بسم الله الرحمن الرحیم

**«فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان‌نامه کارشناسی ارشد»**

**بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد آقای علی رحیمیان مشهدی رشته: خونشناسی آزمایشگاهی و بانک خون گرایش: ----- تقدیم می‌شود. اینجانبان نسخهٔ نهائی این پایـان‌نامـه را از نظـر فـرم و محتوی بررسی و تأیید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجهٔ کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنیم.**

**نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:**

**دکتر مسعود سلیمانی** (استاد راهنما)

**دکتر سعید کاویانی** (استاد مشاور)

**دکتر مهرداد نوروزی نیا** (استاد ناظر)

**دکتر روزبه چگنی** (استاد ناظر)

**دکتر سعید آبرون** (نماینده تحصیلات تکمیلی)

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

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

**ماده 1- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.**

**ماده 2- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجو مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.**

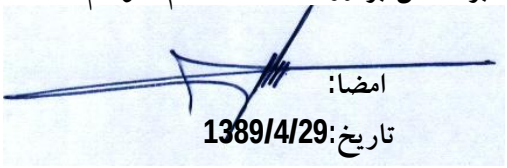
**تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.**

**ماده 3- انتشار کتاب، نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین نامه های مصوب انجام شود.**

**ماده 4- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.**

**ماده 5- این آیین‌نامه در 5 ماده و یک تبصره در تاریخ87/4/1 در شورای پژوهشی و در تاریخ 87/4/23 در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ 87/7/15 شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.**

**«اینجانب علی رحیمیان مشهدی دانشجوی رشته خون شناسی آزمایشگاهی و بانک خون ورودی سال تحصیلی 1386 مقطع کارشناسی ارشد دانشکده علوم پزشکی متعهد می شوم کلِیه نکات مندرج در آئین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آئین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هر گونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله بر اساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هر گونه اعتراض را از خود سلب نمودم»**



# آئین‌نامه چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

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

ماده 1 : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده 2 : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل **پایان‌نامه کارشناسی ارشد** نگارنده در رشته **خونشناسی آزمایشگاهی و بانک خون** است که در سال **1389** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر مسعود سلیمانی** ، مشاوره **دکتر سعید کاویانی** از آن دفاع شده است.

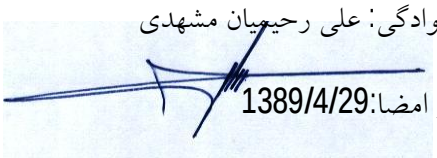
ماده 3 : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده 4 : در صورت عدم رعایت ماده 3، 50% بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده 5 : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده 4 را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده 6 : اینجانب **علی رحیمیان مشهدی** دانشجوی رشته **خونشناسی آزمایشگاهی و بانک خون** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی: علی رحیمیان مشهدی



