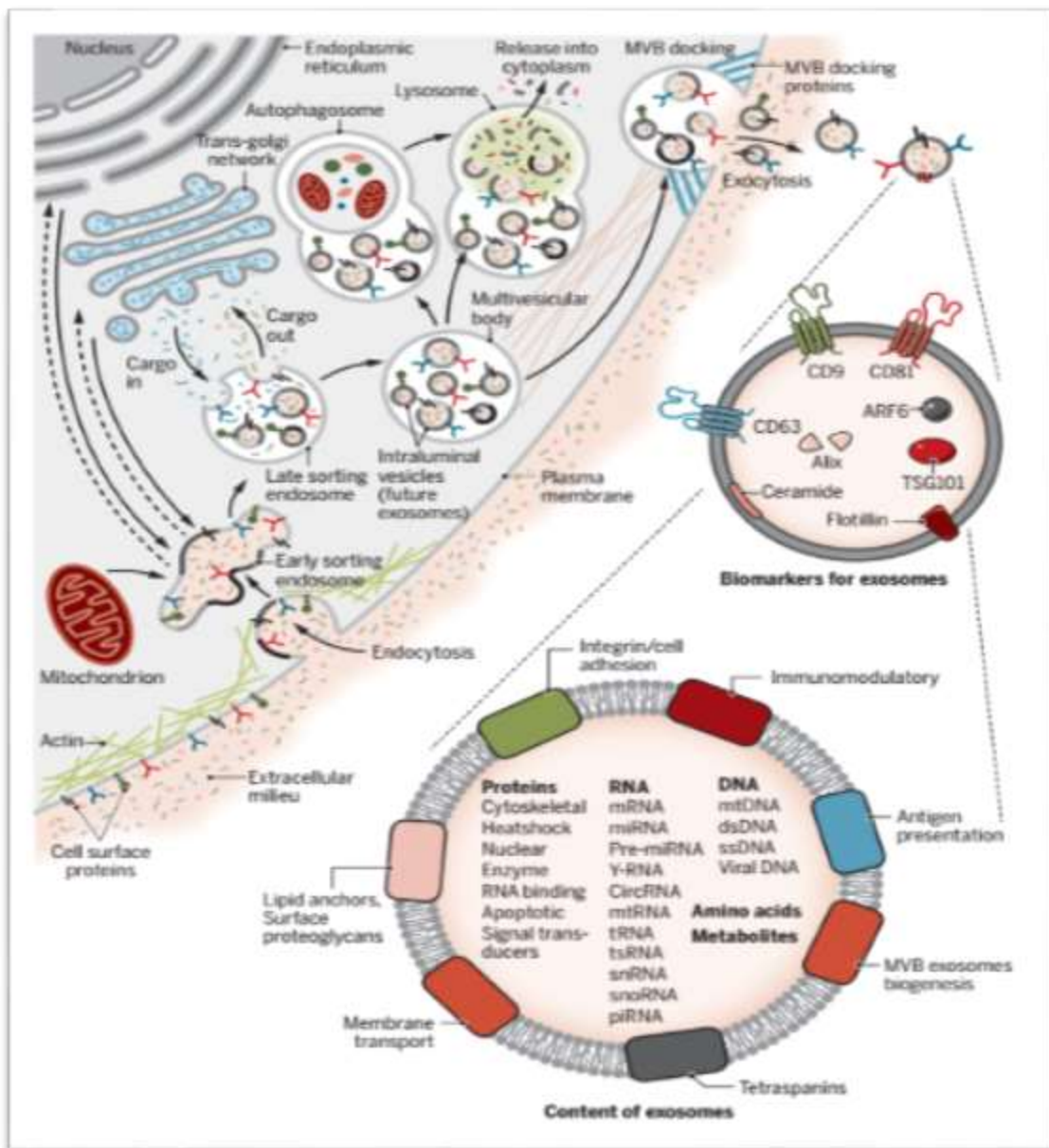
بر اساس مسیر تشکیل و روش ترشی، ویزیکول‌های خارج سلولی آن‌ها را به طور کلی در دو دسته قرار می‌دهند.

۱- میکروویزیکول: که به طور مستقیم از غشای پلاسمایی جدا می‌شوند.

۲- اگزوزوم‌ها: هنگامی که مولتی ویزیکول‌ها با غشای پلاسمایی فیوز شدند به وسیله اگزوسیتوز ترشح می‌شوند (۱۵).

اگزوزوم‌ها در اصل به وسیله آندوسیتوز تشکیل می‌شوند. ابتدا غشای سلول به صورت آندوسیتوز به سلول وارد می‌شود، سپس تعداد زیادی ویزیکول در داخل خود آندوزوم، تشکیل می‌شود که به این آندوزوم اجسام مولتی ویزیکولار<sup>۳</sup> می‌گویند و سرانجام این اجسام با غشای سلولی فیوز شده و ویزیکول‌های داخلی خود را در فضای خارج سلولی ترشح می‌کنند که به اگزوزوم‌ها تبدیل می‌شوند (۱۹، ۲۰).

1 messenger RNA  
2 Micro RNA  
3 Multi vesicular



شکل ۱-۲ بیوزن و شناسایی آگزوزم ها (۲۱).

### ۱-۴-۳ برهم کنش آگزوزوم ها با سلول هدف

به طور کلی آگزوزوم از طریق ۳ مکانیسم می تواند با سلول گیرنده برهم کنش پیدا کند. مکانیسم اول، پروتئین های غشایی آگزوزوم ها می توانند به طور مستقیم به گیرنده های سیگنالی غشای سلول هدف متصل شوند.

مکانیسم دوم، آگزوزوم ها با غشای پلاسمایی سلول هدف فیوز می شوند و محتویات خود را به سلول هدف می ریزند.

مکانیسم سوم اینکه آگزوزوم ها می توانند به سلول هدف وارد شوند که خود دو سرنوشت خواهند داشت. آگزوزوم های بلعیده شده توسط سلول هدف می توانند با آندوزوم ها ادغام شوند و به سلول های مجاور منتقل شوند. یا اینکه آگزوزوم ها وارد آندوزوم سلول هدف شوند و به لیزوزوم هدایت تا در آنجا تخریب شوند (۲۲).

### ۱-۴-۴ عملکرد بیولوژی آگزوزوم ها

آگزوزوم ها در انواعی از پردازش های بیولوژی و پاتولوژی نقش مهمی دارند. از آنجاکه آگزوزوم ها از سلول های مختلف منشأ می گیرند لذا حاوی ترکیبات مختلفی خواهند بود. اولین عملکردی که برای آگزوزوم ها می توان در نظر گرفت، نقش آن ها در حمل پروتئین های غیر ضروری و دخالت در پردازش بلوغ سلولی است (۲۳). امروزه مشخص شده است که آگزوزوم ها در عملکرد سیستم ایمنی نقش دوگانه ای ایفا می کنند. همچنین در تکوین و فیزیولوژی طبیعی سیستم عصبی مرکزی و تولید دوباره نورون های نرمال نیز نقش مهمی دارند. از آگزوزوم های مشتق شده از سلول های بنیادی جهت تولید مجدد بافت های قلبی و رگ زایی در بیماران مبتلا به سکته قلبی و صدمات کلیوی استفاده شده است (۲۲). آگزوزوم ها باعث ارتباط بین الیگودندروسیت ها و نورون ها می شوند (۲۴).

### ۱-۴-۵ مزیت آگزوزوم ها به عنوان حامل

مهم ترین ویژگی هایی که باعث شده آگزوزوم ها به عنوان نانو حامل هایی برای انتقال دارو و ژن در نظر گرفته شوند، شامل موارد ذیل هستند:

- آگزوزوم ها ساختاری شبیه غشای پلاسمایی دارند، پس سیستم ایمنی را فعال نمی کنند (۲۵).
- توسط بیشتر سلول ها ترشح می شوند، بنابراین می توان به مقدار زیاد و به آسانی تولید شوند و در دسترس قرار گیرند.
- در مایعات بیواوژی پایداری بالایی دارند.
- به واسطه اندازه کوچک به راحتی می توانند از سد خونی - مغزی عبور کرده و محتویات داخلی خود را به سلول هدف منتقل کنند.
- به خاطر داشتن گیرنده های سطحی به طور اختصاصی به هدف متصل می شوند (۲۲). آگزوزوم ها در تومور زایی نقش مهمی ایفا می کنند و افزایش ترشح آن ها در بیماران سرطانی گزارش شده است (۲۶).



## ۱-۴-۶ آگزوزوم ها و بیماری

تحقیقات نشان داده است آگزوزوم ها توانایی انتقال اسید نوکلئیک را از یک سلول به سلول دیگر دارند و از طرفی سیستم ایمنی میزبان را فعال نمی کنند، اما درعین حال به طور اختصاصی به هدف متصل می شوند، بنابراین برای ژن درمانی بسیار مناسب هستند (شکل ۱). از آنجایی که آگزوزوم ها حاوی پروتئین، RNA و لیپید هستند بنابراین می توانند جهت تشخیص بیماری ها مفید واقع بشوند. البته الگوی متفاوت microRNA ها و RNA های آگزوزومی بین بیماران و افراد نرمال سبب می شود از آن ها به عنوان نوعی بیومارکر استفاده شوند (۲۶).

## ۱-۵ میکرو RNA ها

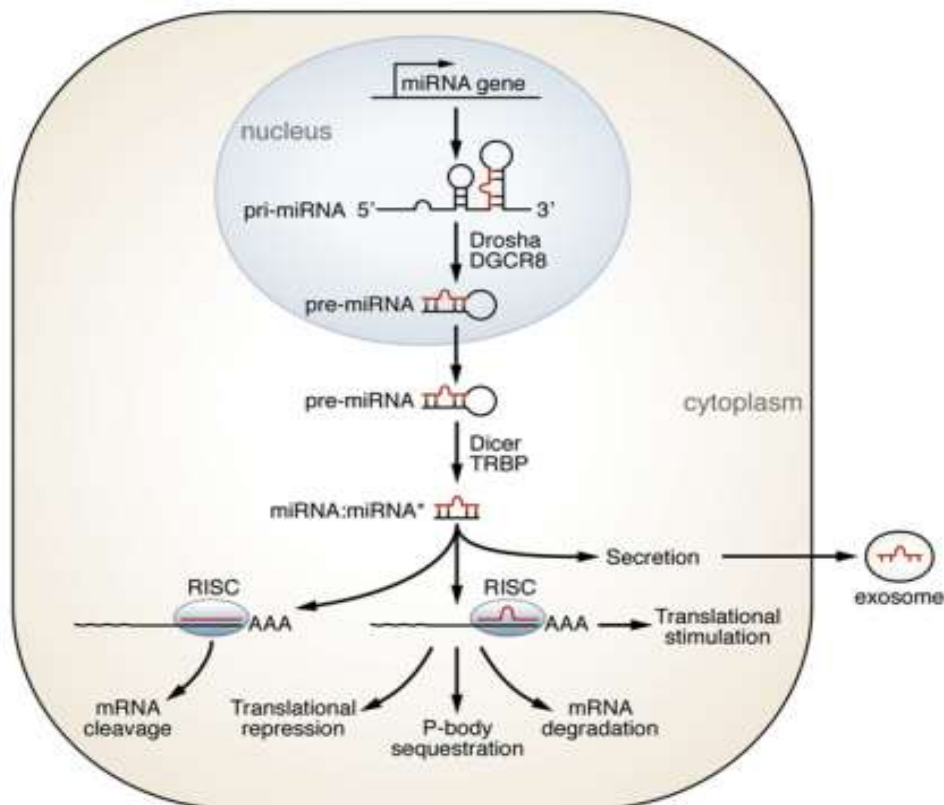
### ۱-۵-۱ معرفی میکرو RNA

MicroRNA یا به اختصار miRNA مولکول های RNA کوتاه با طول ۱۹ تا ۲۳ نوکلوتید هستند که از طریق کنترل بیان ژن های مختلف به عنوان تنظیم کننده ی اصلی گسترده عمل می کنند (۲۷). آن ها با تکثیر و مرگ سلولی، تمایز، آپوپتوز، سوخت و ساز چربی و سرطان مرتبط هستند (۲۸).

میکرو RNA ها، توالی های RNA ای غیر کد شونده و کوچکی (در حدود ۲۲ نوکلوتید) هستند که در گیاهان، حیوانات و بعضی از ویروس ها یافت می شوند و در مهار RNA، تنظیمات بعد از رونویسی و بیان ژن دارای عملکرد می باشند (۲۷). در حالی که اکثر miRNA ها در درون هسته قرار دارند، تعدادی دیگری از miRNA ها که در حال گردش در بیرون سلولی بوده در محیط های بیرون سلولی، مانند مایعات بیولوژیک مختلف و محیط کشت سلولی حضور دارند (۲۹). ژنوم انسان در حدود بیش از ۱۰۰۰ رونوشت miRNA را کد می کند که در بسیاری از سلول های پستانداران فراوانند و در حدود ۶۰ درصد ژن های انسانی و سایر پستانداران را مورد هدف قرار می دهند (۳۰).

### ۱-۵-۲ تولید miRNA

MiRNA ها ابتدا در هسته سلول از نواحی بین ژنی یا درون ژنی به وسیله RNA پلیمر از II به فرم miRNA های اولیه با طول ۱ تا ۳ کلیو باز، رونویسی می شوند. در ادامه در هسته به وسیله RNAase III به نام Drosha و پروتئین متصل شونده، به RNA دو رشته ای با ساختارهای ساقه و لوپ با طول تقریبی ۷۰ تا ۱۰۰ نوکلوتید تبدیل می شود. در این حالت به آن Per-miRNA گفته می شود. این عمل برش توسط Pasha انجام می گیرد. در ادامه اکسپورتین ۵- قطعات شکسته شده را از هسته به سیتوپلاسم منتقل می کند. این قطعات توسط آنزیم RNAase III با عنوان Dicer به الیگونوکلیوتیدهای ۱۸ تا ۲۴ بازی دو رشته ای، شکسته می شوند و miRNA دو رشته ای بالغ ایجاد می شود (۳۰، ۳۱).



شکل ۱-۳ مراحل تولید MicroRNA (۳۲).

### ۱-۵-۳ شکل گیری MicroRNA

این نوع از RNA ها با سهره اساسی کشف شدند:

کلونینگ مستقیم<sup>۱</sup>

ژنتیک پیش رو<sup>۲</sup>

پیش‌بینی‌های بیوانفورماتیکی که به دنبال آن ارزیابی آزمایشی انجام می‌شود.

کلونینگ بر اساس جداسازی RNA های کوچک از نمونه‌های تهیه شده و کلون کردن آن‌ها استوار است. کلون کردن RNA به منظور یافتن RNA های غیر کد شونده از اولین روش‌هایی است که به این منظور استفاده شده و به شناسایی تعداد زیادی از آن‌ها می‌انجامد (۳۱). محدودیت عمده‌ی روش‌های ژنتیک پیش رو این است که احتمالاً کارکردهای اعضای یک خانواده از MiRNA با یکدیگر هم‌پوشانی دارند و فقدان عملکرد یک MiRNA تحت تأثیر عملکرد سایر اعضا قرار می‌گیرد (۳۳). پیش‌بینی بیوانفورماتیک نیز در شناسایی MiRNA مورد توجه بوده است. اساس این روش‌ها، جست‌وجوی ژنوم برای یافتن توالی‌های مشابه MiRNA هایی است که بیشتر شناسایی شده‌اند (۳۳).

<sup>1</sup> Direct cloning

<sup>2</sup> Forward

### ۱-۵-۴ اهمیت میکرو RNA های قلبی

میکرو RNA ها عملکرد ژن ها را کنترل می کنند و در هنگام تکامل قلب به فراوانی یافت می شوند (۳۴). پژوهشی که پیش تر توسط پروفسور Wang رهبری شد، نشان می دهد که یک خوشه از میکرو RNA ها که MiR-17-92 نامیده می شود تکثیر کاردیومیست ها را کنترل می کند (۳۱).

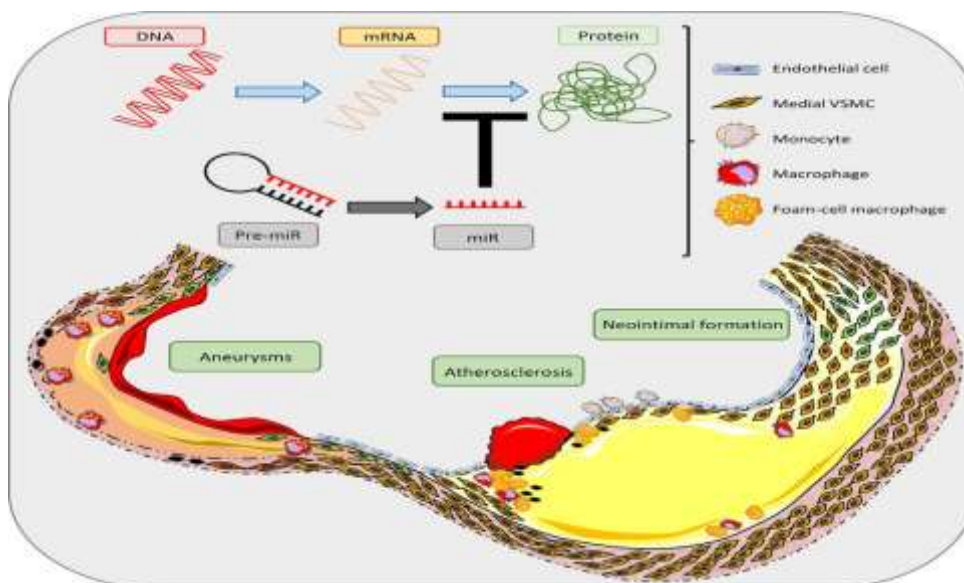
### ۱-۵-۵ ارتباط میکرو RNA ها و بیماری های قلبی - عروقی

انفارکتوس میوکارد به عنوان یکی از شایع ترین بیماری های قلبی ناتوان کننده و مرگ آور ناشی از انهدام و مرگ سلولی دائم و برگشت ناپذیر در بخشی از عضله قلب است. بعد از کشف بیش از ۲۵۰۰ نوع MiRNA رفته رفته اهمیت این تنظیم کنندگان مکانیسم و سیگنال های مولکولی و مسیرهای ژنی در پروسه ها و مکانیسم سلولی به خصوص در سیستم قلبی - عروقی مشخص شده است (۲۷).

