اول دفتر به نام ایزد دانا

صانع پروردگار حیّ توانا

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده مهندسی شیمی

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

خانم مهسا محمدطاهری رساله ۲۲ واحدی خود را با عنوان نشانه گذاری و ردیابی سلول های بنیادی با استفاده از سامانه های کلوئیدی حاوی نانو ذرات مغناطیسی در تاریخ ۱۳۹۰/۱۲/۲۰ ارائه کردند.

اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده، پذیرش آنرا برای اخذ درجه دکتری بیوتکنولوژی پیشنهاد می کنند.

عضو هیات داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضا
استاد راهنما	دکتر ابراهیم واشقانی فراهانی	استاد	
استاد مشاور	دکتر سید عباس شجاع السادات	استاد	
استاد مشاور	دکتر تقی طریحی	دانشیار	
استاد ناظر	دکتر سید محمد موسوی	استادیار	
استاد ناظر	دکتر سمیره هاشمی نجف آبادی	استادیار	
استاد ناظر	دکتر فرید عابدین درکوش	استادیار	
استاد ناظر	دکتر مسعود سلیمانی	دانشیار	
مدیر گروه (یا نماینده گروه تخصصی)	دکتر سمیره هاشمی نجف آبادی	استادیار	
استاد راهنمای دوم	دکتر حسین حسین خانی	دانشیار	Hosseinkhani

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی

دانشگاه تربیت مدرس

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

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

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی 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 ۳- انتشار کتاب و یا 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 آئین‌نامه-های مصوب انجام شود.

ماده ٤- 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 ٥- این آیین‌نامه در ٥ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/٤/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/٤/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **مهسا محمدطاهری** دانشجوی رشته **مهندسی شیمی- بیوتکنولوژی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸٦** مقطع **دکتری** دانشکده **مهندسی شیمی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین 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 آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

امضا مهسا محمدطاهری

تاریخ ۹۰/۱۲/۲۱

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

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

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

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

" کتاب حاضر، حاصل **رساله دکتری** نگارنده در رشته **مهندسی شیمی- بیوتکنولوژی** است که در سال **۱۳۹۰** در دانشکده مهندسی شیمی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکترابراهیم واشقانی‌فراهانی و دکتر حسین حسین‌خانی** ، مشاوره **دکترسیدعباس شجاع‌الساداتی و دکترتقی‌طریحی** از آن دفاع شده است.

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

ماده ٤ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ٥ : 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 ٤ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ٦ : اینجانب **مهسا محمدطاهری** دانشجوی رشته **مهندسی شیمی- بیوتکنولوژی** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی مهسا محمدطاهری

تاریخ و مضا

۹۰/۱۲/۲۱

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده مهندسی شیمی

رساله دکتری رشته مهندسی شیمی - بیوتکنولوژی

نشانه‌گذاری و ردیابی سلول‌های بنیادی جنینی با استفاده از سامانه‌های کلوییدی حاوی نانوذرات مغناطیسی آهن

مهسا محمدطاهری

استادان راهنما
دکتر ابراهیم واشقانی‌فراهانی
دکتر حسین حسین‌خانی

استادان مشاور
دکترسیدعباس شجاع‌الساداتی
دکتر تقی طریحی

اسفند- ۱۳۹۰

تقدیم به

همه بچه‌های ایرانی

به این امید که میراث نسل من برای نسل تو خانه‌ای آرام باشد.

تشکر و قدردانی

سپاس و ستایش، مخصوص خداوندی است که انسان را آفرید و او را به فضیلت تعلیم و تعلم بر دیگر مخلوقات خود برتری بخشید.

خدای من! تو را حمد و سپاس می‌گویم که همواره یاری رسانم بوده‌ای و دریچه‌های علم و معرفت را فراروی گشوده‌ای.

تشکر ویژه از جناب آقای دکتر ابراهیم واشقانی‌فراهانی استاد راهنمای گرامی که در طول دوران انجام این رساله با حسن اخلاق همیشگی‌شان در به سر انجام رساندن آن، کمک شایانی کردند.

تشکر می‌نمایم از جناب آقای دکتر حسین حسین‌خانی استاد راهنمای محترم که همیشه از راهنمایی‌های ایشان بهره برده‌ام و

تشکر می‌نمایم از جناب آقای دکتر سیدعباس شجاع‌الساداتی که مشاورت این پروژه را به عهده داشتند و من در طول تحصیل در این دانشگاه همواره از حمایت‌های ایشان بهره‌مند بوده‌ام.