تاریخ و امضا: 1389/4/29

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

**پایان**نامه دوره کارشناسی ارشد در رشته خون شناسی آزمایشگاهی و بانک خون

***عنوان***

# *بررسی تاثیر miR-424 بر القای تمایز مونوسیتی در سلول های بنیادی خونساز $CD\ 133^+$ جدا شده از خون بند ناف*

نگارش

علی رحیمیان

استاد راهنما

دکتر مسعود سلیمانی

استاد مشاور

دکتر سعید کاویانی

تابستان 1389

# چکیده

میکروRNA ها کلاسی از RNA های کوچک غیر کد کننده هستند و اخیرا نشان داده شده است که نقشی اساسی در فرایند های مهم سلولی از جمله تکامل و تمایز، از طریق تنظیم پس از ترجمه، ایفا می کنند. نقش این عناصر اپی ژنتیک در رده سلولهای خونساز نیز بررسی شده است و شواهد زیادی دال بر دخالت میکرو RNA شماره 424( miR-424) در تمایز مونوسیتی وجود دارد.هدف ما در این مطالعه بررسی تاثیر افزایش بیان miR-424 در سلول های بنیادی خونساز و توانایی این میکروRNA برای تمایز سلولهای یاد شده به سمت سلولهای میلوییدی بود. سلول های بنیادی خونساز که به این منظور انتخاب شدند، سلول های $CD133^{+}$ بودند و برای ایجاد افزایش بیان دائم miR-424 از یک وکتور با ساختار رتروویروسی حاوی توالی پیش ساز miR-424 استفاده شد. پیشرفت فرایند تمایز با استفاده از تکنیک های ردیابی RT-PCR ، quantitative RT-RCR و فلوسایتومتری دنبال شد. در تکنیک فلوسایتومتری مارکر های مونوسیتی مورد بررسی ملکول های CD11b و CD14 بودند. سلول ها حدود یک هفته پس از آلودگی با ویروس خصوصیات مونوسیتی را از خود نشان دادند، یعنی تبدیل به سلولهای چسبنده شدند و افزایش بیان مارکرهای CD11b و CD14 در آنها دیده شد.. نتیجه این که افزایش بیان miR-424 فاکتور موثری در تمایز مونوسیتی می باشد و توانایی هدایت تمایز سلولهای بنیادی خونساز را به سمت رده مونوسیتی دارد.

واژگان کلیدی: میکرو RNA ، miR-424 ، سلول های بنیادی خونساز، تمایز منوسیتی، وکتور رترو ویروسی

فهرست مطالب

فصل اول

**مقدمه و مروری بر مطالعات انجام شده**


1-1.مقدمه ..... 2

2-1.سلول های بنیادی ..... 4

1-2-1.سلول های بنیادی خونساز ..... 4

2-2-1.تکثیر وتمایز ..... 5

3-2-1.ایمونوفنوتایپ ..... 7

3-2-1.ژن های تنظیم کننده حفظ و نگهداری سلول های بنیادی ..... 8

3-1.RNA های دخیل در تنظیم تمایز ..... 10

1-3-1.RNA های غیر کد کننده (ncRNAs)..... 12

1-1-3-1.RNA ناقل (tRNA)..... 13

2-1-3-1.RNA ریبوزومی (rRNA)..... 14

3-1-3-1.RNA هسته ای کوچک (snRNA)..... 15

4-1-3-1.RNA ویروس و فاژ ..... 15

2-3-1.RNA های کوچک مداخله گر (siRNAs)..... 16

3-3-1.میکروRNA ها (miRNAs)..... 17

4-3-1.مقایسه میکرو RNA با RNA کوچک مداخله گر ..... 20

1-3-5.بیوسنتز و مکانیزم عمل میکروRNA ..... 22
1-3-6.روش های شناسایی میکروRNA ها ..... 25
1-3-6-1.کلونینگ مستقیم ..... 26
1-3-6-2. جستجوی ژنوم با استفاده از رایانه ..... 26
1-3-6-3. جستجوی میکروRNA ها با استفاده از تکنیک میکرو اری در گونه های مختلف ..... 27
1-3-6-4. ساخت miRNA به صورت آزمایشگاهی و هدف قرار دادن توالی‌های شناخته شده ژن ..... 27
1-4.بیان میکرو RNA ها و عملکردشان در خونسازی ..... 28
1-5.انتقال ژن ..... 29
1-5-1.وکتورهای رترو ویروسی ..... 30
1-5-2.تولید وکتور رترو ویروسی برای انتقال ژن ..... 31

فصل دوم

**مواد و روش ها**

2-1.مواد، وسایل و دستگاه ها ..... 34
2-1-1.آنزیم ها ..... 34
2-1-1-1.برای انجام PCR و RT-PCR و Real Time PCR ..... 34
2-1-1-2.برای کلون کردن قطعه و تایید وکتور ..... 34
2-1-2.بافرها ..... 34
2-1-3.محیط های کشت ..... 35

2-1-3-1،محیط کشت و ذخیره سازی باکتری..... 35
2-1-3-2،محیط های کشت سلولی ..... 35
2-1-4،آنتی بیوتیک ها ..... 35
2-1-5،پلاسمیدها ..... 35
2-1-6،الیگو نوکلئوتیدها..... 36
2-1-7،کیت ها..... 37
2-1-8،سلول ها ..... 37
2-1-8-1،سلول های یوکاریوتی ..... 37
2-1-8-2،سلول های پروکاریوتی ..... 38
2-1-9،سایر مواد ..... 38
2-1-10،وسایل ..... 38
2-1-11،دستگاه ها..... 38
2-2،روش ها ..... 39
2-2-1،تهیه سازه ژنی مورد نیاز ..... 39
2-2-1-1،تکثیر پلاسمیدها..... 39
2-2-1-2،تهیه باکتری مستعد شده برای واکنش الکتریکی..... 39
2-2-1-3،انتقال الکتریکی پلاسمید ها به باکتری ..... 41
2-2-1-4،تخلیص پلاسمیدها ..... 42
2-2-1-5،الکتروفورز پلاسمید تخلیص شده بر روی ژل آگارز ..... 43