میکرو RNA ها، تنظیم کننده کلیدی برنامه های ژنتیکی مانند عملکرد اندوتلیال، متابولیسم چربی، تکامل قلبی، هایپرتروفی بطنی و اختلال ضربان قلب پس از انفارکتوس میوکارد هستند (شکل ۱-۴).

MiRNA به عنوان RNA های کوچک غیر کد کننده در مرحله پیش از ترجمه و بیان ژنی، پروسه های بیولوژیک سرکوب و یا تنظیم سیگنالینگ های ژنی نقش تنظیمی و مهمی در مسیرهای مولکولی و ژنی دارند (۳۵).

از MiRNA های اختصاصی قلب می توان MiR I و MiR-133 را نام برد. همچنین MiRNA های زیادی وجود دارند که در بیماری های قلبی - عروقی افزایش یا کاهش پیدا می کنند، مانند MiR-15 در پاسخ به MI<sup>۱</sup> و MiR I در پاسخ به ایسکیمی حاد قلب و در بیماران با جراحی قلب باز و MiR-21 در پاسخ به آپوپتوز سلولی در میوسیت ها تغییر می کند (۲۷).



شکل ۱-۴ ارتباط MicroRNA ها و بیماری های قلبی - عروقی (۳۲).

<sup>۱</sup> myocardial infarction

### ۱-۵-۶ معرفی MiR-19b

### ۱-۵-۶-۱ نقش بیولوژیکی شاخه MiR-17-92

در میان همه‌ی خوشه‌های میکرو RNA ها، خوشه MiR-17-92 در ابتدا با عنوان Oncomir-I نام‌گذاری شد. این خوشه‌ی بسیار محافظت شده، در تمایز سلول‌های چربی، رشد ریه، رگ زایی،<sup>۱</sup> تومورزایی<sup>۲</sup> و به‌طور ویژه در رشد قلب نقش دارند (۳۶).

یکی از اولین MiRNA های انکوژنتیک شناخته شده، خوشه MiRNA-17-92 است که در انسان بر روی جایگاه کروموزومی 13q31.3 قرار گرفته و از یک رونوشت پلی سیسترونیک به هفت MiRNA شامل: MiR-17-5P و MiR-17-3P و MiR-18a و MiR-19a و MiR-19b، و MiR-20a و MiR-92a تقسیم بندی می‌شود که همه‌ی آن‌ها توسط آنزیم RNA پلی مراز نوع II برش می‌خورند (جدول ۱-۱) (۳۷). امروزه تأیید شده است که مقدار شاخه MiR-17-92 در بسیاری از بیماری‌های قلبی - عروقی مثل سکته قلبی، کاردیومیوپاتی،<sup>۳</sup> نامنظمی ضربان قلب<sup>۴</sup> و... تغییر می‌کند اگرچه مکانیسم عملکرد آن‌ها هنوز به‌طور کامل شناخته نشده است همچنین شاخه MiR-17-92 نقش مهمی در تکثیر و تمایز سلول‌های کاردیومسیت‌ها ایفا می‌کنند (۳۶).

جدول ۱-۱ مروری بر خوشه‌ی MiR-17-92 (۳۷).

microRNA	Seed sequence	Mature miRNA sequence(5'—3')
has-miR-17	AAAGUG	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
has-miR-18a	AAGGUG	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAG
has-miR-19a	GUGCAA	UGUGCAAUAUCAUGCAAAACUGA
has-miR-19b	GUGCAA	UGUGCAAUCCAUGCAAAACUGA
has-miR-20a	AAAGUG	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG
has-miR-92a	AUUGCA	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU

<sup>1</sup>Angiogenesis

<sup>2</sup> Tumorigenesis

<sup>3</sup> cardiomyopathy

<sup>4</sup> Arrhythmias

در سال‌های اخیر MiR ها، به طور بسیار گسترده به عنوان بیومارکرها در بیماری‌های عروق کرونری شناخته شده‌اند. همچنین ارتباط این خوشه MiR-17-92 و سرطان به‌طور بسیار گسترده‌ای مورد بررسی قرار گرفته است. به عنوان مثال نقش اعضای این خوشه در انواع مختلف سرطان‌ها مانند لنفوم، سرطان ریه، سرطان کولون و سرطان سینه به‌طور قابل ملاحظه‌ای مورد بررسی قرار گرفته است (۳۶، ۳۷).

### ۱-۵-۶-۲ خوشه MiR-17-92 و بیماری‌های مادرزادی قلب (CHD)<sup>۲</sup>

بیماری نقص مادرزادی قلب یا CHD، یک بیماری بالینی است که با اشکال مختلف ظاهری در نوزادان ظاهر می‌شود. طبق محاسبات انجام شده حدود ۲۵ درصد مرگومیر نوزادان در یک ماه پس از تولد و نزدیک به ۴۰ درصد مرگومیر قبل از تولد به این بیماری مربوط می‌باشد. علت اصلی بیماری نقص مادرزادی قلب، رشد ضعیف قلب، تمایز غیرطبیعی سلول‌های مولد قلب (CPC)<sup>۳</sup> به سلول‌های کاردیومیسیت و افزایش غیرمعمول قلب می‌باشد که خوشه MiR-17-92 در این پروسه نقش مهمی ایفا می‌نماید (۳۶).

### ۱-۵-۶-۳ نقش خوشه MiR-17-92 در MI یا Myocardial Infarction

این خوشه پروسه‌های مختلفی را در طی ترمیم عضله قلب تنظیم کرده و تعدادی از اعضای این خوشه، به عنوان تنظیم‌کننده‌های درمانی ارزشمند در درمان بیماری ایسکیمیک قلب شناخته شده‌اند. MiR-19، در بین اعضای خوشه‌ی MiR-17-92 فرایند تکثیر سلول‌های کاردیومیسیت را افزایش داده که این امر حفاظت قلب از آسیب‌های ناشی از سکته قلبی را به همراه خواهد داشت (۳۶، ۳۷).

### ۱-۵-۷ معرفی اختصاصی MiR19-b

تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد، بیان MiR19-b که یکی از اعضای خوشه‌ی MiR-17-92 می‌باشد در بیماران مبتلا به نارسایی قلبی تغییر کرده (۳۸)؛ و همچنین برای حفظ تعادل پیچیده بین مسیرهایی که منجر به مهار و سرکوب سرطان می‌شود، به‌خوبی عمل می‌کند (۳۷).

با هدف قرار دادن atrogen-1 و MuRF-1 در نارسایی قلبی مرتبط با پیری و تنظیم مثبت هیپرتروفی کاردیومیسیت<sup>۴</sup> و آپوپتوز<sup>۵</sup> نقش دارد (۳۹). نتایج تحقیقات انجام شده گزارش کرده است که MiR19-b از طریق سرکوب PGC-1 $\alpha$  در دوران آترواسکلروز<sup>۶</sup> سبب ایجاد اختلال عملکرد سلول‌های آندوتلیال می‌گردد و به علاوه مطالعات نشان داده است، این ژن در پلاسمای بیماران مبتلا به آنژین صدری به طور ناپایدار تنظیم می‌شود و می‌تواند باهدف قرار دادن (TF)<sup>۸</sup> نقش ضد ترومبیک داشته باشد (۴۰).

<sup>1</sup> Lymphoma

<sup>2</sup> Congenital Heart Detect

<sup>3</sup> Cardiac progenitor cell

<sup>4</sup>Cardiomyocyte hypertrophy

<sup>5</sup>Apoptosis

<sup>6</sup> proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$

<sup>7</sup> Atherosclerosis

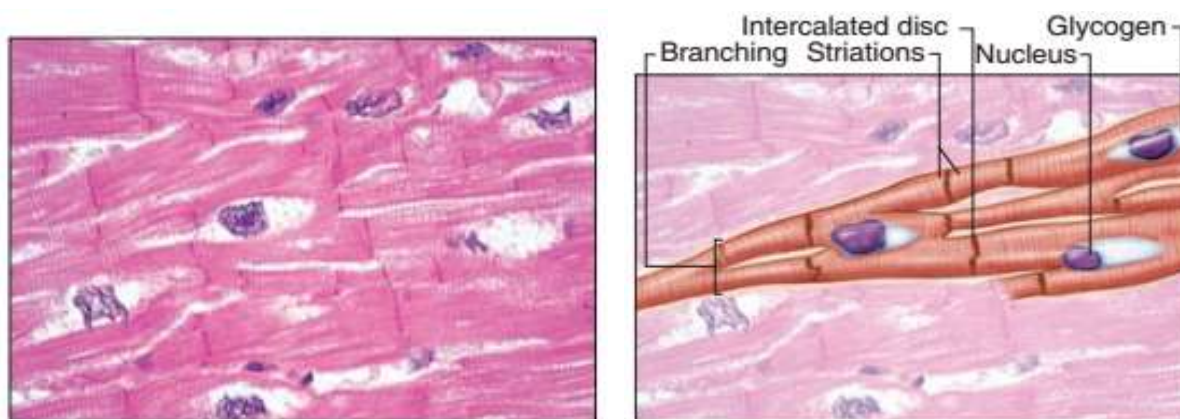
<sup>8</sup> Tissue factor

فیبروبلاست قلب فعال با افزایش سنتز پروتئین، از جمله کلاژن ۱ و به مقدار بسیار غالب در ماتریکس خارج سلولی مشخص می‌شود (۴۱). MiR19-b می‌تواند تکثیر و مهاجرت فیبروبلاست قلبی را ترویج می‌کند (۴۴).

## ۱-۶ معرفی بافت‌شناسی قلب

در مراحل اولیه تکامل جنین سلول‌های مزودرم احشایی به صورت شعاع‌های زنجیره‌ای شکل قرار می‌گیرند و سلول‌های قلبی اتصالات پیچیده‌ای بین زواید خود ایجاد می‌کنند. در نتیجه قلب شامل دسته سلولی است که در کنار هم قرار گرفته‌اند و به گونه‌ای به هم پیوستگی دارند که قادرند موج انقباضی ویژه‌ای را ایجاد کنند که منجر به انقباض کامل بطن‌های قلب می‌شوند (۴۲).

یک ویژگی منحصر به فرد عضله قلبی وجود خطوط عرضی تیره‌رنگی است که زنجیره‌های سلول‌های قلبی را در فواصل نامنظم قطع می‌کند. در بین صفحات جانبی، اتصالات شکاف دار قرار دارند که سبب ارتباط یونی بین سلول‌های مجاور می‌شوند این ارتباط یونی سبب می‌شود پیام انقباضی به صورت موج از یک سلول به سلول دیگر منتقل شود. ساختمان و عملکرد پروتئین‌های انقباضی در سلول‌های قلبی مشابه عضله اسکلتی است اما سیستم لوله عرضی و شبکه سارکوپلاسمی، در میوسیت‌های قلبی از آرایش منظم موجود در عضلات اسکلتی برخوردار نیست (۴۲).



شکل ۱-۵ عضله قلب از سلول‌های شاخه نامنظم تشکیل شده است که به وسیله دیسک‌های طولی هم متصل و انقباض شدید و غیرارادی را نشان می‌دهد (۴۳).

## ۷-۱ مروری بر تحقیقات گذشته در زمینه‌ی پروژه حاضر

Tang و همکارانش در ۲۰۱۵ ارتباط بین خوشه MiR-17-92 و TNF-A را در آپیتوز سلول‌های آندوتلیال نشان دادند. نتایج به دست آمده از RT-PCR مشخص کرد که سطح MiR-19b و MiR-92a در بیماران مبتلابه بیماری عروق کرونری نسبت به گروه کنترل به طور قابل ملاحظه‌ای پایین تر بود و این MiRNA از شاخص‌های ویژه در این بیماری به حساب می‌آیند (۳۷).

در تحقیقی که در سال ۲۰۱۶ به واسطه Zhong و همکاران صورت گرفت مشخص شد MiR-19b تکثیر و مهاجرت فیبروبلاست‌های قلبی را کنترل می‌کند. فیبروز قلبی عامل اصلی در عملکرد ناصحیح قلب است که می‌تواند به مرگ‌ومیر وسیع در همین زمینه منجر شود. اگرچه هنوز درمان مؤثری برای فیبروز قلبی در دسترس نیست اما برای این بیماری نیاز درمانی بسیار بالایی احساس می‌شود (۴۴).

تحقیقات نشان داده است که MiR-19b توانایی حفاظت از فیبروبلاست‌های قلبی را در مقابل هیدروژن پراکسید که عامل القاکننده آپیتوز می‌باشد را دارا است. همچنین مشخص شده است افزایش MiR-19b استراتژی درمانی جدیدی را برای تضعیف آپیتوز سلولی در طی جراحی‌های ایسکیمیک میوکارد قلب ایجاد می‌کند. در این بررسی ژن‌های هدف MiR-19b شناسایی شدند و به هر حال محققین دریافتند که MiR-19b تکثیر و مهاجرت فیبروبلاست‌های قلب را افزایش می‌دهد (۴۴).

نتایج حاصل از تحقیقی که در سال ۲۰۱۷ توسط Uribe و همکاران صورت گرفت نشان داد که MiRNA‌های موجود در پلازما به عنوان بیومارکرهای مناسب در پیش‌آگهی انواع بیماری‌های قلبی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (۴۵).  
Feng Gao به همراه همکارانش در سال ۲۰۱۹ به نقش کلیدی خوشه MiR-17-92 در تکثیر سلول‌های کاردیومیست اشاره کردند. محققین گزارش کردند MiR-19a/19b که یکی از اعضای خوشه فوق می‌باشند در آسیب‌های قلبی دخیل بوده و میزان بیان آن‌ها تغییر می‌کند (۳۸). انتقال میکرو RNA هم در کوتاه‌مدت و هم در درازمدت بسیار امیدوارکننده بود به طوری که ۱۰ روز پس از حمله قلبی، میکرو RNA‌ها مرگ سلولی را کاهش داده و عکس‌العمل‌های التهابی که در طی سکتة به عضله قلب آسیب می‌رسانند را، متوقف کردند (۳۸).

Ling Sun و همکاران در سال ۲۰۲۰ سلول‌های مزانشیمال<sup>۲</sup> مجاری ادراری را در شرایط اکسیژن نرمال و کمبود اکسیژن<sup>۳</sup> کشت دادند و اگزوزوم‌های استخراج شده از این سلول‌ها را جهت تعیین نقش و عملکرد اگزوزوم‌ها در محافظت از جراحی‌های قلب و عروق و همچنین سکتة حاد قلبی مورد بررسی قرار دادند و برای تأیید سلول‌های مزانشیمال از مارکرهای سطحی این سلول‌ها (CD73, CD44, CD105) استفاده کردند. پس از تأیید نهایی سلول‌ها، مارکرهای سطحی اگزوزوم‌ها شامل (CD81, CD63) شناسایی و اگزوزوم‌ها از این سلول‌ها استخراج و بیان ژن مورد نظر با روش Real-Time PCR مورد سنجش قرار گرفت (۴۶). محققین با بررسی نمودارهای Real-Time PCR دریافتند میزان بیان ژن lncRNA-UCA1<sup>۴</sup> در شرایط کمبود اکسیژن نسبت به شرایط نرمال در خود سلول‌های مزانشیمال افزایش یافته است. در واقع اگر بر اثر کاهش اکسیژن سکتة حاد قلبی رخ دهد سلول‌های آسیب‌دیده به طرف سایر سلول‌های سالم و زنده که ممکن است تحت

<sup>1</sup> H2O2

<sup>2</sup> mesenchymal stem cells (hMSC)

<sup>3</sup> hypoxic

<sup>4</sup> Long noncoding RNA urothelial carcinoma associated 1

آپتوز واقع شوند، سیگنال‌های مختلفی ارسال کرده، همچنین بیان ژن موردنظر در این سلول‌ها نیز افزایش می‌یابد. به عبارت دیگر، سلول‌های آسیب‌دیده با افزایش میزان بیان ژن *lncRNA-UCA1* و ارسال پیام‌های متفاوت از آپتوز سایر سلول‌های سالم ممانعت به عمل می‌آورند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد، ژن *lncRNA-UCA1* میزان پروتئین *BCL2* که یک پروتئین ضد آپتوز محسوب می‌شود را افزایش می‌دهد. در نهایت مطالعات انجام‌شده نشان داد در شرایط کمبود اکسیژن ژن موردبررسی، همراه با *miR-873-5p/XIAP* عمل کرده و در بیماران مبتلا به سکته حاد قلبی (*AMI*) به عنوان بیومارکرهای نوین تشخیصی معرفی شدند (۴۶).



# « فصل دوم »

مواد و روش ها

جهت بیان مراحل انجام این پژوهش، فصل دوم به چهار بخش تقسیم شده است.

۱ - مراحل عمومی آزمایش

۲ - جداسازی اگزوزوم و تائید آن

۳ - استخراج RNA، سنتز cDNA و انجام واکنش Real-Time PCR

۴ - مطالعات بافت‌شناسی.

در بخش اول به معرفی وسایل و مواد مورد استفاده و مشترکات مختلف مراحل آزمایش پرداخته شده است. همچنین به مراحل تزریق داروی القای سکت قلبی، بی‌هوشی، خون‌گیری و جداسازی سرم از خون، انجام تست‌های آزمایشگاهی جهت تائید نهایی سکت نیز اشاره خواهد شد.

در بخش دوم استخراج اگزوزوم از نمونه‌های سرم به دست آمده از مرحله قبل و تکنیک‌های آزمایشگاهی جهت تائید نهایی وجود اگزوزوم‌ها بیان خواهد شد.

بخش سوم شامل استخراج RNA و سنتز cDNA و انجام واکنش Real-Time PCR می‌باشد.

و در بخش پایانی به مطالعات بافت‌شناسی پرداخته شده است.