تشکر ویژه از جناب آقای دکتر مسعود سلیمانی، استاد محترم به خاطر تمامی کمک‌ها و راهنمایی‌های ارزشمندشان که در انجام این رساله راهگشای من بوده است.

تشکر و قدردانی بی‌دریغ از پدر و مادر عزیزم که در تمامی مراحل زندگی تا به امروز، مشوق و پشتوانه‌ام بوده‌اند.

و سپاس از همسر عزیزم، که همراه همیشگی‌ام است.

چکیده

تحقیق حاضر به منظور توسعه سامانه نوین مغناطیسی بر پایه نانوذرات مغناطیسی آهن و پلیمر دکستران–اسپرمین برای نشانه‌گذاری و ردیابی بلند مدت سلول‌های بنیادی جنینی صورت گرفته است. در این تحقیق، ابتدا ترکیب پلیمری دکستران–اسپرمین تهیه شد و سپس نانوحامل‌های مغناطیسی به روش ژل شدن یونی با افزودن محلول تری پلی فسفات سدیم به محلول پلیمری حاوی سوسپانسیون نانوذرات مغناطیسی آهن تهیه شد. با توجه به نتایج مطالعات قبلی و انجام آزمایش‌های مقدماتی، عوامل موثر بر تولید نانوحامل‌های مغناطیسی آهن مشخص شد و محدوده‌های مناسب از عوامل فوق (که منجر به تولید نانوذره با اندازه کوچکتر از ۲۰۰ نانومتر می‌گردد) با استفاده از طراحی آزمایش تاگوچی L16 به دست آمد. بر اساس نتایج به دست آمده در طراحی آزمایش تاگوچی، تمام فاکتورهای در نظر گرفته شده که شامل غلظت pH، غلظت پلیمر دکستران-اسپرمین (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، نسبت غلظت سدیم تری پلی فسفات (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به غلظت دکستران- اسپرمین (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، نسبت غلظت نانوذرات مغناطیسی آهن (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به غلظت دکستران-اسپرمین (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و سرعت اضافه کردن سدیم تری پلی فسفات به محلول پلیمری (میلی‌لیتر بر دقیقه) است، به عنوان فاکتورهای مهم در تهیه نانوحامل‌های مغناطیسی در نظر گرفته شد و برای انجام بهینه‌سازی از روش پاسخ سطح (مرکب مرکزی) استفاده شد. آزمون‌های لازم برای اندازه‌گیری اندازه متوسط هیدرودینامیکی نانوحامل‌ها، مقدار آهن بارگذاری شده در این حامل‌ها و بار سطحی آن‌ها و همچنین تصویربرداری TEM برای مطالعه و بررسی چگونگی کپسوله شدن و توزیع نانوذرات مغناطیسی آهن در حامل‌های دکستران-اسپرمین و مطالعات MRI به منظور بررسی خواص تصویربرداری سامانه‌های تهیه شده انجام گرفت. رخ‌نمون رهایش نانوذرات مغناطیسی آهن از نانوحامل‌های مغناطیسی دکستران-اسپرمین در بافر استات در دمای ۳۷ درجه سلسیوس طی ۲۸ روز رهایش کند نانوذرات مغناطیسی آهن را نشان داد. سلول‌های بنیادی جنینی با استفاده از غلظت‌های مختلف نانوحامل‌های مغناطیسی نشانه‌گذاری شده و مقدار بهینه برای نشانه‌گذاری با توجه به تعداد کلونی‌های نشانه‌گذاری شده و سمی نبودن آن به دست آمد. مقدار ترآلودگی به دست آمده بدون استفاده از عوامل تراآلوگی در غلظت بهینه (۲۰μg/ml آهن) حدود ۱۰۰٪ به‌دست آمد. اثر نشانه‌گذاری بر توانایی تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های عصبی در غلظت بهینه (۲۰μg/ml آهن) مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که نشانه‌گذاری هیچ تاثیر منفی بر تمایز این سلول‌ها ندارد. به منظور بررسی امکان ردیابی طولانی مدت سلول‌های بنیادی جنینی نشانه‌گذاری شده در آزمایش‌های درون‌تنی، 10^6 سلول نشانه‌گذاری شده با نانوحامل‌های مغناطیسی آهن (۲۰ μg/ml آهن) به پهلوی موش تزریق شد و برای مدت ۶ هفته با استفاده از تصویربرداری MRI مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان داد که نانوحامل مغناطیسی نوین توسعه یافته می‌تواند برای مدت‌های طولانی‌تری در سلول باقی بماند و امکان بررسی آن را فراهم سازد.