2-2-1-6.ارزیابی کمی میزان پلاسمید ها ..... 43
2-2-1-7.مطالعات بیوانفورماتیک، طراحی کلی و طراحی پرایمر برای تکثیر pri-Mir-424 ..... 43
2-2-1-8.آماده سازی الیگوها ..... 44
2-2-1-9.تهیه DNA برای تکثیر قطعه ..... 44
2-2-1-10.انجام واکنش زنجیره ای پلی مراز(PCR) برای تکثیر قطعه ..... 44
2-2-1-11.ارزیابی محصول PCR قطعه pri-miR-424 ..... 47
2-2-1-12.استخراج DNA از ژل ..... 48
2-2-1-13.هضم آنزیمی قطعه pri-miR-424 و پلاسمید pRETROSUPER ..... 50
2-2-1-14.اتصال آنزیمی قطعه pri-miR-424 و pRETROSUPER ..... 52
2-2-1-15.انتقال به میزبان باکتریایی TG1 ..... 53
2-2-1-16. انجام Colony PCR برای تایید کلونینگ ..... 53
2-2-1-17.انجام هضم آنزیمی برای تایید کلونینگ ..... 55
2-2-1-18.تعیین توالی پلاسمید نوترکیب ..... 56
2-2-2.تولید ویروس نوترکیب با تیتر بالا با استفاده از روش کلسیم فسفات ..... 56
2-2-2-1.آماده سازی سلول ها ..... 56
2-2-2-2.آماده سازی DNA ..... 57
2-2-2-3.آماده سازی محلول واکنش کلسیم فسفات ..... 57
2-2-2-4.تعیین تیتر ویروس های تغلیظ شده ..... 58
2-2-3.جداسازی سلول های $CD133^+$ از خون بند ناف ..... 59

2-2-3-1.جداسازی سلول های تک هسته ای از خون بند ناف ..... 59
2-2-3-2.جداسازی سلول های $CD133^+$ با استفاده از تکنیک جداسازی مغناطیسی سلول (MACS) ... 60
2-2-4.تکثیر سلول های بنیادی خونساز $CD133^+$ ..... 60
2-2-5.تایید فنوتیپ سلول های بنیادی خونساز ..... 61
2-2-6.انتقال ژن miR-424 به سلول های بنیادی خونساز ..... 61
2-2-7.بررسی اثرات انتقال ژن miR-424 به سلول های بنیادی خونساز ..... 61
2-2-7-1.استخراج Total RNA..... 62
2-2-7-2.واکنش پلیمریزاسیون معکوس(RT) ..... 63
2-2-7-3.ساخت cDNA با استفاده از آنزیم Mo-MLV..... 65
2-2-7-4.انجام Real Time-PCR برای بررسی بیان miR-424 ..... 66
2-2-7-5.انجام Real Time-PCR برای بررسی کمی بیان مارکرهای CD11b و CD14..... 67
2-2-7-6.انجام فلوسایتومتری برای بررسی مارکرهای CD11b و CD14 ..... 68

فصل سوم

## نتایج و یافته ها

3-1.نتایج مربوط به تهیه سازه های مورد نیاز ..... 70
3-1-1.نتیجه استخراج پلاسمید pRETROSUPER از کاغذ ..... 70
3-1-2.نتیجه ژل الکتروفورز پلاسمید های تخلیص شده پس از الکتروپوراسیون و تکثیر..... 70
3-1-3.نتیجه واکنش PCR برای تکثیر قطعه pri-miR-424..... 71