۱-۲ مراحل عمومی آزمایش  
۱-۱-۲ فهرست وسایل مورد استفاده

جدول ۱-۲ مشخصات وسایل استفاده شده

کشور سازنده	شرکت سازنده	دستگاه
Iran	Exirhirad	انکوباتو معمولی
بتاژن، مشهد	NUNC	میکروتیوپ
Finland	Bio hit	سمپلر
Japan	Olympus,IX70	میکروسکوپ نوری
France	Cordouan	دستگاه پراکنندگی دینامیکی نور
Germany	Leo	میکروسکوپ الکترونی گذاره
Iran	Danesh pajooesh fajr	یخچال آزمایشگاهی
Iran	Farzaneh arman	سانتریفیوژ
Iran	vortex	ورتکس
Iran	Poyan teb khadem	میکروتوم
USA	Nanodrope thermo	دستگاه نانودراپ
Iran	Behdad	بن ماری (حمام آب گرم)
Germany	Hettich	سانتریفیوژ ۴ درجه سانتی گراد
Iran	Nano pajouhan raga	ترازوی دیجیتال
Iran	Alameh rayaneh sana	حمام پارافین
Japn	Canon	دوربین عکاسی میکروسکوپ
USA	Eppendorf	فریزر $-80^{\circ}\text{C}$
USA	ABI	دستگاه Real-Time PCR
USA	BIO RAD	دستگاه ترموسایکلر

۲-۱-۲ فهرست مواد مورد استفاده

جدول ۲-۲ مواد مورد استفاده

نام ماده	شرکت سازنده	کشور سازنده
پارافین	L-Oab-Wax	واکرمین، مشهد
کیت استخراج آگروزوم	Anacell	Iran
کیت سنتز cDNA	bonyakhte	Iran
کیت استخراج RNA	Sinaclon	Iran
کیت Real-Time PCR	bonyakhte	Iran
الکل اتانول	Merck	واکرمین، مشهد
غذای صنعتی استاندارد	جوانه خراسان	-
آب مقطر	البرز	بتاژن، مشهد
داروی ایزوپرنالین	Sigma	USA
کتامین	Laboratoires Sterop	Belgium
زایلزین	Laboratoires Sterop	Belgium
تیغه میکروتوم یک بار مصرف	Erma	واکرمین، مشهد
لام	pearl	واکرمین، مشهد
لامل	pearl	واکرمین، مشهد
چسب انتلان	Merck	واکرمین، مشهد
هماتوکسیلین (Art4302)	Merck	واکرمین، مشهد
انوزین (C.I.Nr. 45380)	Merck	واکرمین، مشهد

## ۲-۲ پرورش و نگهداری موش به عنوان حیوان آزمایشگاهی

در اجرای این پروژه از موش‌های صحرایی نر بالغ، نژاد Wistar با وزن تقریبی ۳۰۰ تا ۴۰۰ گرم استفاده شد. در مدت انجام آزمایش، موش‌های موردنظر با سن تقریبی ۴ تا ۸ هفته که از حیوان خانگی دانشکده علوم پزشکی مشهد تهیه شده بودند در همان مکان و تحت رژیم غذایی استاندارد و به صورت انفرادی در قفس و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و با دسترسی آزاد به آب و غذای مخصوص جوندگان، به دوراز استرس محیطی و چرخه تاریکی-روشنایی ۱۲ ساعت، نگهداری شدند. غذای موش‌ها نیز از شرکت جوانه خراسان تهیه شد (شکل ۱-۲). لازم به ذکر است آزمایش‌های صورت گرفته بر روی حیوان منطبق با فعالیت‌های کمیته اخلاق در پروژه‌های زیست پزشکی و با دریافت شناسه اخلاق IR.MUMS.REC.1400.022 انجام گرفته است.



شکل ۱-۲ موش نر نژاد ویستار

موش پستانداری کوچک از راسته‌ی جوندگان است. جوندگان به لحاظ رده‌بندی، در سلسله جانوران *Animals* و رده‌ی پستانداران *Mammalians* واقع شده‌اند. حیواناتی که در راسته جوندگان قرار می‌گیرند، گروهی از پستانداران جفت‌دار هستند که به صورت دسته جمعی زندگی می‌کنند و اغلب آن‌ها دارای جثه کوچکی هستند (۴۷). موقعیت تاکسونومی این جانور در جدول ۲-۳ آورده شده است.

جدول ۳-۲ رده بندی موش نژاد Wistar

<b>Phylum</b>	Chordata
<b>Subphylum</b>	Vertebrata
<b>Class</b>	Mammalia
<b>Order</b>	Rodents
<b>Family</b>	Muridea
<b>Genus</b>	Wistar
<b>Species</b>	Mus

### ۳-۲ تزریق داروی القای سکتة قلبی

برای القای سکتة قلبی در نمونه‌ی حیوانی از داروی Isoproterenol، بانام تجاری ایزوپرنالین استفاده گردید. ایزوپرنالین یک آنالوگ ایزوپروپیل از اپی نفرین و یک بتا سمپاتوسیستمک است که عملکرد آن با اثر بر قلب، ریه و عضله اسکلتی و دستگاه گوارش و... مرتبط می باشد (۴۸).

برای القای سکتة حاد قلبی، ابتدا وزن حیوانات به کمک ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد، سپس داروی ایزوپرنالین (به شکل پودر) را نیز توزین کرده و مقدار ۱۵۰ میلی‌گرم از دارو را در ۲ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و تزریق به میزان ۱۵۰ mg/kg به صورت زیر جلدی در ۲ روز متوالی صورت گرفت.

### ۳-۲-۱ تأیید سکتة قلبی با استفاده از اندازه‌گیری آنزیم‌های قلبی

پس از گذشت ۲۴ ساعت از آخرین تزریق داروی القای سکتة قلبی، اقدام به خون‌گیری از حیوانات کرده تا سرم خون جهت اندازه‌گیری آنزیم‌های قلبی به آزمایشگاه ارسال گردد. برای این کار ابتدا با استفاده از کتامین (۵۰ mg/kg) و زایلین (۱۰ mg/kg) حیوانات را بی‌هوش کرده و در ادامه با استفاده از لوله مویینه از گوشه چشم و دم حیوانات اقدام به خون‌گیری گردید. با انجام مراحل خون‌گیری مقدار ۲ سی‌سی خون آماده شد و با استفاده از سانتریفیوژ با سرعت ۲۸۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه، سرم از نمونه خون جدا شد و برای اندازه‌گیری میزان آنزیم‌های قلبی و آزمایشات بیوشیمی به آزمایشگاه تشخیص طبی واقع در بیمارستان مهر مشهد ارسال گردید. در این پژوهش، میزان CK-MB و تروپونین I (cTnI) مطابق با پروتکل کیت آزمایشگاه، به‌منظور تأیید سکتة قلبی مورد ارزیابی و اندازه‌گیری قرار گرفت.

## ۲-۴ استخراج اگزوزوم

شرح فعالیت‌های انجام‌شده جهت استخراج و جداسازی اگزوزوم ها، از نمونه‌ی سرم خون که در شرکت پرتو آزمون جوانه خراسان واقع در شهرک صنعتی مشهد انجام گرفت.

پس از تأیید نهایی سکنه قلبی با استفاده از تست های آزمایشگاهی که در بخش قبلی به آن اشاره شد برای جداسازی اگزوزوم ها، نمونه‌های سرم خون در ۲ گروه R و B (R گروهی که سکنه در آن‌ها تأیید شده و B گروه کنترل یا نرمال) تقسیم‌بندی و علامت‌گذاری شد و به میکروتیوپ های ۲ml انتقال داده شد، سپس در دستگاه سانتریفیوژ ۴ درجه به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ rpm قرار داده و سانتریفیوژ انجام شد. کیت استخراج اگزوزوم Exosome Isolation Kit \_ ANACELL (Supernatants) با نام تجاری اگزوسیب که از شرکت آناسل تهیه و خریداری شده بود شامل دو محلول A و B بوده که در فاصله زمانی انجام سانتریفیوژ، مطابق با دستورالعمل ارسالی، محلول A را در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم کرده تا هیچ کریستالی در محلول باقی نمانده و محلولی کاملاً شفاف حاصل شود. برای این کار درون یک پتری بزرگ مقداری آب ریخته و درون آن یک دماسنج معمولی قرار داده، ظرف محلول را چند دقیقه با دست در آب نگاه‌داشته و پس از چند دقیقه ورتکس کرده تا محلول شفاف حاصل شود. مطابق با پروتوکل شرکت سازنده کیت، با استفاده از سمپلرو برحسب میکرولیتر، از نمونه سرم موجود در هر دو گروه و محلول A موجود در کیت استخراج اگزوزوم به میزان ۵:۱ (نمونه سرم ۵ و محلول A ۱) برداشت کرده و داخل میکروتیوپ جدید منتقل گردید و پس از هر رقت سازی میکرو تیوب‌ها به مدت چند دقیقه ورتکس شده سپس به یخچال با دمای ۴ درجه منتقل و برای مدت‌زمان ۱۲ ساعت انکوبه شدند. نمونه‌های حاصل از مرحله قبل را برای یک‌دست شدن، به مدت ۱ دقیقه ورتکس کرده سپس برای مدت‌زمان ۴۰ دقیقه در دمای ۴ درجه با سرعت ۳۰۰۰ rpm مجدد سانتریفیوژ انجام شد و محلول بالایی کنار گذاشته شد. سپس از محلول B، مطابق با پروتوکل استاندارد سازنده کیت به مقدار ۵۰ میکرو لیتر به محلول باقی‌مانده اضافه و میکروتیوب ها به دمای ۲۰ C<sup>o</sup>- منتقل و نگهداری شدند.



(A)



(B)



(C)



(D)

شکل ۲-۲ روند استخراج اگزوزوم از نمونه‌ی سرم (A) محلول A و B کیت استخراج اگزوزوم. (B) نگهداری محلول A در آب با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد. (C) سانتریوفیوژن در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد. (D) دو فاز شدن پس از سانتریوفیوژن.

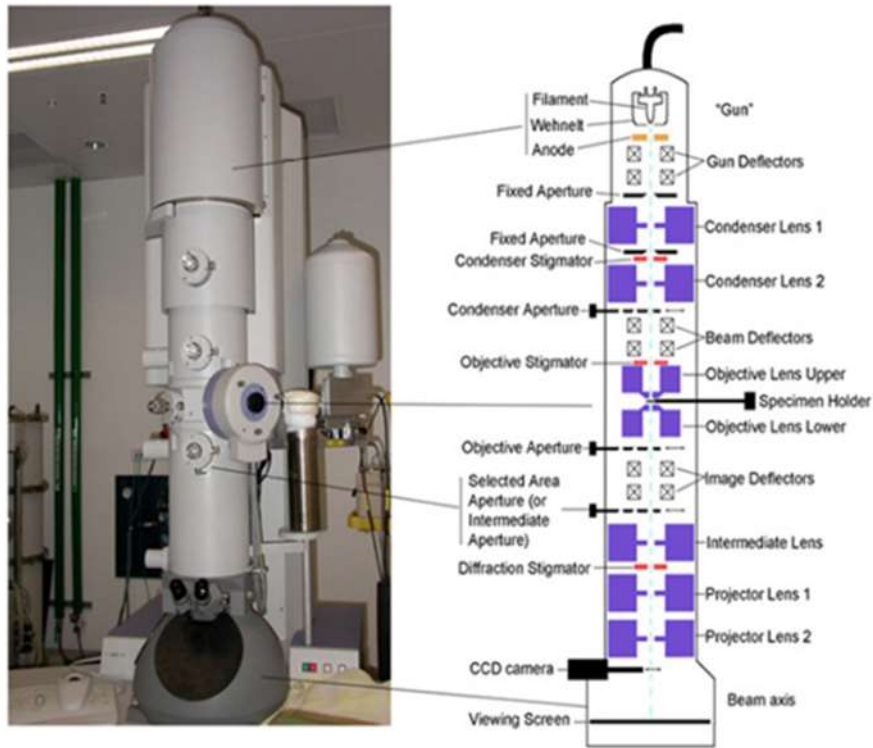
## ۲-۴-۱ تعیین خصوصیات اگزوزوم های جدا شده از نمونه سرم

### ۲-۴-۱-۱ عکس برداری توسط میکروسکوپ الکترونی

برای مشاهده مورفولوژی و شکل ظاهری اگزوزوم ها از میکروسکوپ الکترونی<sup>۱</sup> TEM واقع در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی استفاده شد. به منظور آماده‌سازی برای مشاهده توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری، در ابتدا سوسپانسیون اگزوزوم با استفاده از گلو تارالدهید ۱ درصد فیکس شده و یک قطره بر روی گرید کت شده با کربن قرار داده و در دمای اتاق قرار گرفت تا خشک شود. سپس گریدها دو بار به مدت ۵ دقیقه با PBS استریل شسته شدند و با رنگ یورانیل استات ۲ درصد به مدت ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی انجام شد. بررسی‌های مورفولوژی مربوط به اگزوزوم با استفاده از میکروسکوپ الکترونی LEO مدل 912AB ساخت کشور آلمان در ولتاژ 120KW (شکل ۲-۲) انجام گرفت و عکس‌ها آماده بررسی شدند.

<sup>1</sup> Transmission electron microscope





شکل ۲-۳ میکروسکوپ الکترونی عبوری مورد استفاده مستقر در آزمایشگاه مرکزی- دانشگاه فردوسی

#### ۲-۱-۴-۲ تعیین اندازه و درصد اگزوزوم با استفاده از روش پراکندگی دینامیکی نور (DLS)

در این تحقیق برای تعیین اندازه قطر اگزوزوم ها با تکنیک DLS از دستگاه پارتیکل سایز (تعیین اندازه ذرات Particle Size Analyzer) استفاده شد. اندازه ذرات موجود با استفاده از تابش و پراکندگی نور مشخص شد. در این مطالعه حلال مورد استفاده بافر فسفات بود. برای تعیین اندازه ذرات از دستگاه DLS واقع در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی (شکل ۲-۳) استفاده شده است.



شکل ۲-۴ تصویر دستگاه پارتیکل سایز (تعیین اندازه ذرات) مورد استفاده مستقر در آزمایشگاه مرکزی- دانشگاه فردوسی

## ۲-۵ استخراج RNA

برای استخراج RNA و جداسازی آن از نمونه‌ها از کیت مخصوص استخراج استفاده گردید. RNA-x Plus یک محلول گوانیدین / فنول می‌باشد که برای جداسازی کامل RNA مورد استفاده قرار گرفت. این ماده از طریق اثر نمک گوانیدین و با کمک ایجاد رسوب در فاز فنول برای جداسازی RNA به‌طور هم‌زمان با DNA و پروتئین به کار می‌رود. مراحل جداسازی RNA مطابق با پروتوکول مورد استفاده، در شرکت پرتو آزمون جوانه خراسان انجام گرفت و به شرح زیر می‌باشد:

- ۱- اضافه کردن ۱ ml از محلول RNA-Plus به میکروتیوپ‌های حاوی نمونه
- ۲- ورتکس به مدت ۱۰-۵ ثانیه و انکوبه نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه
- ۳- اضافه کردن ۲۰۰  $\mu$ l کلوروفورم، مخلوط کردن نمونه با کلوروفورم با کمک تکان دادن و بدون استفاده از ورتکس
- ۴- انکوبه نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه
- ۵- سانتریفیوژ ۱۲۰۰۰ rpm در دمای ۴ C° به مدت ۱۵ دقیقه
- ۶- انتقال فاز آبی به میکروتیوپ جدید ۱/۵ml و اضافه کردن مقدار برابر ایزوپروپانول (توجه: فاز میانی را به هم نزنید)
- ۷- مخلوط کردن مواد به آرامی و انکوبه در یخ به مدت ۱۵ دقیقه
- ۸- سانتریفیوژ ۱۲۰۰۰ rpm در دمای ۴ C° به مدت ۱۵ دقیقه
- ۹- اوت کردن مایع رویی و اضافه کردن ۱ ml اتانول ۷۵٪، سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه به مدت ۸ دقیقه در ۷۵۰۰ rpm
- ۱۰- اوت کردن مایع رویی و نگهداری نمونه‌ها در دمای معمولی اتاق جهت خشک شدن و کاهش انحلال‌پذیری
- ۱۱- اضافه کردن ۵۰  $\mu$ l آب مقطر<sup>۳</sup> به مواد ته‌نشین شده و نگهداری مواد در حمام آب گرم (۶۰-۵۵ C°) به مدت ۱۰ دقیقه

<sup>۱</sup>Chloroform

<sup>۲</sup>Isopropanol

<sup>۳</sup>DEPC treated water



(A)



(B)



(C)

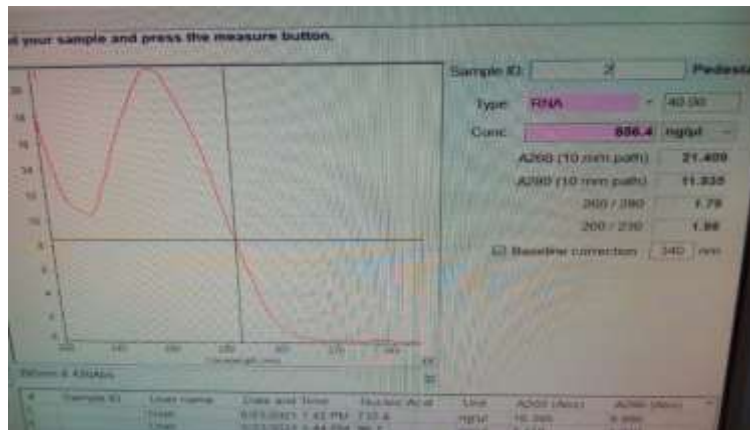


(D)

شکل ۲-۵ روند استخراج RNA (A) قبل از اضافه کردن کیت استخراج RNA (B) محلول کیت استخراج RNA- PLUS. (C) اضافه کردن کیت استخراج RNA به نمونه (D) نمونه حاصل پس از استخراج RNA

## ۶-۲ تعیین غلظت RNA توسط Micro-voluspectrophotometer (نانودراپ)

جهت تعیین غلظت RNA، از دستگاه نانودراپ واقع در آزمایشگاه مرکزی دانشکده علوم پزشکی مشهد استفاده گردید. اساس کار این دستگاه اسپکتروفتومتری بوده که سرعت و دقت بالایی در سنجش غلظت اسیدهای نوکلئیک دارد. استفاده از روش نانودراپ به دلیل تعیین جذب چندین نمونه به طور همزمان و با دقت بالا از اهمیت زیادی برخوردار است.



شکل ۶-۲ نمودار بررسی تعیین غلظت RNA با نانودراپ

## ۷-۲ سنتز cDNA<sup>۲</sup>

در ابتدا مواد مورد نیاز برای واکنش پلی آدنیلایسیون، مطابق با آنچه در جدول زیر آمده، با یکدیگر مخلوط گردید.

جدول ۴-۲ مواد مورد استفاده برای واکنش پلی آدنیلایسیون

ماده	حجم یا وزن
Total RNA	۱-۵ μg
r ATP (10Mm)	۱ μl
10X polymerase buffer	۲ μl
Poly A polymerase	۰/۱ - ۰/۲ μl
RNase-free water	Up to ۲۰ μl

<sup>1</sup> Nano drope

<sup>2</sup> cDNA synthesis

روش اجرا به شرح زیر می باشد:

مواد ذکر شده در بالا با مقادیر مشخص شده با استفاده از پمپ به آرامی مخلوط شده و در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شده، سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای  $65^{\circ}\text{C}$  غیرفعال گردید. در ادامه واکنش سنتز cDNA بلافاصله پس از واکنش پلی آدنیلایسیون، با استفاده از ترکیبات زیر برای هر نمونه RNA پلی آدنیله انجام شد.