کلمات کلیدی: نانوذرات مغناطیسی، دکستران-اسپرمین، بهینه‌سازی، MRI، ترآلودگی، تمایز عصبی، سلول‌های بنیادی جنینی

فهرست

عنوان **صفحه**

۱- مقدمه

۱-۱- بیان مسئله و سؤال اصلی پژوهش ۱

۱-۲- اهداف پژوهش ۷

۱-۳- فرضیات پژوهش ۷

۱-۴- چگونگی تنظیم رساله ۷

۲- مروری بر مطالعات گذشته

۲-۱- سلول‌های بنیادی جنینی ۹

۲-۱-۱- تاریخچه تولید سلول‌های بنیادی جنینی ۹

۲-۱-۲- ویژگی‌های سلول بنیادی جنینی ۱۱

۲-۱-۳- کاربرد سلول‌های بنیادی جنینی ۱۳

۲-۲- تصویربرداری از سلول‌ها برای سلول درمانی ۱۳

۲-۲-۱- روش‌های تصویربرداری برای ردیابی سلول‌ها ۱۴

۲-۲-۱-۱- روش‌های سطحی تصویربرداری بافت ۱۵

۲-۲-۱-۲- روش‌های عمقی تصویربرداری ۱۵

۲-۲-۲- تصویربرداری تشدید مغناطیسی ۱۶

۲-۳- کاربرد نانوذرات در تصویر برداری و ردیابی سلول‌ها ۲۴

۲-۴- معیارهای طراحی نانوذرات برای ردیابی سلول‌ها ۲۵

۲-۴-۱- آماده‌سازی نانوذرات ۲۵

۲-۴-۲- اصلاح سطح و پایداری نانوذرات ۲۷

۲-۴-۲-۱- تعویض لیگاند با لیگاندهای قابل پخش در آب ۲۷

۲-۴-۲-۲- پوسته‌های زیست سازگار ۲۸

۲-۴-۳- زیست سازگاری و سمیت نانوذرات ۲۹

۲-۴-۳-۱- ارزیابی سمیت در شرایط آزمایشگاهی ۳۰

۲-۵- نانوذرات برای نشان‌دار کردن سلول‌های بنیادی ۳۲
۲-۵-۱- نانوذرات سوپرمغناطیسی آهن جهت نشان‌دار کردن سلول‌های بنیادی ۳۳
۲-۵-۲- مزایای استفاده از نانوذرات سوپرمغناطیسی آهن در نشانه‌گذاری سلول‌های بنیادی..... ۳۷
۲-۵-۳- سمیت نانوذرات سوپرمغناطیسی آهن ۳۸
۲-۵-۴- نشان‌دار کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۴۰
۲-۵-۴-۱- عوامل حاجب MRI جهت نشان‌دار کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۴۱
۲-۵-۴-۲- دست‌کاری سطحی عوامل آشکارساز MRI برای نشان‌دار کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۴۳
۲-۵-۵- نشانه‌گذاری سلول‌های بنیادی عصبی ۴۸
۲-۵-۶- نشانه‌گذاری سلول‌های بنیادی جنینی ۵۱
۲-۶- ردیابی درون‌تنی سلول‌های بنیادی ۵۱
۲-۶-۱- مطالعات حیوانی ۵۱
۲-۶-۲- مطالعات انسانی ۵۵
۳- مواد و روش‌های آزمایشگاهی ۵۸
۳-۱- مواد مورد استفاده ۵۸
۳-۲- تجهیزات و دستگاه‌ها ۵۹
۳-۳- ساخت پلیمر دکستران – اسپرمین ۶۰
۳-۳-۱- آزمون TNBS ۶۲
۳-۳-۲- آزمون تشدید هسته مغناطیسی ۶۳
۳-۴- تهیه نانوحامل‌های مغناطیسی دکستران – اسپرمین ۶۳
۳-۵- بهینه‌سازی پارامترهای موثر بر تولید نانوحامل‌های مغناطیسی دکستران – اسپرمین ۶۴
۳-۶- مطالعه خواص نانوحامل‌های مغناطیسی دکستران – اسپرمین ۶۶
۳-۶-۱- آزمون اندازه‌گیری متوسط اندازه ذرات و مقدار بار ذرات ۶۶
۳-۶-۲- تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی عبوری ۶۷
۳-۶-۳- آزمون جذب اتمی ۶۷
۳-۶-۴- مطالعه رهایش نانوذرات مغناطیسی آهن از نانوحامل‌های مغناطیسی دکستران- اسپرمین ۶۸