3-1-4،نتیجه ژل الکتروفورز قطعه pri-miR-424 برای استخراج از ژل ..... 72
3-1-5،نتیجه هضم آنزیمی قطعه و وکتور ..... 73
3-1-6،نتیجه colony PCR برای تایید وکتور..... 74
3-1-7،نتیجه واکنش PCR روی پلاسمید های استخراج شده از کلونی های مثبت ..... 75
3-1-8،نتیجه هضم آنزیمی روی پلاسمید های استخراج شده برای تایید وکتور ..... 76
3-1-9،نتیجه تعیین توالی وکتور ساخته شده و بلاست توالی به دست آمده..... 77
3-2،نتایج مربوط به تولید ویروس..... 79
3-2-1،نتایج مربوط به تعیین تیتر ویروس..... 79
3-3،نتایج مربوط به آزمایش های سلولی ..... 80
3-3-1،نتیجه آزمون فلوسایتومتری برای تایید فنوتیپ سلول های $CD133^+$..... 80
3-3-2،نتایج مربوط به انتقال ژن به سلول های U937 توسط وکتور رترو ویروسی..... 80
3-3-2-1،تغییرات مورفولوژیک ..... 81
3-3-2-2. نتیجه واکنش RT-PCR برای مارکرهای CD11b و CD14 ..... 81
3-3-2-3،نتایج آزمون فلوسایتومتری برای سنجش مارکرهای CD11b و CD14..... 82
3-3-3،نتایج مربوط به انتقال ژن به سلول های بنیادی $CD133^+$ توسط وکتور رتروویروسی..... 84
3-3-3-1،تغییرات مورفولوژیک ..... 84
3-3-3-2،نتیجه واکنش Real Time-PCR برای بررسی تغییرات بیان miR-4242..... 85
3-3-3-3،نتیجه واکنش Real Time-PCR برای سنجش تغییرات بیان مارکرهای CD11b و CD14..... 86
3-3-3-4،نتایج آزمون فلوسایتومتری برای سنجش مارکرهای CD11b و CD14..... 88

فصل چهارم

**بحث، نتیجه گیری و پیشنهاد ها**

4-1بحث و نتیجه گیری ..... 90
فهرست منابع و ماخذ ..... 97
چکیده انگلیسی.....102

فهرست جدول ها

جدول 2-1: مقادیر مورد استفاده جهت انجام PCR قطعه PRI-MIR-424 ..... 46

جدول 2-2: چرخه دمایی PCR قطعه PRI-MIR-424 ..... 47

جدول 2-3: مقادیر مورد استفاده جهت هضم آنزیمی پلاسمید PRETRO..... 51

جدول 2-4 : مقادیر مورد استفاده جهت هضم آنزیمی قطعه PRI-MIR-424 ..... 51

جدول2-5 : مقادیر مورد استفاده جهت اتصال آنزیمی قطعه PRI-MIR-424 به وکتور PRETRO..... 52