-  $10\ \mu\text{l}$  از RNA پلی آدنیله، با  $1$  میکرو لیتر از پرایمر ( $10\ \mu\text{M}$  BON-RT adaptor) در هر تیوپ ریخته و حجم هر تیوپ با آب RNAase-DNase free به  $13$  میکرو لیتر رسانده شد.

- درب تیوپها بسته شد و به مدت زمان  $5$  دقیقه در دمای  $75$  درجه سانتی گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد.

- تیوپها را از دستگاه خارج کرده و به سرعت بر روی یخ قرار داده و مطابق پرو توکل که در جدول ذکر شده مواد دیگری به آن اضافه شد.

جدول ۲-۵ مقادیر و مواد لازم برای تهیه مخلوط کلی واکنش سنتز miRNA cDNA

ماده	حجم یا وزن
RT enzyme	$1\ \mu\text{l}$
dNTP	$2\ \mu\text{l}$
5 x RT buffer	$4\ \mu\text{l}$
RNase-free water	To bring final volume to $20\ \mu\text{l}$

پس از انجام مراحل بالا مطابق با دستورالعمل موجود، از دستگاه ترموسایکلر استفاده شد (جدول ۲-۶)

جدول ۲-۶ چرخه دمایی جهت سنتز miRNA cDNA

Temperature( $^{\circ}\text{C}$ )	Duration	Cycles
۲۵	$10\ \text{min}$	۱
۴۲	$60\ \text{min}$	۱
۷۰	$10\ \text{min}$	۱



(A)



(B)



(C)



(D)

شکل ۲-۷ روند سنتز cDNA A (کیت سنتز cDNA B) بافر آنزیم C (آداپتور، dNTP، آنزیم D) دستگاه ترموسایکلر

## ۸-۲ واکنش Real-Time PCR

Real-time PCR که Quantitative PCR نیز نامیده می‌شود، تکنیکی است که به طور گسترده در بررسی‌های کمی بیان ژن به کار می‌رود و امکان بررسی تکثیر قطعات DNA هم‌زمان با انجام گرفتن آزمایش و با استفاده از گزارشگرهای فلورسنت سنت (fluorescent reporters) را فراهم می‌کند اگر هدف، سنجش میزان بیان یک ژن خاص باشد، Real-time RT-PCR مورد استفاده قرار خواهد گرفت. به این صورت که مجبوریم پیش از آغاز فرایند Quantitative PCR، استخراج RNA و تبدیل آن به cDNA را انجام دهیم. اساس این تکنیک، ارتباط مقدار RNA رونویسی شده به میزان بیان ژن مورد نظر است و می‌توان با استفاده از آن میزان بیان ژن‌ها را در شرایط مختلف مقایسه کرد. واکنش Real-Time PCR با استفاده از مخلوط اصلی واکنش، حاوی SYBR Green از کیت BON-Mir QPCR که از شرکت فناوری بن یاخته تهیه شده بود، انجام گرفت. این کیت شامل ترکیبات لازم برای انجام واکنش QPCR بر روی cDNA سنتز شده از miRNA ها می‌باشد. یکی از ویژگی‌های مثبت استفاده از این کیت حساسیت بالای مواد مورد استفاده در شناسایی miRNA حتی در مقادیر بسیار کم می‌باشد. در ضمن کلیه مراحل ذکر شده مربوط به واکنش Real-Time PCR در آزمایشگاه مرکزی دانشکده علوم پزشکی مشهد انجام گرفته است.

## ۱-۷-۲ واکنش QPCR

cDNA های سنتز شده در مرحله قبل، با استفاده از مواد و ترکیبات و مطابق با پروتوکول، تحت واکنش QRT-PCR قرار داده و اطمینان لازم جهت آماده‌سازی کلیه‌ی مراحل از جمله آماده‌سازی ترکیبات و قرارگیری در دستگاه ( Step one company ABI-USA) در شرایط دور از نور حاصل شد. لازم به ذکر است برای دستگاه‌های ABI از رنگ ROX به مقدار ۰/۲۵  $\mu$ l به واکنش اضافه گردید. مراحل انجام واکنش مطابق جدول ۷-۲ به قرار زیر انجام شد.

جدول ۷-۲ مقادیر و مواد لازم برای تهیه miRNA real time PCR master mix

ماده	حجم یا وزن
cDNA	۱ $\mu$ l
MiRNA-specific forward primer	۰/۵ $\mu$ l
Universal reverse primer	۰/۵ $\mu$ l
2x miRNA QPCR master mix	۶/۵ $\mu$ l
Nuclease-free, PCR-grade H2O	Up to ۱۳ $\mu$ l

پس از آماده‌سازی ترکیبات بالا، آن‌ها را با یکدیگر مخلوط کرده و طبق برنامه مشخص شده در جدول (۸-۲) در دستگاه قرار داده شد.

جدول ۸-۲ چرخه‌نمایی واکنش miRNA real time PCR

Temperature(C°)	Duration	Cycles
۹۵	۲ Min	۱
۹۵	۵ Sec	
۶۰	۳۰ Sec	۴۰

توالی پرایمر به صورت pre-design از کمپانی (Bon yakhte) تهیه و با استفاده از پایگاه داده MiR base تطبیق داده شد. توالی پرایمر مورد استفاده در واکنش Real-Time PCR به صورت زیر می‌باشد که در جدول ۹-۲ به آن اشاره شده است.

جدول ۹-۲ PCR پرایمر مورد استفاده در واکنش Real-Time

Gene name	Primer sequence (5'→ 3')	Annealing temperature (°C)
MiR19-b	F (5'-GGTGGCTGAGCAAA 3') U6-R (5'-AAGGATGACACGCAAA-3')	۶۰

## ۹-۲ مطالعات بافت‌شناسی

به منظور بررسی اثر سکتته حاد قلبی و تعیین عملکرد MiRNA ها ی موجود در اگزوزوم ها، اقدامات لازم برای آماده‌سازی نمونه‌ها از بطن چپ قلب با استفاده از فن هیستوشیمیایی رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین در شرکت زیستا سلول آریا انجام گردید که روش کار آن در ذیل اشاره می‌شود.

### ۹-۱-۲ پاساژ بافت

#### ۹-۱-۱-۲ ثابت کردن<sup>۱</sup>

برای انجام مطالعات بافت‌شناسی، از محلول فرمالین ۱۰٪ جهت فیکس کردن نمونه‌ها استفاده شد. برای تهیه این محلول، ۱ میلی‌لیتر از فرمالین خالص را با ۹ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط کردیم.

<sup>۱</sup>Fixation



## ۲-۹-۱-۲ آب‌گیری<sup>۱</sup>

به منظور جلوگیری از ایجاد چروک و تخریب در ساختار نمونه‌ها با کمک از درجات صعودی اتانول، آب موجود در نمونه‌ها به آرامی از بافت خارج گردید. این شیب صعودی اتانول شامل: ۵۰٪، ۷۰٪، ۸۰٪، ۹۰٪، ۹۵٪ (هرکدام به مدت ۵ ساعت) می‌باشد.

## ۲-۹-۱-۳ شفاف‌سازی

پس از مرحله آب‌گیری، نمونه‌ها به مدت ۳ ساعت در بوتانل قرار داده شدند تا بوتانل جایگزین اتانول موجود در بافت شده و نمونه‌ها برای نفوذ پارافین آماده گردند.

## ۲-۹-۱-۴ قالب‌گیری و آغشته‌گی با پارافین<sup>۲</sup>

نمونه‌ها در داخل بشر محتوی پارافین مذاب در داخل انکوباتور با دمای ۸۵-۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. حلال‌ها به وسیله حرارت ایجاد شده تبخیر شده و پارافین فضای داخل بافت را به طور کامل پر می‌کند. آغشته سازی با پارافین به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور انجام شد. جهت قالب‌گیری، پارافین مایع در داخل قلب‌های کوچک آلومینیومی ریخته شد سپس نمونه‌ها از انکوباتور خارج گردید و با کمک پنس در پارافین مایع به شکل عرضی و طولی قرار داده شد. قبل از سرد شدن، اطلاعات نمونه با استفاده از برچسب‌های کاغذی روی قالب قرار داده شد.

## ۲-۹-۲ تهیه مقطع بافتی

### ژلاتینه کردن لام‌ها

قبل از انجام مرحله برش، لام‌ها را ژلاتینه کرده تا نمونه‌ها به طور مناسب به لام چسبیده و از جدا شدن آن‌ها در سایر مراحل رنگ‌آمیزی ممانعت به عمل آید. برای ژلاتینه کردن لام‌ها، ابتدا ۲ گرم پودر ژلاتین را در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر جوشان به طور کامل حل شد به گونه‌ای که محلول کاملاً شفاف به دست آمد. پس از سرد شدن، محلول به داخل بوکال منقل شد و لام‌ها چندین بار در داخل بوکال ژلاتین قرار گرفتند تا تمام سطوح لام به ژلاتین آغشته گردد. لام‌های ژلاتینه شده در محیط آزمایشگاه به مدت یک روز نگهداری شدند تا کاملاً خشک شوند.

<sup>1</sup>dehydration

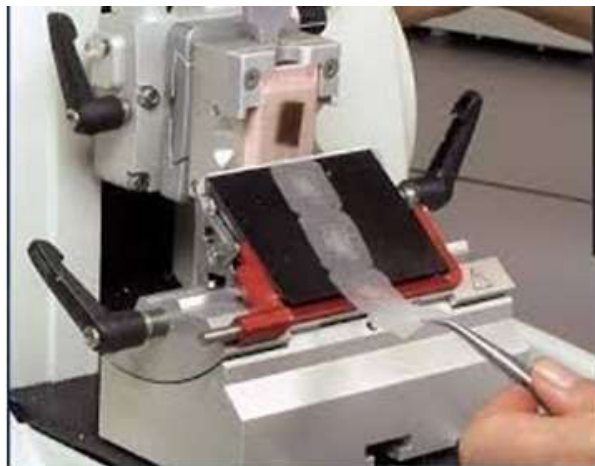
<sup>2</sup> Paraffin embedding



شکل ۲-۸ ژلاتینه کردن لام ها

### ۲-۹-۲-۱ برش گیری<sup>۱</sup>

برای برش زدن قالب‌های پارافینی از دستگاه میکروتوم استفاده شد. برای ایجاد نتیجه بهتر در هنگام برش زدن، قبل از برش قلب‌ها مدتی در یخچال نگهداری شدند. میکروتوم را تنظیم کرده و برش‌هایی نازک به ضخامت ۵-۷ میکرون تهیه گردید. برای باز شدن چروک نمونه‌ها، آن‌ها را در حمام آب گرم (۴۲ درجه سانتی‌گراد) شناور کرده، در ادامه برش‌ها را به لام‌های تمیز منتقل گردید. جهت خشک شدن، لام‌ها به مدت ۲۴ ساعت در مقابل جریان هوا قرار داده شد. بعد از این مرحله، مشخصات نمونه در روی لام یادداشت گردید و لام‌های آماده شده در جعبه مخصوص قرار داده شده تا در زمان مطالعات به آن مراجعه گردد.



شکل ۲-۹ مراحل برش گیری

<sup>۱</sup>Sectioning

### ۲-۹-۳ رنگ آمیزی

به منظور بررسی لام های تهیه شده از جنبه های بافت شناسی، از رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین مطابق با دستور عمل رنگ آمیزی استفاده گردید.

### ۲-۹-۳-۱ رنگ هماتوکسیلین اتوزین (E&H)

رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین یک روش عمومی برای رنگ آمیزی همه انواع بافت ها محسوب می شود. در این روش هسته های سلول به رنگ آبی و تا حدودی به رنگ بنفش و سیتوپلاسم به رنگ صورتی درمی آید. رنگ اتوزین دارای بار مثبت است که به گروه های آمین موجود در اسیدهای آمینه مانند لیزین و آرژنین متصل می شود و در نتیجه پروتئین ها به رنگ صورتی در می آورد. هماتوکسیلین به آنیون هایی مثل گروه های فسفات موجود در اسیدهای نوکلئیک متصل می شود و آن ها را به رنگ آبی در می آورد (۴۹).

### روش تهیه رنگ هماتوکسیلین اتوزین

الف) روش تهیه هماتوکسیلین: در ابتدا محلول A، شامل ۵ گرم پودر هماتوکسیلین در ۱ لیتر الکل خالص تهیه گردید. محلول B از حل کردن ۱۰۰ گرم سولفات آلومینیوم پتاسیم در ۱ لیتر آب مقطر به کمک حرارت به دست آمد. سپس از محلول A و B به مقدار برابر با هم مخلوط کرده و تا زمان رسیدن به نقطه جوش حرارت داده شد. در مراحل بعد به این محلول ۳ گرم اکسید مرکوریک قرمز اضافه و به کمک حرارت کاملاً حل شد. پس از سرد شدن به ازای هر ۱۰۰ میلی لیتر از محلول حاصل ۳ میلی لیتر اسید استیک اضافه شد. بعد از صاف کردن رنگ حاصل مورد استفاده قرار گرفت.

ب) رنگ اتوزین الکی

برای تهیه اتوزین الکی، یک گرم پودر اتوزین در ۱۰۰ میلی لیتر اتانول ۸۰٪ حل گردید و پس از صاف کردن مورد استفاده قرار گرفت.

روش رنگ آمیزی به شرح زیر انجام شده است:

پارافین زدایی توسط زایلن در دو نوبت ۱۰ دقیقه

آب دهی لام ها با استفاده از غلظت های نزولی اتانول شامل: ۹۶٪، ۹۰٪، ۸۰٪، ۷۰٪ و در نهایت آب مقطر هر کدام به مدت ۳ دقیقه

رنگ آمیزی با هماتوکسیلین ۳-۵ دقیقه

شستشو با آب جاری ۱۰ دقیقه

شستشو با اتانول ۷۰٪ ۳ دقیقه

رنگ آمیزی با ابوزین الکی ۲-۱ دقیقه

شستشو با اتانول مطلق ۳ دقیقه

<sup>1</sup> hematoxylin and eosin

شفاف‌سازی با زایلین در دو نوبت ۳ دقیقه

برای تهیه لام دائمی، از چسب انتلان<sup>۱</sup> روی نمونه ریخته و لامل را با زاویه ۴۵ درجه روی لام قرار داده و پس از گذشت مدت‌زمانی در حدود چند ساعت لام کاملاً خشک شده و برای مطالعات بافت‌شناسی قابل‌استفاده است. لام‌های آماده شده مطابق پروتوکل رنگ‌آمیزی هماتوکسلین اتوزین، در زیر میکروسکوپ نوری Olympus, IX70 ساخت کشور Japan مورد مشاهده و مطالعه قرار گرفت و از نمونه‌ها با دوربین، عکس‌برداری صورت گرفت

---

<sup>۱</sup> Entellan

« فصل سوم »

نتیج

در این فصل به بررسی نتایج حاصل از این پژوهش در چهار بخش پرداخته شده است.

۱- نتایج حاصل از تست سکتته که شامل:

الف: اندازه‌گیری آنزیم‌های قلبی جهت تائید سکتته حاد قلبی.

ب: بررسی نتایج حاصل از مقاطع بافت‌شناسی توسط تکنیک رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین.

۲- نتایج حاصل از تصاویر میکروسکوپ الکترونی و تعیین اندازه آگزوزوم‌ها با روش DLS.

۳- نتایج حاصل از تکنیک Real Time PCR به منظور بررسی میزان بیان ژن MiR-19b.

۴- آنالیز آماری.

### ۳-۱-۱ بخش اول نتایج حاصل از اندازه‌گیری آنزیم‌های قلبی

جهت تائید سکتته حاد قلبی در این پژوهش، میزان CK-MB و تروپونین I به منظور تائید سکتته قلبی مورد ارزیابی و اندازه‌گیری قرار گرفت.

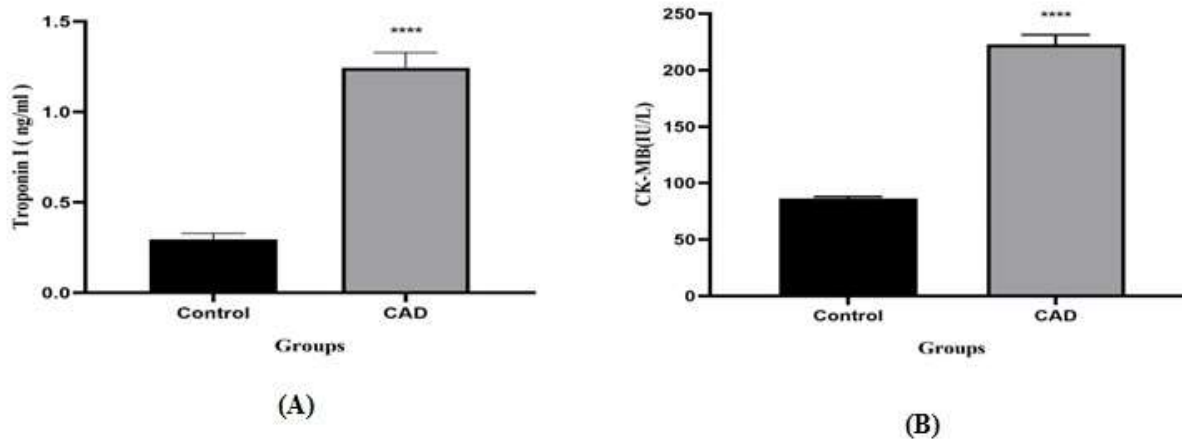
#### ۳-۱-۱-۱ آزمایش کراتینین فسفو کیناز

آزمایش CKP- MB یک نشانگر قلبی است که برای تشخیص انفارکتوس حاد قلب، به کار می‌رود. سطح آنزیم CPK-MB جهت تعیین وسعت و نیز زمان شروع انفارکتوس میوکارد بسیار مفید است. اگر سطح این آنزیم بالا باشد نشان‌دهنده آن است که اخیراً یک انفارکتوس وسیع و قابل توجه ایجاد شده است (۵۰).

#### ۳-۱-۲ آزمایش تروپونین

تروپونین نوعی پروتئین است که در ماهیچه‌ی قلب یافت می‌شود. مقادیر بالای تروپونین در خون ممکن است به معنای حمله‌ی قلبی باشد. این آزمایش اغلب برای تشخیص حمله قلبی استفاده می‌شود (۵۰).

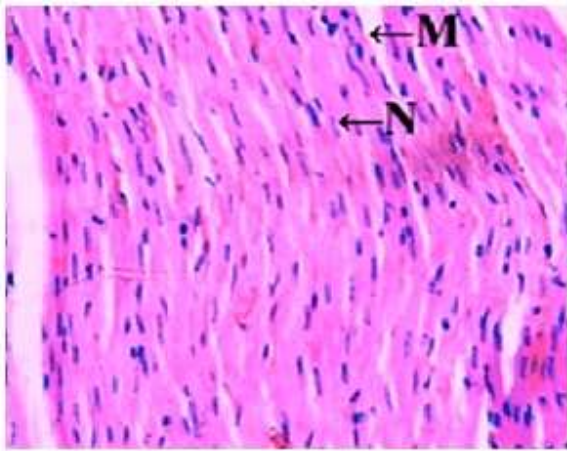
مقایسه فعالیت آنزیم کراتین کیناز و غلظت تروپونین در گروه کنترل و سکتته در نمودارهای زیر نمایش داده می‌شود (شکل ۱-۳ A و B). میانگین فعالیت CK-MB در گروه کنترل و سکتته  $\mu\text{l}$  ۸۶/۱۶۸۴۶ و  $\mu\text{l}$  ۲۲۲/۸۸۲۵ بود که اختلاف معنی‌داری را در سطح اطمینان کمتر از ۰/۰۵ درصد را نشان داد. همچنین میانگین غلظت تروپونین قلبی در گروه کنترل و سکتته به ترتیب  $\mu\text{l}$  ۰/۲۹۵۳۸۵ و  $\mu\text{l}$  ۱/۲۴۴۱۶۷ بود که اختلاف معنی‌داری را در سطح اطمینان کمتر از ۰/۰۵ درصد را نشان داد.



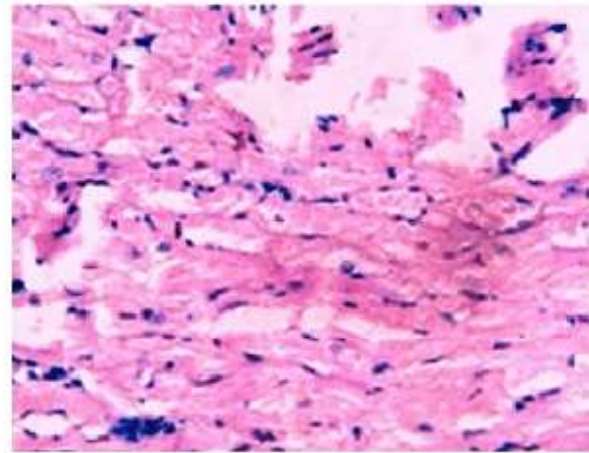
شکل ۳-۱ (A) نمودار مقایسه فعالیت آنزیم کراتین کیناز در گروه کنترل و سکنه (B) نمودار مقایسه غلظت تروپونین در گروه کنترل و سکنه

### ۳-۱-۳ نتایج مطالعات بافت‌شناسی

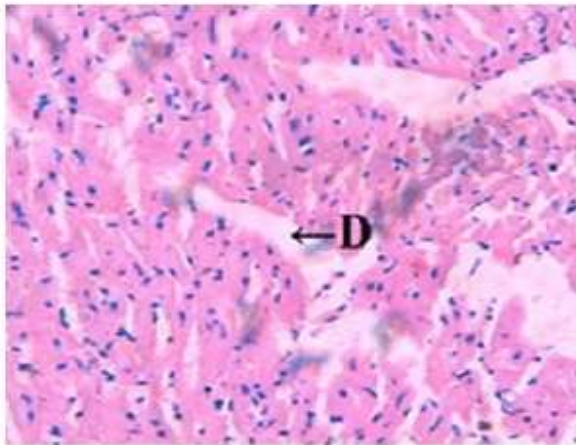
جهت اطمینان از بروز سکنه قلبی، مقاطع بافتی تهیه شده از نمونه‌های سالم و سکنه مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت. در این تکنیک رنگ‌آمیزی، هسته‌ها به رنگ آبی تا بنفش و سیتوپلاسم به رنگ صورتی مشاهده شد. نتایج این بخش از مطالعه نشان می‌دهد که رشته‌های عضلانی بافت قلبی به صورت کاملاً منسجم در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند به علاوه عروق خونی که در گروه مدل به صورت خونریزی داخل بافتی مشاهده شد، نفوذ لنفوسیتی در داخل بافت قلبی را نشان داد.



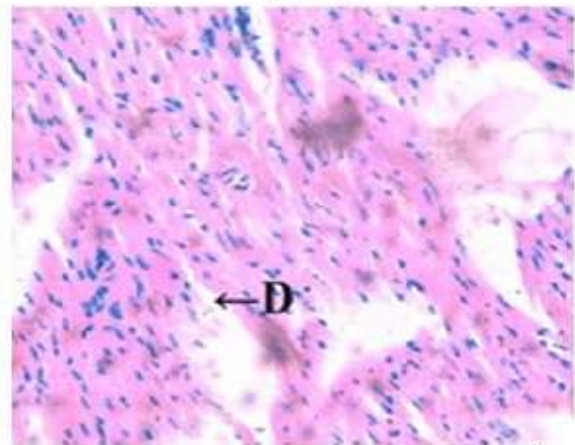
(A)



(B)



(C)



(D)

شکل ۲-۳ (A) مقطع برش طولی بافت قلب سالم. فیبرهای قلبی با نظم مشخص در کنار یکدیگر قرار دارند.  
 (B) مقطع برش طولی بافت نمونه با ایجاد سکنه قلبی. به هم ریختگی در توالی استقرار فیبرهای قلبی مشاهده می‌شود.  
 (C) و (D) مقاطع طولی نکروز بافتی و به هم ریختگی بافتی در بین فیبرهای قلبی در نمونه‌های سکنه مشاهده می‌شود.

بزرگنمایی ۴۰۰X

M: میوکاردیومیست

N: هسته

D: بافت دژنره قلب



### ۳-۱-۳ بررسی هیستولوژی بافت قلب

تغییرات بافتی قلبی در شکل ۳ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، در موش‌های مدل سکنه قلبی انسجام بافت ماهیچه‌ای کاهش یافته است. همچنین عروق خونی به صورت خونریزی داخل بافت و نفوذ سلول‌های التهابی به داخل بافت افزایش قابل توجهی را نشان داد.

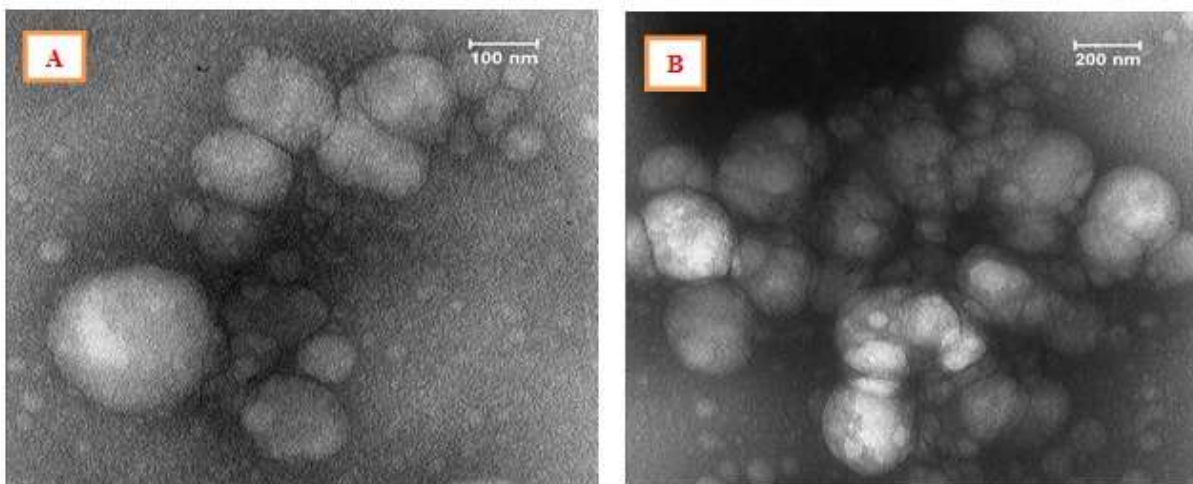
بررسی بافت‌شناسی با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین بر روی بافت میوکارد گروه کنترل (شاهد) و گروه سکنه قلبی نشان داد که در موش‌های صحرایی تحت تأثیر ایزوپرتونول (ایزوپرنالین)، ساختار مورفولوژیکی طبیعی قلب تغییر کرده و علائم نکروز، نفوذ سلول‌های لکوسیتی و عدم انسجام فیبرهای عضلانی قلبی مشاهده می‌شود.

### ۳-۲ بخش دوم بررسی نتایج حاصل از تصاویر میکروسکوپ الکترونی و اندازه‌گیری

#### اگزوزوم‌ها با روش DLS

#### ۳-۲-۱ بررسی اگزوزوم‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری

با استفاده از میکروسکوپ الکترونی TEM ساختار اگزوزوم‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. اگزوزوم‌ها ذراتی کروی شکل با دولایه لیبیدی هستند که بین ۳۰ الی ۱۰۰ نانومتر اندازه دارند. در این بررسی مشخص شد غشای اگزوزوم و شکل کروی آن در طی فرایند جداسازی حفظ شده است و شکل کروی آن‌ها در تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ TEM قابل مشاهده است.

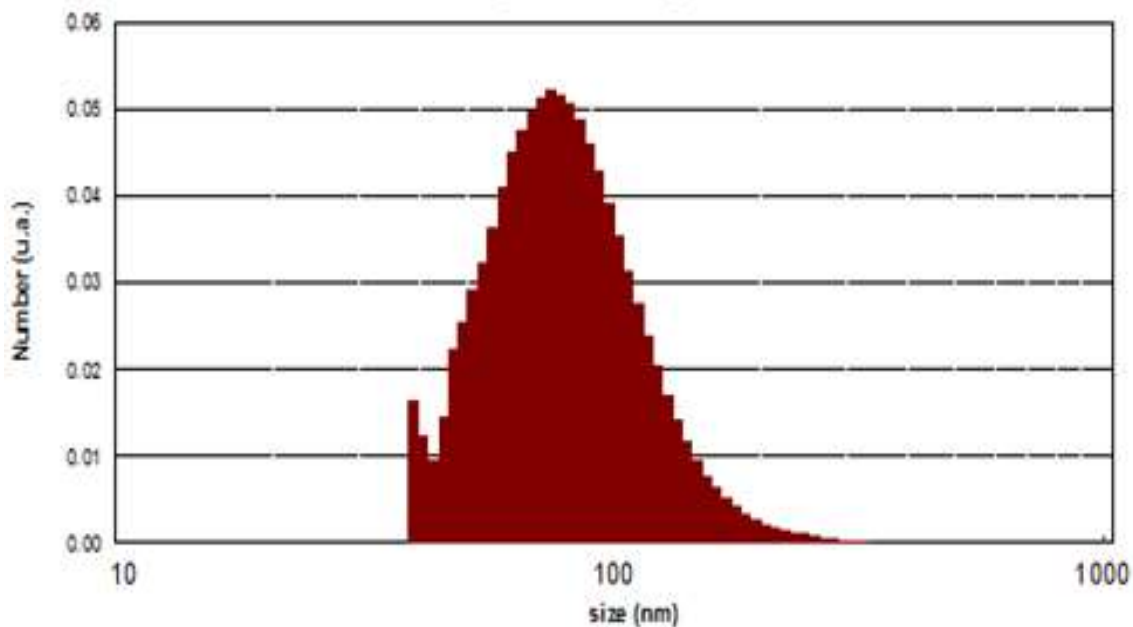


شکل ۳-۳ (A) تصویر میکروسکوپی اگزوزوم توسط میکروسکوپ TEM (رنگ‌آمیزی یورانیل استات) با بزرگنمایی ۱۰۰ nm (B) تصویر میکروسکوپی اگزوزوم با تکنیک TEM (رنگ‌آمیزی یورانیل استات) با بزرگنمایی ۲۰۰ nm

### ۳-۲-۲ بررسی اگزوزوم ها با استفاده از روش پراکندگی دینامیکی نور (DLS)

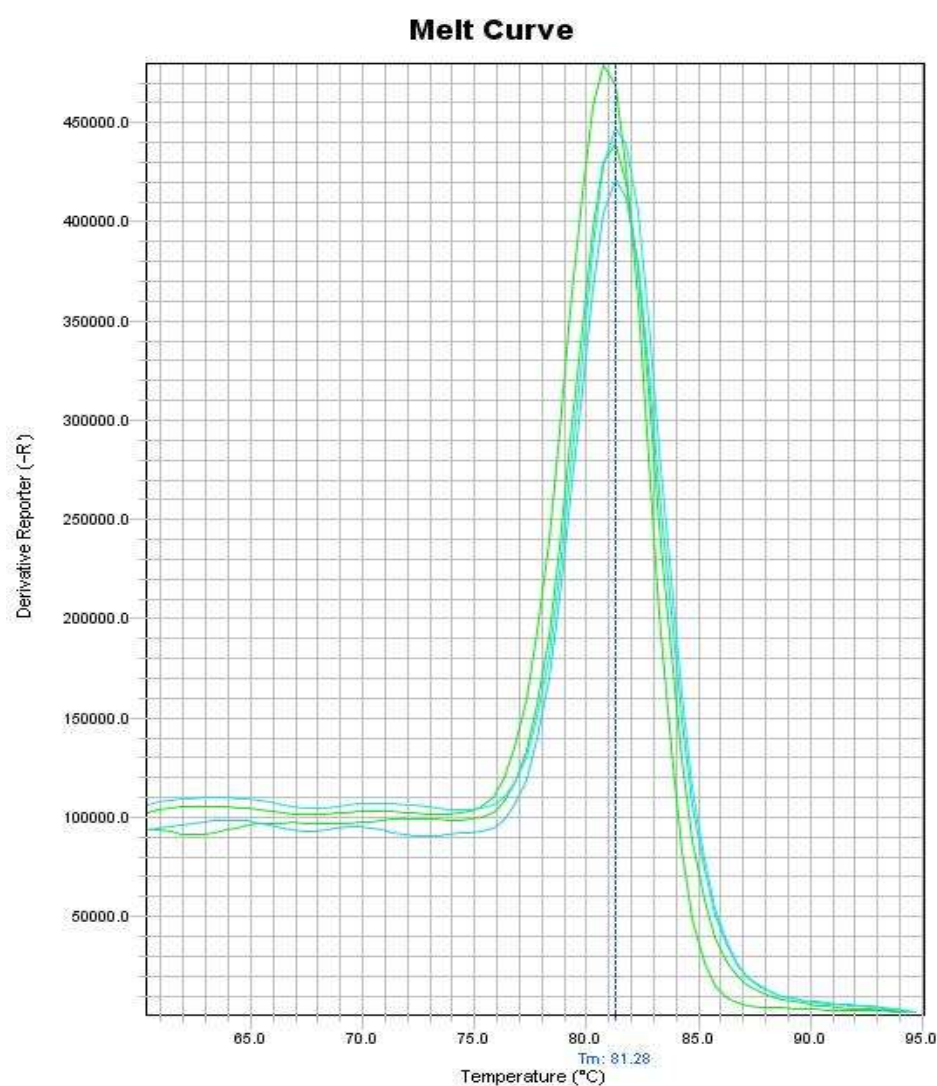
در این پژوهش با استفاده از دستگاه DLS، مدل Vasco3 قطر ذرات موجود در سوسپانسیون حاوی اگزوزوم های جدا شده تعیین گردید. همان گونه که در شکل ۷ آمده است، توزیع اندازه ذرات با نقطه اوج حدود ۸۰ نانومتری مشاهده شد.

سنجش اندازه قطر اگزوزوم بر اساس تعداد

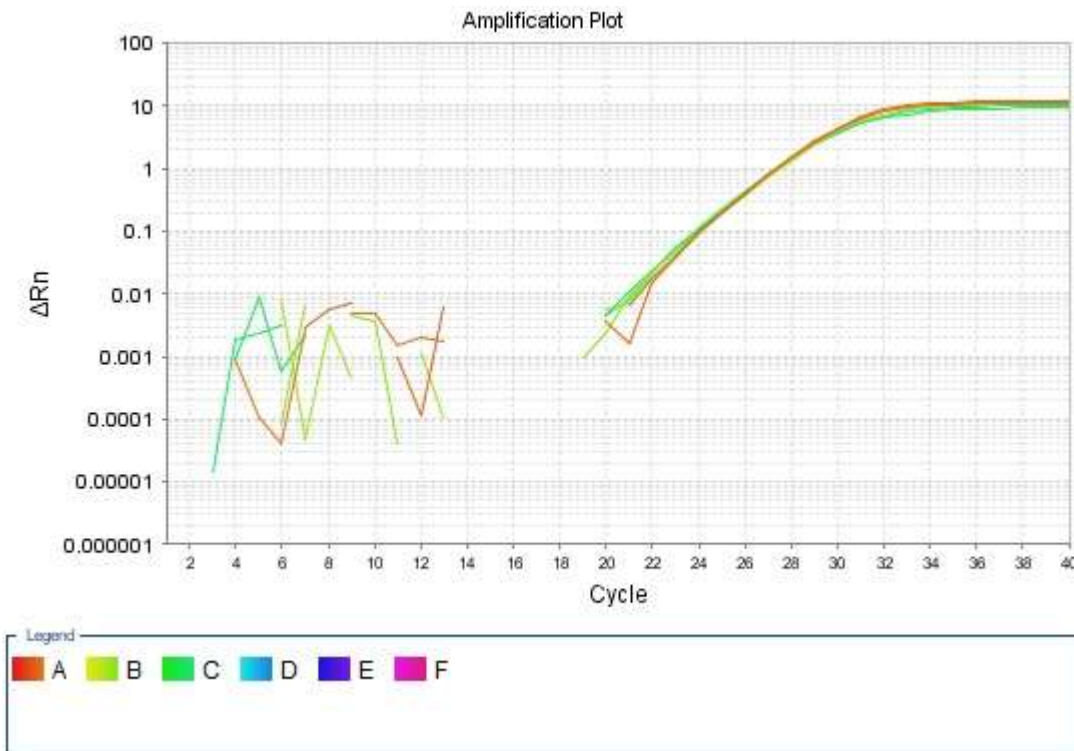


شکل ۳-۴ سنجش اندازه اگزوزوم ها توسط DLS، توزیع زنگوله ای شکل با نقطه اوج ۸۰ نانومتری را نشان داد.