جدول2-6 : مقادیر مورد استفاده جهت انجام COLONY PCR ..... 54

جدول2-7 : چرخه دمایی انجام COLONY PCR ..... 55

جدول2-8 : مقادیر مورد استفاده جهت انجام REAL TIME- PCR..... 67

جدول2-9 : چرخه دمایی انجام REAL TIME-PCR ..... 68

فهرست شکل ها

شکل1-1تکثیر و تمایز در سلول های بنیادی خونساز ..... 6

شکل1-2فاکتورهای رونویسی دخیل در تمایز رده های خونی ..... 10

شکل1-3مکانیزم عمل RNA های کوچک ..... 12

شکل 1-4مکانیزم عمل siRNAs ..... 17

شکل1-5بیوسنتز و مکانیزم عمل miRNAs ..... 20

شکل 1-6مکانیزم های مهاری miRNAs ..... 24

شکل1-7چرخه زندگی رتروویروس ..... 32

شکل 2-1 نقشه وکتورهای پلاسمیدی ..... 36

شکل 3-1الکتروفورز وکتور خالی ..... 71

شکل 3-2محصول PCR تکثیر فطعه pri-miR-424 ..... 71

شکل 3-3الکتروفورز قطعه ژنی تکثیر یافته ..... 72

شکل 3-4محصول هضم آنزیمی وکتور ..... 73

شکل 3-5محصول کلونی PCR ..... 74

شکل 3-6محصول PCR برای تایید کلونینگ ..... 75

شکل 3-7محصول هضم آنزیمی پلاسمیدهای نو ترکیب ..... 76

شکل 3-8نتیجه تعیین توالی پلاسمیدهای نوترکیب ..... 77

شکل 3-9نتیجه بلاست توالی پلاسمید نوترکیب ..... 78

شکل 3-10نتایج فلوسایتومتری برای تایید مارکر CD133..... 80

شکل 3-11تغییرات مورفولوژیک مربوط به سلول های U937 ..... 81

شکل 3-12نتیجه RT-PCR برای مارکرهای منوسیتی در سلول های U937 ..... 82

شکل 3-13نتایج فلوسایتومتری مارکرهای منوسیتی در U937 ..... 83

شکل 3-14تغییرات مورفولوژیک سلول های $CD133^{+}$..... 84

شکل 3-14نتیجه بررسی بیان MIR-424 ..... 85

شکل 3-15نتیجه بررسی کمی بیان MIR-424 ..... 85

شکل 3-16نمودار خام مربوط به سنجش مارکرهای منوسیتی ..... 86

شکل 3-17نمودار مربوط به بررسی کمی مارکرهای منوسیتی ..... 86

شکل 3-18تغییر بیان مارکرهای منوسیتی پس از 7 روز ..... 87

شکل 3-19نتایج فلوسایتومتری مربوط به مارکر CD11B..... 88

شکل 3-20نتایج فلوسایتومتری مربوط به مارکرهای CD14 و CD64 ..... 88

# فصل اول

# مقدمه و

# مروری بر مطالعات انجام شده

## 1-1.مقدمه

از خصوصیات بارز سلولهای لوسمیک توقف تکامل در مراحل اولیه و عدم توانایی در تمایز به سلولهای بالغ با عملکرد صحیح می باشد. دستاوردهای علمی به دست آمده طی دهه های 70 و 80 منجر به شکل گرفتن استراتژی ای نو به عنوان جایگزینی برای درمان های سایتوتوکسیک شد، که شامل القای تمایز و در نهایت بروز آپوپتوز در سلولهای بدخیم بود. این روش به طور نظری می توانست عوارض جانبی ناخواسته ناشی از داروهای سایتوتوکسیک شیمی درمانی را محدود ساخته و از آن مهم تر موجب بهبود میزان درمان گردد[1]. گزارشات اولیه در این زمینه برخاسته از مطالعاتی بود که در زمینه قابلیت القای تمایز دی متیل سولفوکساید (DMSO) در اریتروپوئز[2] ، یافتن عوامل کنترل کننده تمایز در لوسمی میلوییدی[3] و اولین شواهد توانایی رتینوییک اسید در القای تمایز انجام شده بود[4, 5]. در آن زمان مدل های نامیرای سلولی برای تمایز در *شرایط آزمایشگاهی* تعریف شده بود و موادی همچون تلوسیدین ها، سایتوکاین ها، رتینوییدها و متابولیت های ویتامین D توانایی زیادی برای القای تمایز رده های سلولی نظیر HL-60 ، KG-1 ، ML-3 وK562 از خود نشان دادند که موجب افزایش امید به درمان سرطان ها از طریق غلبه بر توقف تمایزی به وجود آمده شد[1].

اساسا توانایی بالقوه القای تمایز در بهبود میزان درمان لوسمی می باشد. برای مثال می توان به استفاده از (ATRA)[1] در درمان هدفمند لوسمی پرومیلوستیک حاد اشاره کرد. یکی از قابل توجه ترین نتایج به دست آمده در تجربیات اولیه، تمایز سلولهای HL-60 با استفاده از ATRA بود که 90% سلولها به مرحله نهایی تمایز رسیدند [$10^{-6}$ M ATRA] و توقف تمایزی موجود را از سر گذراندند[3]. در اوایل دهه 80 اولین بیمار مبتلا به لوسمی پرومیلوستیک حاد با ATRA تحت درمان قرار گرفت و بهبودی قابل توجهی با درمان جدید کسب کرد[6, 7].