جهت سنجش دستگاه Real-Time PCR از منحنی ذوب و منحنی تکثیر Real-Time استفاده گردید که این نمودارها به منظور تأیید انجام واکنش و اختصاصی بودن محصول و اطمینان از نبود محصولات غیراختصاصی رسم گردیده است. تأیید اختصاصی بودن عملکرد پرایمرها و نیز عدم آلودگی به DNA ژنومی با بررسی پیک منحنی اختصاصی ذوب در دمای ۸۱ درجه سانتی‌گراد نشان داده شد.



شکل ۳-۵ نمودار منحنی ذوب. وجود باندهای تک نشان می‌دهد تک‌محصول اختصاصی و بدون مشکل تکثیرشده است.



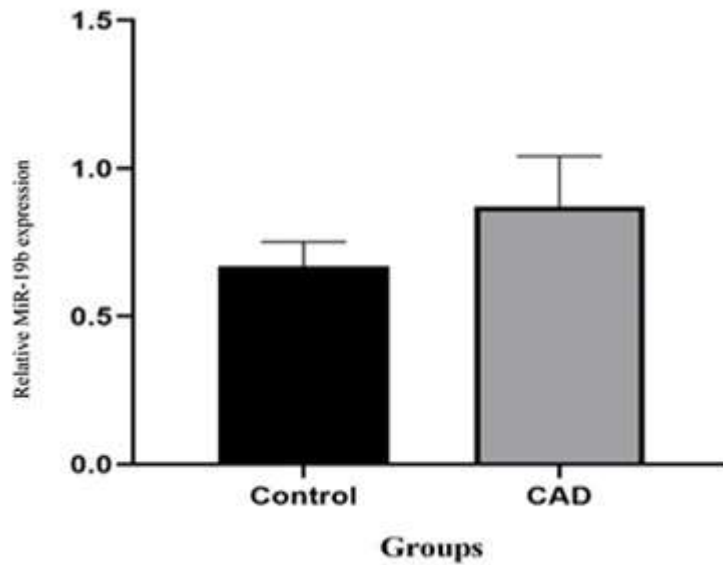
شکل ۳-۶ نمودار منحنی تکثیر ژن. نشان‌دهنده تکثیر با اختصاصیت بالا

### ۳-۳ نتایج حاصل از Real Time به منظور بررسی میزان بیان ژن MiR-19b

روش Real-time PCR علاوه بر داشتن حساسیت و دقت بالا، دارای کاربردی آسان، سرعت زیاد و قیمت تمام شده مناسبی نیز می‌باشد که مجموع این ویژگی‌ها باعث می‌شود که به توان از آن به‌عنوان یک روش مناسب در مراکز تولید دارو جهت تشخیص میزان ناخالصی‌های DNA در محصولات نو ترکیب و کنترل کیفی آن‌ها استفاده نمود. همچنین از این قابلیت برای تعیین میزان بیان برخی ژن‌ها در زمان ارزیابی اثر آن‌ها در درمان بعضی از بیماری‌های مهم نیز استفاده می‌گردد (۵۱).

جهت رسم نمودار تغییرات بیان ژن و آنالیز داده‌ها از `prism softwar(version8)` استفاده گردید.

نتایج به دست‌آمده از واکنش Real Time PCR نشان داد که این microRNA در گروه القای سکنه قلبی نسبت به گروه کنترل بیان بالاتری داشته است؛ اما این بیان معنی‌دار نبوده است. ( $p > 0.05$ )



شکل ۳-۷ نمودار بیان نسبی MiR-19b در دو گروه کنترل و گروه تحت سکته قلبی

Control: نمونه بدون سکته CAD: نمونه همراه با سکته قلبی

### ۳-۴ بخش چهارم آنالیز آماری

در این مطالعه برای نرمال سازی بیان ژن‌ها در نمونه‌های کنترل و نمونه‌های تحت سکته از فرمول  $\Delta tc = ct(target) - ct(control)$  استفاده شد. در هر یک از دو گروه برای درک چگونگی تغییرات بیان ژن‌ها  $\Delta tc$  محاسبه شده برای هر یک از نمونه‌ها، در فرمول  $2^{-\Delta\Delta CT}$  وارد شد. در نهایت داده‌های حاصل در دو گروه با استفاده از روش‌های آماری با هم مقایسه گردید. جهت آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار Prism (version 8) و t-test استفاده شد. برای همه روابط p-value محاسبه شد و  $p < 0.05$  معنادار تلقی شد.

بر این اساس، مقدار تروپونین و CK-MB با  $P < 0.05$  افزایش معنادار را نشان داد و میزان بیان ژن مورد نظر با  $P > 0.05$  افزایش معناداری را نشان نداد.

فصل ہمارم

بحث و نتیجہ گیری پیشہ ما دہ

#### ۴- ۱ اهداف پروژه

سکته قلبی از عمده ترین دلایل مرگومیر در سراسر جهان است که یک بیماری مزمن نیز محسوب می شود. سکته قلبی را می توان با علائم بالینی از جمله: یافته های الکتروکاردیوگرافی، افزایش مقادیر نشانگرهای زیستی و همچنین توسط تصویربرداری تشخیص داد و یا حتی ممکن است توسط روش های آسیب شناسی تعریف شود (۵۲)؛ بنابراین شناسایی و روش های پیش درمان قطعی و پیش آگهی در کاهش آمار مرگومیر ناشی از این بیماری از اهمیت زیادی برخوردار می باشد.

در بخش اول تحقیق حاضر، تلاش برای یافتن روش مناسب القای سکته حاد قلبی بود که در مقایسه با سایر روش ها کم تهاجمی تر و در عین حال سرعت عمل لازم را نیز داشته باشد. به همین جهت از داروی ایزوپرنالین استفاده گردید و تزریق به میزان  $150 \text{ mg/kg}$  به صورت زیر جلدی در ۲ روز متوالی صورت گرفت. در ادامه جهت تأیید سکته حاد قلبی از روش سنجش آزمایشگاهی استفاده گردید.

اگزوزوم ها یکی از انواع ویزیکول های غشایی هستند که توسط اکثر سلول ها در فضای خارج سلولی ترشح می شوند. این ویزیکول ها در بسیاری از فرایندهای بیولوژیکی و ارتباط های بین سلولی نقش دارند. زمانی که این ویزیکول ها را با میکروسکوپ الکترونی مشاهده می کنند به صورت کره های مسطح فنجان شکل با قطر ۳۰ تا ۱۵۰ نانومتر دیده می شوند. اگزوزوم ها به صورت یک لایه ی لیپیدی با ضخامت متوسط ۵ نانومتری باشند (۵۳). اگزوزوم ها توسط انواع سلول های بدن ترشح می شوند و همچنین به وفور در مایعات بدن مانند بزاق، خون، ادرار و همچنین شیر مادر دیده می شود. نقش اصلی اگزوزوم ها حمل اطلاعات با تحویل اثرات مختلف یا مولکول های سیگنالینگ است (۵۴).

استفاده از نشانگرهای زیستی در تحقیقات اساسی و بالینی و همچنین در اعمال جراحی به قدری عادی شده است که اکنون حضور آن ها به عنوان نقاط نهایی اولیه در آزمایشات بالینی تقریباً بدون سؤال پذیرفته شده است (۵۵). امروزه از نشانگرهای زیستی برای کمک به تشخیص به موقع بیماری استفاده شده است در حالی که تعداد بیشتری از مارکرهای جدید به دنبال سکته قلبی حاد یا سندرم حاد کرونر شناسایی شده اند. از جمله بیومارکرهایی که برای تشخیص و پیش آگهی سکته قلبی می توان نام برد: پروتئین اتصال دهنده اسیدهای چرب و کوپتین که در ترکیب با تروپونین قلب می تواند به تشخیص سکته قلبی یا سندرم حاد کرونر در ساعات اولیه علائم کمک کند (۵۶).

گام بعدی، تلاش جهت استخراج اگزوزوم ها به عنوان ویزیکول های کوچک خارج سلولی بود که حاوی ترکیبات بسیار مهمی از جمله Micro RNA می باشند. میکرو RNA ها دسته ای از RNA های غیر رمزگذار هستند (۵۷). میکرو RNA ها مولکول های کوچک ۲۲ نوکلئوتیدی هستند که کار تنظیم بیان ژن را در سطح پس از رونویسی تنظیم می کنند. بیان آن ها در سلول ها و بافت ها موقتی است. تنظیم نامنظم میکرو RNA ها منجر به بروز و توسعه بیماری ها می شود. امروزه میکرو RNA ها به عنوان نشانگرهای زیستی و پیش آگاهی بیماری ها و همچنین در طبقه بندی شناسایی انواع مختلف سرطان ها کاربرد دارند. میکرو RNA ها را می توان در خون و مایعات بدن مشاهده کرد (۵۸).

جایگزینی آگروزوم های مشتق شده از سرم خون به جای کاربرد مستقیم از سلول ها، بسیاری از چالش ها و نگرانی های موجود در این زمینه را از بین می برد. آگروزوم ها نه تنها به عنوان یک ویزیکول غشایی دولایه لیپیدی، توانایی حمل بسیاری از ترکیبات را دارند بلکه می توانند محتویات خود را از اثر آنزیم های تخریبی و مواد شیمیایی نیز حفظ کنند (۵۹).

در طی دهه های اخیر آشکار شده است که Micro RNA ها نقش عمده ای در بیماری هایی مانند سرطان و بیماری های قلبی-عروقی دارند. علاوه بر این، تشخیص آسان آن ها در گردش خون، آن ها را به یک هدف دلخواه برای نشانگرهای زیستی بسیاری از بیماری ها تبدیل کرده است (۶۰). از آنجایی که امروزه سکته قلبی یکی از عوامل مهم مرگ و میر در سراسر جهان می باشد و با توجه به شناخت Micro RNA ها که در هایپرتروفی قلب نقش به سزایی دارند می توان از آن ها به عنوان نشانگرهای زیستی و پیش آگهی در هایپرتروفی قلب به عنوان ابزار درمانی جدید استفاده کرد (۶۱). همان طور که تاکنون گفته شد برخی نشانگرهای زیستی برای درمان و بهبود بیماری های قلبی به ما کمک می کنند و همچنین می توانند پیش آگهی از این بیماری در اختیار ما بگذارند که در تصمیم گیری در مورد میزان تهاجمی بودن آن ها و همچنین برای درمان بیماری ها نیز کمک کننده خواهند بود. نشانگرهای زیستی پارامترهای بیولوژیکی قابل اندازه گیری و کمی هستند که به عنوان شاخص هایی برای ارزیابی سلامت و فیزیولوژی عمل می کنند. استفاده از نشانگرهای زیستی به منظور بهبود تشخیص آنفارکتوس میوکارد مهم می باشد. تروپونین و کراتین کیناز دو نشانگر مهم در تشخیص سکته قلبی شناخته شده اند (۵۶). البته در بسیاری از این موارد مانند تست های تشخیصی آزمایشگاهی (تست تروپونین و تست CPK-MB<sup>1</sup>) قبل از ایجاد سکته ارزش تشخیصی ندارند و معمولاً پس از ایجاد سکته قابل اندازه گیری هستند. بنابراین بیومارکرها به عنوان فاکتورهای تشخیصی در درمان برخی بیماری ها و جلوگیری از سکته حاد قلبی مؤثر هستند (۶).

در این تحقیق جهت تأیید نهایی سکته حاد قلبی از روش مقایسه هیستولوژی بافت قلب نرمال با بافت دارای سکته قلبی، (با تکنیک رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین) همچنین از روش معمول سنجش تست های آزمایشگاهی استفاده گردید. ویزیکول های خارج سلولی از جمله آگروزوم ها به عنوان جزء اصلی از عملکرد سلول های بنیادی، امیدواری بسیار زیادی برای استفاده از آن ها در ترمیم درمان و احیا سلول های قلبی ایجاد کرده است (۶۲). آگروزوم ها در بسیاری از مایعات بدن یافت می شوند، این ویزیکول ها با حمل RNA و پروتئین های منحصر به فرد دارای عملکردهای بیولوژیکی بسیاری هستند که در حال حاضر تنها بخش کوچکی از آن ها قابل درک است (۶۳). برخلاف ژن درمانی، مولکول های میکرو RNA به سرعت وارد می شوند و بعد از انجام دادن کار خود در قلب باقی نمی ماندند، اما یک اثر ماندگار در ترمیم قلب آسیب دیده دارند (۶۴).

گام اساسی این پروژه، بررسی میزان بیان ژن MiR-19b در دو گروه کنترل و نمونه سرم حاوی سکته قلبی القاشده بود که با روش Real Time PCR انجام گرفت و نمودار حاصل از داده ها رسم گردید. از آنجایی که میزان بیان برخی Micro RNA ها در طول سکته قلبی و سایر عارضه های قلبی دچار تغییر می شود بر آن شدیم تا میزان بیان MiR-19b را قبل و پس از سکته حاد قلبی مورد ارزیابی قرار داده و نتایج به دست آمده را با میزان بیان این ژن در گروه کنترل مقایسه کرده و معنادار بودن و یا بی معنی بودن نتایج را گزارش نماییم.

1 Creatine phosphokinase-MB



## ۴-۲ بررسی شیوه های مورد مطالعه جهت القای سکتة قلبی و استخراج اگزوزوم

تاکنون روش‌های مختلفی جهت بررسی بیماری‌های قلبی - عروقی و به‌ویژه سکتة حاد قلبی مطرح شده است. در بسیاری از تحقیقات انجام شده در زمینه استخراج اگزوزوم و برای یافتن ارتباط معنادار بین میزان اگزوزوم و بیماری‌های قلبی - عروقی و همچنین استفاده از اگزوزوم‌ها به‌عنوان میکرو ویزیکول های کوچک غشایی در درمان بسیاری از بیماری‌ها به‌جای استفاده از مدل‌های حیوانی بیشتر از نمونه‌های بیمارستانی استفاده گردیده است؛ اما در برخی موارد از نمونه‌های حیوانی نیز استفاده شده است برای مثال Camila Uribe copie و همکارانش در سال ۲۰۱۷ موش‌های تحت آزمایش خود را به مدت ۱۶ ماه تحت رژیم پرچربی قرار دادند که در نتیجه آن، موش‌ها به هیپرتروفی قلبی و کاهش عملکرد قلب مبتلا شدند (۴۵). در بررسی تأثیرات پیش آماده‌سازی قلب با تمرینات ورزشی، جهت ایجاد انفارکتوس حاد قلبی از تزریق زیر جلدی ایزوپرنالین در دو روز متوالی با فاصله ۲۴ ساعت استفاده کردند (۶۵). در انجام این پژوهش نیز از تزریق داروی ایزوپرنالین به‌صورت زیر جلدی استفاده گردید که نسبت به روش‌های جراحی که معمولاً مورد استفاده قرار می‌گیرند کم‌خطرتر و کم‌تهاجمی‌تر می‌باشد. یکی از روش‌های معتبر برای جداسازی اگزوزوم‌ها استفاده از روش اولتراسانتریفیوژ است. در این روش اگزوزوم‌های زیادی به دست می‌آید اما ممکن است اگزوزوم‌ها با سایر مولکول‌های زیستی دیگر از جمله پروتئین‌ها، آلودگی داشته و در رسم نمودار نیز پراکندگی ایجاد کند (۶۳).

روش دیگر مبتنی بر استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول می‌باشد. پلی‌اتیلن گلیکول پلیمری است که سبب محبوس کردن مولکول‌های آب شده و باعث می‌شود ترکیبات با محلولیت کمتر از محلول جدا شوند. در این روش نمونه با محلول حاوی پلی‌اتیلن گلیکول انکوبه شده و در دمای چهار درجه به مدت زمان یک شبانه روز قرار می‌گیرد و سپس رسوب حاوی اگزوزوم‌ها با فیلتراسیون توسط سانتریفیوژ با دور پایین جدا می‌شود (۱۸). از روش‌های دیگری مانند الترافیلتریشن نیز استفاده می‌شود که اگزوزوم‌ها را برحسب اندازه با به‌کارگیری فیلترهای غشایی، جدا می‌کند (۶۶).

برخی مطالعات روش مبتنی بر کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا برای جداسازی اگزوزوم‌ها را پیشنهاد می‌دهند. به نظر می‌رسد هرکدام از روش‌های متفاوت جداسازی و استخراج اگزوزوم، مزایا و معایبی داشته باشد؛ بنابراین در هنگام انتخاب پروتکل مناسب ممکن است ترکیبی از چند روش مختلف استفاده شود (۵۳).

در پژوهش پیش رو از کیت شرکت آناسل با نام تجاری اگزوسیب جهت استخراج اگزوزوم از نمونه سرم حاوی سکتة قلبی استفاده گردید. استفاده از این کیت تجاری روشی سریع برای استخراج و تصفیه اگزوزوم از محیط کشت سلول و همچنین مایعات بیولوژیک مانند سرم خون را فراهم می‌کند. مطابق دستورالعمل ارسالی از شرکت سازنده، این کیت امکان جداسازی اگزوزوم در محیط استریل را فراهم کرده ضمن اینکه در زمان کوتاه و با سرعت‌های پایین‌تر سانتریفیوژ جداسازی انجام می‌گیرد. همچنین حتی با وجود حجم کم محیط کشت امکان دسترسی به مقادیر بالاتری اگزوزوم امکان پذیر می‌باشد.

### ۴-۳ بررسی پروتوکل های مورد مطالعه جهت استخراج RNA و سنتز cDNA

MiRNA ها تنها بخش کوچکی از کل نمونه RNA را شامل می‌شوند، غلظت MiRNA در سلول حتی می‌تواند در حد چند مولکول باشد (۶۷). فراوانی پایین MiRNA ها نیازمند روش‌های سنجش دقیق و حساس است این در حالی است که شباهت بالای توالی در بین اعضای یک خانواده، تشخیص آن‌ها را دشوارتر نیز می‌کند. سطح بیان MiRNA ها می‌تواند از چند کپی تا بیش از ۵۰۰۰۰ کپی در سلول تغییر کند، بنابراین شناسایی آن‌ها در گسترده دینامیکی وسیع ضروری است. در ضمن یک ژن می‌تواند به‌طور هم‌زمان به‌وسیله چندین MiRNA تنظیم شود، بنابراین به‌کارگیری روش‌های ویژه برای تشخیص چندین MiRNA به‌منظور درک اهمیت و پیچیدگی عملکرد این تنظیم‌کننده‌های کوچک لازم است (۶۸).

### ۴-۳-۱ روش‌های شناسایی MiRNA ها

میکرو آرایه اجز مؤثرترین روش‌های مورداستفاده برای شناسایی MiRNA ها است. این تکنولوژی امکان آنالیز هم زمان هزاران MiRNA را در طی یک آزمایش فراهم می‌کند (۶۹). مرحله اول در میکرو آرایه MiRNA، خالص‌سازی RNA یا MiRNA از سلول یا بافت است. پروتوکل‌های بسیاری به منظور استخراج RNA باکیفیت بالا، توسعه یافته‌اند. اگرچه امکان استفاده از کل RNA برای آنالیز وجود دارد، جداسازی و استخراج آن‌ها به دقت بالایی نیاز است. در شناسایی MiRNA ها با استفاده از آنالیز میکروآرای، طراحی پروب مناسب بسیار ضروری است (۶۹).

رایج‌ترین تکنیک برای تشخیص MiRNA ها، آنالیز Real-Time PCR است. این واکنش با رونویسی معکوس RNA به cDNA، آغاز می‌شود (۶۴). طول کوتاه MiRNA ها، فقدان دم پلی A و این واقعیت که توالی MiRNA بالغ در Pri-MiRNA و Pre-miRNA نیز وجود دارد، چالش‌های متعددی را برای رونویسی معکوس ایجاد می‌کند (۶۹). با این حال امروزه از دو روش متفاوت برای رونویسی معکوس استفاده می‌شود: روش معکوس اختصاصی یا عمومی MiRNA ها. در روش اول، هر MiRNA به‌وسیله پرایمرهای ساقه و لوپ اختصاصی به صورت معکوس رونویسی می‌شوند. پرایمر ساقه و لوپ دارای سه بخش مختلف هستند: بخش تک‌رشته‌ای کوتاه، که مکمل توالی شناخته‌شده در انتهای ۳'، MiRNA است. قسمت دوم دو رشته‌ای (ساقه) و لوپ که توالی عمومی متصل شونده به پرایمر است. cDNA حاصل سپس به‌وسیله یک پرایمر اختصاصی MiRNA و یک پرایمر عمومی، برای PCR به کار می‌رود. طراحی پرایمرهای ساقه و لوپ بسیار سخت است ولی ساختار آن‌ها به‌گونه‌ای است که اختصاصیت روش فوق را افزایش می‌دهد.

در روش دوم، یک توالی عمومی به همه MiRNA ها اضافه‌شده و سپس MiRNA به‌وسیله پرایمرهای عمومی به صورت معکوس رونویسی می‌شود. این روش کاربرد بسیاری دارد به‌ویژه زمانی که به آنالیز چندین MiRNA مختلف با کمک مواد اولیه محدود نیاز باشد (۶۹).

در مطالعه انجام شده برای استخراج RNA و جداسازی آن از نمونه‌ها، از کیت RNA-Plus ساخت شرکت سیناکلون<sup>۳</sup> استفاده گردید. RNA-Plus یک محلول گوانیدین / فنول می‌باشد که برای جداسازی کامل RNA مورد استفاده قرار گرفت.

<sup>1</sup> miRNA Microarrays

<sup>2</sup> Stem-loop primers

<sup>3</sup>Sinacion

این ماده از طریق اثر نمک گوانیدین و با کمک ایجاد رسوب در فاز فنول برای جداسازی RNA به‌طور هم‌زمان با DNA و پروتئین به کار می‌رود.

نتایج حاصل از نمودارهای نانودراپ با توجه به اعداد به دست آمده در طول موج‌ها ۲۳۰nm تا ۲۶۰nm حاکی از کیفیت بالای RNA موردنظر داشت.

در نمودار حاصل از واکنش Real-Time PCR افزایش بیان MiR19-b در گروه تحت سکتة حاد قلبی نسبت به گروه کنترل (شاهد) مشاهده شد. همسو با مطالعه حاضر، مطالعات قبلی نشان داده‌اند میزان بیان این ژن همراه با مسیرهای سیگنالینگ متفاوت نسبت به گروه‌های کنترل مختلف افزایش داشته است. به عنوان مثال می‌توان به نقش کنترلی MiR19-b در تکثیر و مهاجرت فیبروبلاست‌ها (۴۴) و نقش افزایشی آن در تکثیر و خاصیت ضد آپتوز در سلول‌های سرطان ریه (۷۰)، همچنین نقش درمانی آن در بازسازی و محافظت از سلول‌های قلب در برابر سکتة قلبی (۳۸)، اشاره کرد.

در بسیاری از تحقیقات انجام‌شده تفاوت میزان بیان MiR19-b در گروه حاوی سکتة نسبت به گروه کنترل معنادار بوده و این ژن به عنوان بیومارکر مناسب جهت مطالعات بعدی معرفی شده است این در حالی بود که در مطالعه حاضر تغییرات بیان MiR-19b خیلی معنی‌دار نبود. به نظر می‌رسد تفاوت در نحوه‌ی القای سکتة قلبی، عدم استفاده هم‌زمان از سایر MicroRNA های دخیل در بیماری‌های قلبی-عروقی، پایین بودن تعداد گروه‌های مورد مطالعه و استفاده از RNA مشتق شده از اگزوزوم (در مقابل استفاده مستقیم از RNA موجود در سلول) از جمله دلایل تفاوت در بیان ژن، در مطالعه حاضر است.

لذا این پژوهش به منظور درک بهتر فرایندهای سلولی، برهم‌کنش بین ژن‌های مرتبط با بیماری و بررسی بیان هم‌زمان چند ژن با هم ادامه دارد.

#### ۴-۴ پیشنهادات

پیشنهادات زیر جهت انجام تحقیقات تکمیلی ارائه می‌گردند.

۱. استفاده از نمونه حیوانی مناسب‌تر مانند خرگوش به دلیل شباهت بیشتر دستگاه‌های داخلی بدن خرگوش به بدن انسان
۲. انجام مطالعات آتی با تعداد نمونه بیشتر
۳. بررسی مسیرهای سیگنالینگ و فرایندهای سلولی و مولکولی مربوط به MiR-19b
۴. بررسی برهم‌کنش‌های MiR19-b با سایر MicroRNA های دخیل در بیماری‌های قلبی-عروقی
۵. بررسی پروتوکل اثربخشی ترکیب چند MicroRNA مرتبط با سکتة حاد قلبی و مقایسه با پروتوکل استفاده از هر MicroRNA به‌تنهایی
۶. توجه بیشتر به شاخص‌های بافتی با استفاده از سایر تکنیک‌های رنگ‌آمیزی و بررسی سایر بافت‌های درگیر شده در فرایند سکتة حاد قلبی به‌عنوان مثال بررسی تغییرات بافت کلیه و کبد
۷. مطالعات الکترون میکروسکوپی (TEM و SEM) در هنگام برهم‌کنش‌های چند MicroRNA

منابع و مراجع

1. Smeeth L, Thomas SL, Hall AJ, Hubbard R, Farrington P, Vallance P. Risk of myocardial infarction and stroke after acute infection or vaccination. *New England Journal of Medicine*. 2004;351(25):2611-8.
2. Ahmadi A, Mobasheri M, Soori H. Prevalence of major coronary heart disease risk factors in Iran. *International Journal of Epidemiologic Research*. 2014;1(1).
3. Nabel EG. Cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine*. 2003;349(1):60-72.
4. Gaziano T, Reddy KS, Paccaud F, Horton S, Chaturvedi V. Cardiovascular disease. *Disease Control Priorities in Developing Countries 2nd edition*. 2006.
5. Ahmadi A, Soori H, Sajjadi H, Nasri H, Mehrabi Y, Etemad K. Current status of the clinical epidemiology of myocardial infarction in men and women: a national cross-sectional study in Iran. *International journal of preventive medicine*. 2015;6.
6. Bohula EA, Wiviott SD, Giugliano RP, Blazing MA, Park J-G, Murphy SA, et al. Prevention of stroke with the addition of ezetimibe to statin therapy in patients with acute coronary syndrome in IMPROVE-IT (Improved Reduction of Outcomes: Vytorin Efficacy International Trial). *Circulation*. 2017;136(25):2440-50.
7. Vita JA, Treasure CB, Nabel EG, McLenachan JM, Fish RD, Yeung AC, et al. Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation*. 1990;81(2):491-7.
8. Anderson KM, Odell PM, Wilson PW, Kannel WB. Cardiovascular disease risk profiles. *American heart journal*. 1991;121(1):293-8.
9. Dhingra RK, Young EW, Hulbert-Shearon T, Leavey SF, Port FK. Type of vascular access and mortality in US hemodialysis patients. *Kidney international*. 2001;60(4):1443-51.
10. Hu G, Jousilahti P, Qiao Q, Katoh S, Tuomilehto J. Sex differences in cardiovascular and total mortality among diabetic and non-diabetic individuals with or without history of myocardial infarction. *Diabetologia*. 2005;48(5):856-61.
11. Allender S, Peto V, Scarborough P, Boxer A, Rayner M. *Coronary heart disease statistics*. 2007.
12. Mendis S, Puska P, Norrving B, Organization WH. *Global atlas on cardiovascular disease prevention and control: World Health Organization*; 2011.
13. Lv Y-c, Yang J, Yao F, Xie W, Tang Y-y, Ouyang X-p, et al. Diosgenin inhibits atherosclerosis via suppressing the MiR-19b-induced downregulation of ATP-binding cassette transporter A1. *Atherosclerosis*. 2015;240(1):80-9.
14. Ling H, Guo Z, Shi Y, Zhang L, Song C. Serum exosomal microRNA-21, microRNA-126, and PTEN are novel biomarkers for diagnosis of acute coronary syndrome. *Frontiers in physiology*. 2020;11.
15. Jeppesen DK, Fenix AM, Franklin JL, Higginbotham JN, Zhang Q, Zimmerman LJ, et al. Reassessment of exosome composition. *Cell*. 2019;177(2):428-45. e18.
16. Nojehdehi S, Hashemi SM, Hesampour A. Isolation and characterization of exosomes separated from stem cells by ultra-centrifuge method. *Research in Medicine*. 2017;41(4):244-50.
17. Subra C, Laulagnier K, Perret B, Record M. Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie*. 2007;89(2):205-12.
18. Kowal J, Tkach M, Théry C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Current opinion in cell biology*. 2014;29:116-25.

19. Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*. 2003;422(6927):37-44.
20. Gruenberg J, Van der Goot FG. Mechanisms of pathogen entry through the endosomal compartments. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006;7(7):495-504.
21. Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020;367(6478).
22. Jahangard Y, Moradi A, Mowla S. Exosomes: Characteristics, Function, and Clinical Aspects. *Modares Journal of Biotechnology*. 2019;10(1):159-64.
23. Février B, Raposo G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Current opinion in cell biology*. 2004;16(4):415-21.
24. Andreola G, Rivoltini L, Castelli C, Huber V, Perego P, Deho P, et al. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *The Journal of experimental medicine*. 2002;195(10):1303-16.
25. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of proteomics*. 2010;73(10):1907-20.
26. Wang J, Zheng Y, Zhao M. Exosome-based cancer therapy: implication for targeting cancer stem cells. *Frontiers in pharmacology*. 2017;7:533.
27. Tafrihi M, Hasheminasab E. MiRNAs: biology, biogenesis, their web-based tools, and databases. *Microna*. 2019;8(1):4-27.
28. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*. 2004;116(2):281-97.
29. Izabella S, Selvi D, Bart J. MicroRNAs, macrocontrol: Regulation of miRNA processing. *RNA*. 2010;16:1087-95.
30. Su J, Li J, Yu Q, Wang J, Li X, Yang J, et al. Exosomal miRNAs as potential biomarkers for acute myocardial infarction. *IUBMB life*. 2020;72(3):384-400.
31. Malik R, Mushtaque RS, Siddiqui UA, Younus A, Aziz MA, Humayun C, et al. Association between coronary artery disease and microRNA: literature review and clinical perspective. *Cureus*. 2017;9(4).
32. Liu N, Olson EN. MicroRNA regulatory networks in cardiovascular development. *Developmental cell*. 2010;18(4):510-25.
33. Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol*. 2006;57:19-53.
34. Boon RA, Dimmeler S. MicroRNAs in myocardial infarction. *Nature Reviews Cardiology*. 2015;12(3):135-42.
35. Dorn II GW. MicroRNAs in cardiac disease. *Translational Research*. 2011;157(4):226-35.
36. Gu H, Liu Z, Zhou L. Roles of miR-17-92 cluster in cardiovascular development and common diseases. *BioMed research international*. 2017;2017.
37. Tang Y, Zhang Y-c, Chen Y, Xiang Y, Shen C-x, Li Y-g. The role of miR-19b in the inhibition of endothelial cell apoptosis and its relationship with coronary artery disease. *Scientific reports*. 2015;5(1):1-11.
38. Gao F, Kataoka M, Liu N, Liang T, Huang Z-P, Gu F, et al. Therapeutic role of miR-19a/19b in cardiac regeneration and protection from myocardial infarction. *Nature communications*. 2019;10(1):1-15.

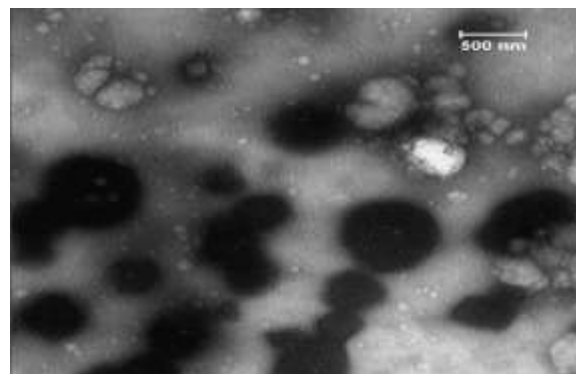
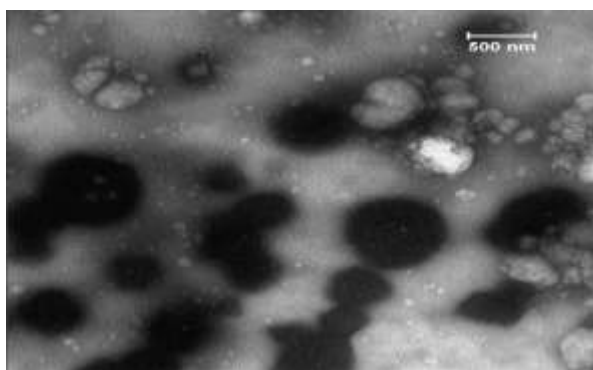
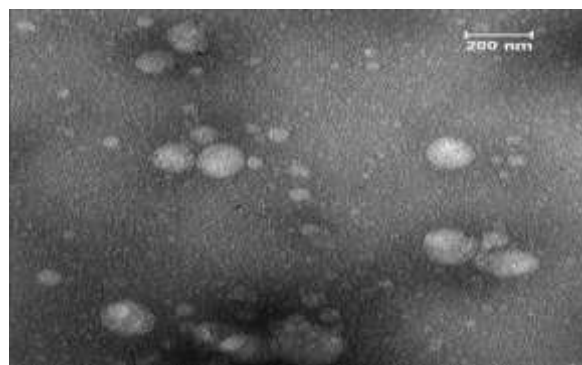
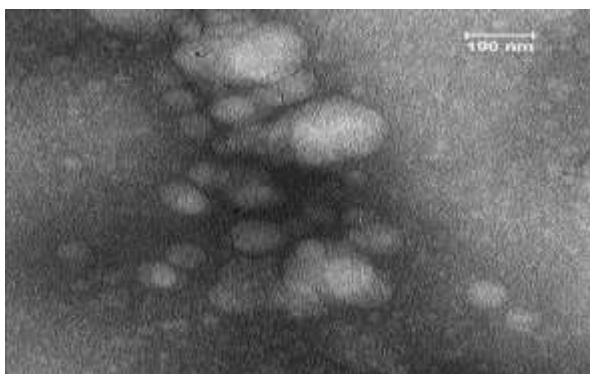
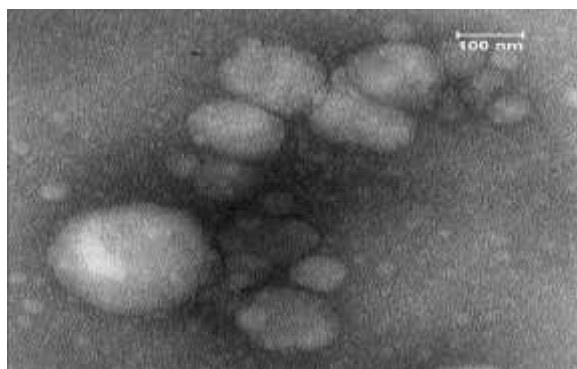
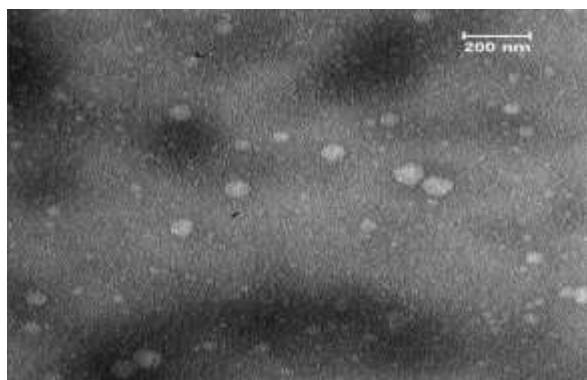
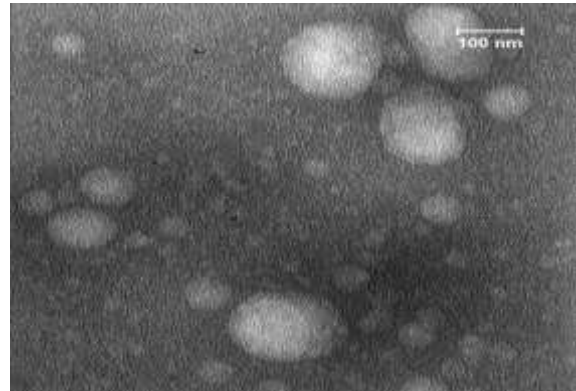
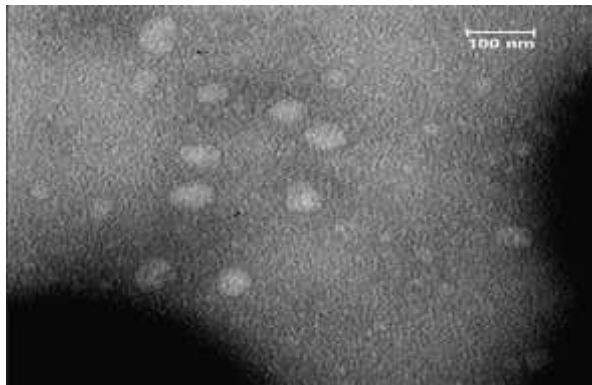
39. Wang K-J, Zhao X, Liu Y-Z, Zeng Q-T, Mao X-B, Li S-N, et al. Circulating MiR-19b-3p, MiR-134-5p and MiR-186-5p are promising novel biomarkers for early diagnosis of acute myocardial infarction. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2016;38(3):1015-29.
40. Li S, Ren J, Xu N, Zhang J, Geng Q, Cao C, et al. MicroRNA-19b functions as potential anti-thrombotic protector in patients with unstable angina by targeting tissue factor. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2014;75:49-57.
41. Margheritis E, Imperiali FG, Cinquetti R, Vollero A, Terova G, Rimoldi S, et al. Amino acid transporter B 0 AT1 (slc6a19) and ancillary protein: impact on function. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*. 2016;468(8):1363-74.
42. Sachdeva J, Dai W, Kloner RA. Functional and histological assessment of an experimental model of Takotsubo's cardiomyopathy. *Journal of the American Heart Association*. 2014;3(3):e000921.
43. Angelini A, Ho S, Anderson R, Davies M, Becker A. A histological study of the atrioventricular junction in hearts with normal and prolapsed leaflets of the mitral valve. *Heart*. 1988;59(6):712-6.
44. Zhong C, Wang K, Liu Y, Lv D, Zheng B, Zhou Q, et al. miR-19b controls cardiac fibroblast proliferation and migration. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2016;20(6):1191-7.
45. Copier CU, León L, Fernández M, Contador D, Calligaris SD. Circulating miR-19b and miR-181b are potential biomarkers for diabetic cardiomyopathy. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-11.
46. Sun L, Zhu W, Zhao P, Wang Q, Fan B, Zhu Y, et al. Long noncoding RNA UCA1 from hypoxia-conditioned hMSC-derived exosomes: a novel molecular target for cardioprotection through miR-873-5p/XIAP axis. *Cell death & disease*. 2020;11(8):1-16.
47. Poole TB. UFAW handbook on the care and management of laboratory animals. *UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals* 1989. p. 933-.
48. Krasnow N, Rolett EL, Yurchak PM, Hood Jr WB, Gorlin R. Isoproterenol and cardiovascular performance. *The American journal of medicine*. 1964;37(4):514-25.
49. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Cold spring harbor protocols*. 2008;2008(5):pdb. prot4986.
50. Collinson P, Stubbs P, Kessler A. Multicentre evaluation of the diagnostic value of cardiac troponin T, CK-MB mass, and myoglobin for assessing patients with suspected acute coronary syndromes in routine clinical practice. *Heart*. 2003;89(3):280-6.
51. Bahavarnia SR, Onori H, Baradaran B. Study of the role of HOTAIR gene on colorectal cancer using Real-time PCR. *Research in Medicine*. 2019;43(1):41-6.
52. Guidelines ECfP, Bax JJ, Baumgartner H, Ceconi C, Dean V, Deaton C, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;60(16):1581-98.
53. Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NSK, Choo A, Chen TS, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem cell research*. 2010;4(3):214-22.
54. Qin J, Xu Q. Functions and application of exosomes. *Acta Pol Pharm*. 2014;71(4):537-43.
55. Strimbu K, Tavel J. What are Biomarkers? *Current Opinion in HIV AIDS*. 2010.
56. Chan D, Ng LL. Biomarkers in acute myocardial infarction. *BMC medicine*. 2010;8(1):1-11.