در سه دهه گذشته شاهد پیشرفت همه جانبه روش های ملکولی در مطالعه بدخیمی های گوناگون بوده ایم. خصوصیات اپی ژنتیک غیر عادی که در بدخیمی ها وجود دارند توسط تکنیک هایی از قبیل سنجش متیلاسیون جزایر CpG در کل ژنوم[2] و سنجش بروز تغییرات در پروتئین های هیستون[3] قابل شناسایی می باشند[8]. آنالیز تغییرات تعداد کپی های DNA در کل ژنوم و از دست دادن شرایط هتروزیگوت[4] با استفاده از تکنیک های سنجش پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی با فشردگی بالا[5]، هیبریداسیون مقایسه ای ژنوم[6] و تعیین توالی کل ژنوم[7] انجام می شود که استفاده از این تکنیک ها موجب مشخص شدن جهش های موجود در لوسمی های میلوییدی حاد که از نظر سیتوژنتیک نرمال هستند، شده است[9]. عملکرد ژن هایی که با این روش های قدرتمند غربالگری شناسایی شده اند نیز قابل آنالیز می باشد. عملکرد این ژن ها در مدل های موشی knockout ، با مکانیزم مهاری RNAi، در سیستم های رترو ویروسی و لنتی ویروسی برای افزایش بیان و توسط بسیاری روش های اختصاصی و نوین دیگر قابل بررسی می باشند[1]. اما به طور ویژه در درمان با القای تمایز ، از جالبترین پیشرفت های اخیر کشف نقش میکرو RNA ها در فرآیند های سلولی از جمله القای تمایز در رده های مختلف سلولی و سلولهای بنیادی خونساز می باشد که در ادامه راجع به آن بیشتر بحث می شود.

[1] All-trance retinoic acid
[2] Whole genome CpG metylation array
[3] Histon modification array
[4] Heterozygosity
[5] High density single nucleotide polymorphism array
[6] Comparative genome hybridization
[7] Whole genome sequencing

## 2-1.سلول های بنیادی

### 1-2-1.سلول های بنیادی خونساز

خصوصیات برجسته سلول بنیادی خونساز در سال 1963 توسط سیمینو ویتچ و همکاران معین شد[10]. در مدل موشی، این گروه مدرکی دال بر حضور سلول بنیادی خونساز در مغز استخوان ارائه دادند. این سلول بنیادی خونساز می‌توانست سیستم خونسازی را نوسازی کند و از این رو حیوان اشعه دیده را از مرگ نجات بدهد. پیوندهای متوالی نشان داد که سلول بنیادی خونساز توانایی خود تجدیدپذیری دارد.

بر پایه این آزمایشها، سلول بنیادی خونساز به‌عنوان سلولهایی با توانایی تعادل خود تجدیدپذیری در مقابل تمایز، تعریف می‌شوند. آنها خاصیت چند قوه‌ای دارند (یعنی یک سلول بنیادی می‌تواند دست کم 10-8 رده متمایز از سلولهای بالغ را بوجود بیاورد)، آنها ظرفیت تکثیری بالایی دارند و در یک حالت پیوسته و یکنواخت سیستم خونسازی بالغین را به آرامی بوجود می‌آورند[10].

امروزه سلول بنیادی به عنوان سلولی با توانایی خودسازی و تکثیر به همراه توانایی تمایز به تمام رده های خونساز شناسایی می شود. با بررسیهای انجام شده برروی مغز استخوان مشخص شد که سلولهای اولیه ای در این بافت وجود دارند که قادر به ایجاد کلونی های خونساز در طحال موش اشعه دیده تا حد مرگ می باشند[11]. بر اساس تحقیقات انجام شده مشخص گردید که اگر بیماران با نارسایی مغز استخوان یا بدخیمی در حدی اشعه ببینند که موجب حذف سلولهای بدخیم شود، تزریق سلولهای سالم می تواند سبب نجات جان آنان شود. بدین ترتیب استفاده از سلولهای بنیادی خونساز در پیوند مورد توجه قرار گرفت.

بر اساس مطالعات آزمایشگاهی و بالینی همه سلولهای خونساز از یک سلول بنیادی اولیه منشا می گیرند. بر این اساس سلولهای سیستم خونساز را می توان به 3 گروه تقسیم کرد. گروه اول شامل سلول بنیادی خونساز