57. Zeng Y. Principles of micro-RNA production and maturation. *Oncogene*. 2006;25(46):6156-62.
58. de Planell-Saguer M, Rodicio MC. Analytical aspects of microRNA in diagnostics: a review. *Analytica chimica acta*. 2011;699(2):134-52.
59. Chen TS, Lai RC, Lee MM, Choo ABH, Lee CN, Lim SK. Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs. *Nucleic acids research*. 2010;38(1):215-24.
60. Major JL, Bagchi RA, Pires da Silva J. Application of microRNA Database Mining in Biomarker Discovery and Identification of Therapeutic Targets for Complex Disease. *Methods and Protocols*. 2021;4(1):5.
61. Salic K, De Windt LJ. MicroRNAs as biomarkers for myocardial infarction. *Current atherosclerosis reports*. 2012;14(3):193-200.
62. Adamiak M, Sahoo S. Exosomes in myocardial repair: advances and challenges in the development of next-generation therapeutics. *Molecular Therapy*. 2018;26(7):1635-43.
63. Zeringer E, Barta T, Li M, Vlassov AV. Strategies for isolation of exosomes. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2015;2015(4):pdb. top074476.
64. Pekarsky Y, Croce CM. Role of miR-15/16 in CLL. *Cell Death & Differentiation*. 2015;22(1):6-11.
65. Lands A, Luduena F, Buzzo H. Differentiation of receptors responsive to isoproterenol. *Life sciences*. 1967;6(21):2241-9.
66. Sharma A, Khatun Z, Shiras A. Tumor exosomes: cellular postmen of cancer diagnosis and personalized therapy. *Nanomedicine*. 2016;11(4):421-37.
67. Baumjohann D, Ansel KM. MicroRNA-mediated regulation of T helper cell differentiation and plasticity. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13(9):666-78.
68. Cheng L, Sharples RA, Scicluna BJ, Hill AF. Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood. *Journal of extracellular vesicles*. 2014;3(1):23743.
69. Wang H, Li J, Chi H, Zhang F, Zhu X, Cai J, et al. Micro RNA-181c targets Bcl-2 and regulates mitochondrial morphology in myocardial cells. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2015;19(9):2084-97.
70. Baumgartner U, Berger F, Gheinani AH, Burgener SS, Monastyrskaya K, Vassella E. miR-19b enhances proliferation and apoptosis resistance via the EGFR signaling pathway by targeting PP2A and BIM in non-small cell lung cancer. *Molecular cancer*. 2018;17(1):1-15.

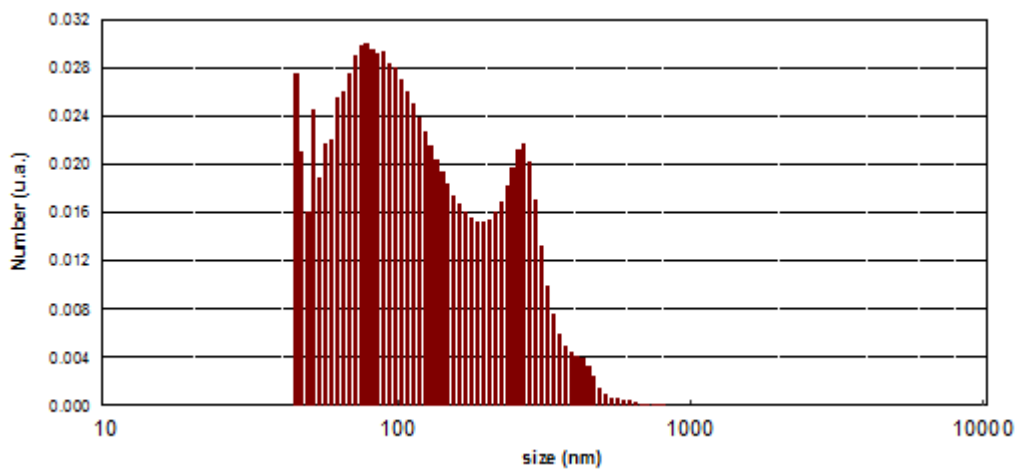
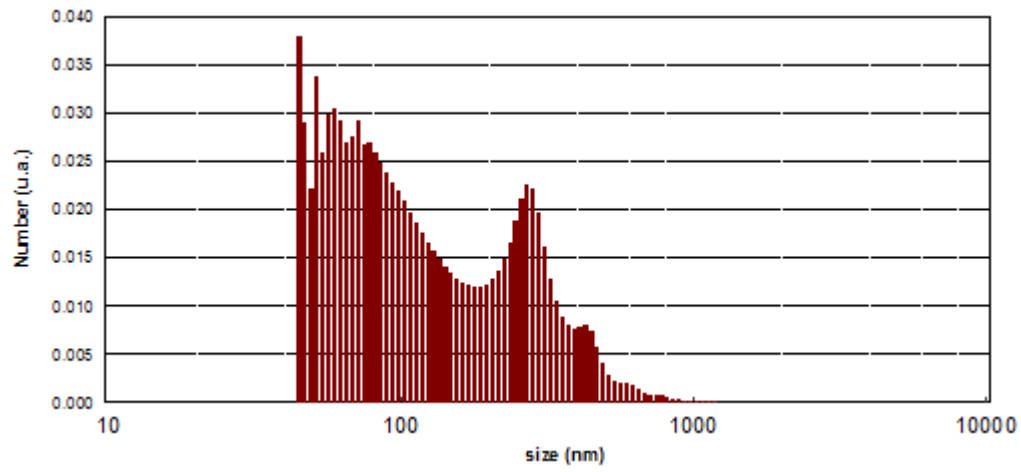
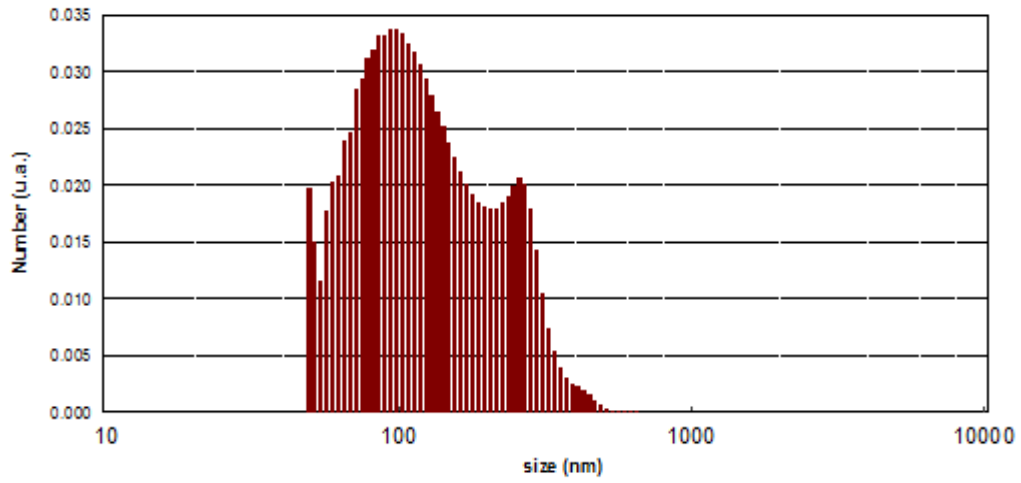


ضمائم

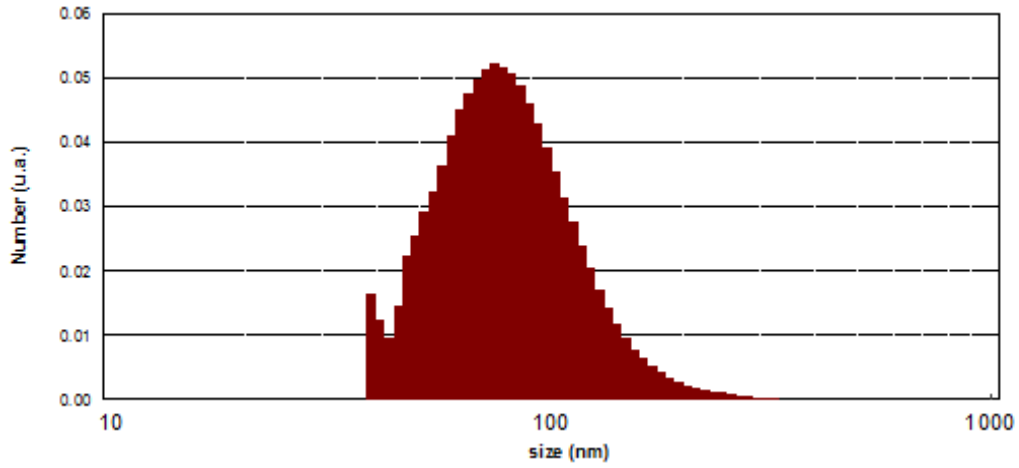
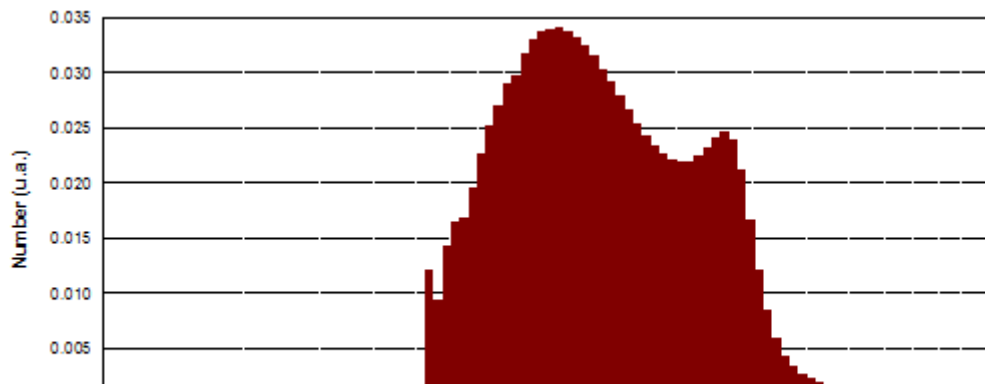
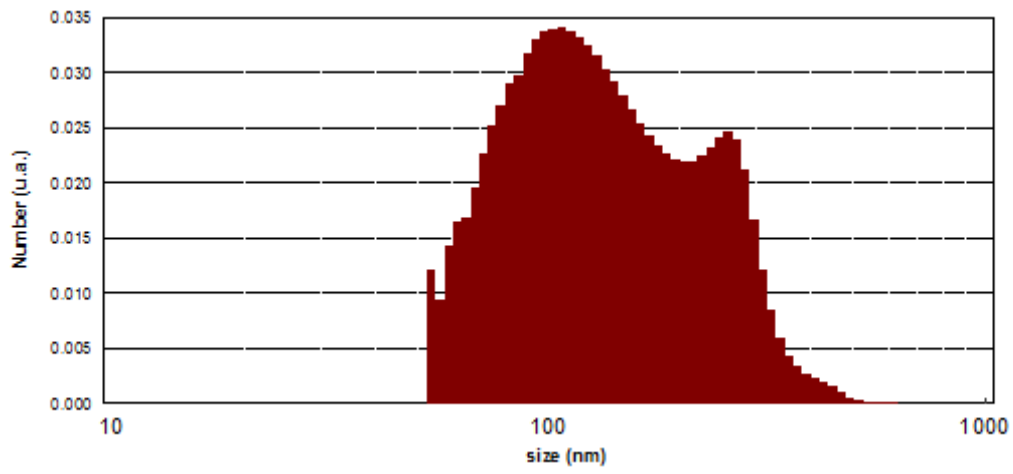
# ضمائم



شکل ۵۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی با درشت‌نمایی متفاوت و از چند نمای مختلف



شکل ۵ض ۲ - سنجش اندازه آگروزوم ها توسط DLS



شکل ۵ ض ۳- سنجش اندازه آگزوزوم ها توسط DLS

# **Evaluation of MiR-19b expression from Exosomes derived from animal samples induced by Myocardial infarction by determination of tissue markers**

By

**Akram Zavar Sahle abadi**

Cardiovascular disease is the most cause of death in all countries. In recent years the replacement of new methods for timely detection with proper prognosis and the use of exosomes as membrane-like particles capable of carrying various compounds has been considered. The use of exosomes containing MicroRNA has fewer risks and more benefits compared to cell therapy. MicroRNA control the function of genes and are abundantly found during the development of the heart. Furthermore, they regulators of critical cardiovascular function and biology and are potential biomarkers for cardiovascular disease. This study aimed to evaluation of MiR-19b expression from Exosomes derived from animal samples before and after, induction of acute myocardial infarction. In this study 20 male Wister rats were given myocardial infarction by isoprenaline injection. Myocardial infarction was confirmed by blood tests using standard enzyme tests (CK-MB and cTnI). Histological comparison was performed using H&E staining on control and stroke sample. Exosomes were then isolated and their size and morphology were examined by dynamic light scattering (DLS) and scanning Electron microscope and size respectively. RNA extraction and after cDNA synthesis. Real-Time PCR steps were performed. scanning electron microscope images confirmed the structure and size measurement by dynamic light scattering analysis also showed a single bell\_ shaped size distribution with a peak of 80 nm. Statistical analysis was performed using software SPSS and t-test. Significant  $p < 0.05$  were considered. The results showed the Real-Time PCR, MiR-19b in the induction myocardial infarction group had a higher expression than the control group ( $p > 0.05$ ). However, in the present project, according to the protocol, the expression MiR19-b was not Significant. It seems, difference in the method of induction of AMI, non-simultaneous use of other MicroRNAs, low study groups, use of exosome derived RNA (in contrast to the direct use of cell RNA), among the reasons for the difference in gene expression in the present study.

The hope goes away due to the high capacity of the use of exosomes and the role of MicroRNAs in regulating genes expression, in the not too distant future of them as tools for the prognosis and treatment of diseases and diagnosis benefited when the cardiovascular disease

**In the name of god**

**Evaluation of MiR-19b expression from Exosomes derived  
from animal samples induced by Myocardial infarction by  
determination of tissue markers**

By

**Akram Zavar Sahle abadi**

**Dissertation/ Thesis**

**Submitted to the School of Graduate Studies in partial  
Fulfilment of the requirements for the degree of M. Sc in  
Cell & Molecule Biology.**

In

**Department of Biology, Kavian Institute of Higher Education,  
Mashhad, Iran  
Islamic Republic of Iran**

*Evaluated and approved by the thesis committee as:*

**Dr. Saedeh Samare Mosavi**



**Department of Biology, Kavian Institute of Higher Education,  
Mashhad, Iran**

**Evaluation of MiR-19b expression from Exosomes derived  
from animal samples induced by Myocardial infarction  
by determination of tissue markers**

D.....

BY:

*Akram Zavar Sahleabadi*

Supervisors:

**Dr. Saeedeh Samareh-moosavi**