۳-۶-۵- بررسی خاصیت مغناطیسی نانوحامل‌های مغناطیسی دکستران- اسپرمین ۶۹
۳-۶-۶- تصویربرداری MRI ۷۰
۳-۶-۶-۱- آماده‌سازی فانتوم‌های ژل آگار ۷۰
۳-۶-۶-۲- تصویربرداری از فانتوم‌های آماده شده ۷۰
۳-۷- مطالعات سلولی ۷۱
۳-۷-۱- کشت سلول بنیادی ۷۱
۳-۷-۱-۱- ژلاتینه کردن فلاسک‌ها ۷۱
۳-۷-۱-۲- گرم کردن سلول‌های یخ زده ۷۲
۳-۷-۱-۳- پاساژ سلول‌های بنیادی ۷۲
۳-۷-۲- انجام آزمایش‌های تراآلودگی ۷۳
۳-۷-۲-۱- آزمون رنگ آمیزی آهن ۷۳
۳-۷-۲-۲- تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی عبوری ۷۴
۳-۷-۳- بررسی سمیت ۷۷
۳-۷-۳-۱- آزمون MTT ۷۸
۳-۷-۳-۲- آزمون تکثیر سلولی ۷۹
۳-۷-۴- بررسی مقدار آهن موجود در سلول‌ها و تأثیر زمان انکوباسیون بر آن ۷۹
۳-۷-۵- انجام آزمایش تمایز و بررسی آن با استفاده از دستگاه RT-PCR ۸۰
۳-۷-۵-۱- تمایز سلول‌های بنیادی جنینی موش به سلول‌های عصبی ۸۰
۳-۷-۵-۲- استخراج RNA ۸۱
۳-۷-۵-۳- نسخه‌برداری معکوس ۸۱
۳-۷-۵-۴ واکنش PCR ۸۲
۳-۷-۶- مطالعات MRI سلول‌های نشانه‌گذاری شده ۸۴
۳-۷-۶-۱- آماده‌سازی فانتوم‌های ژل آگار ۸۴
۳-۷-۶-۲- تصویربرداری از فانتوم‌های آماده شده ۸۴
۳-۸- مطالعات درون‌تنی ۸۵
۳-۸-۱- کشت سلول‌های بنیادی جنینی موشی ۸۵

۳-۸-۲- نشانه‌گذاری سلول‌های بنیادی ۸۶
۳-۸-۳- تزریق به موش ۸۶
۳-۸-۴- مطالعات MRI ۸۷
۴- نتایج و بحث
۴-۱- سنتز پلیمر دکستران – اسپرمین ۸۸
۴-۱-۱- آزمون TNBS ۸۸
۴-۱-۲- آزمون NMR ۸۹
۴-۲- بهینه‌سازی پارامترهای موثر بر تولید نانوحامل‌های مغناطیسی دکستران- اسپرمین ۹۰
۴-۳- مطالعه خواص نانوحامل‌های مغناطیسی دکستران – اسپرمین در شرایط بهینه ۱۰۰
۴-۴- مطالعه رهایش نانوذرات مغناطیسی آهن از نانوحامل‌های مغناطیسی دکستران- اسپرمین . ۱۰۱
۴-۵- بررسی خاصیت مغناطیسی نانوحامل‌های مغناطیسی دکستران- اسپرمین ۱۰۲
۴-۶- تصویربرداری MRI و بررسی خواص MRI نانوحامل‌های مغناطیسی آهن ۱۰۳
۴-۷- نشانه‌گذاری سلول‌های بنیادی ۱۰۹
۴-۸- آزمون سمیت و تکثیر سلولی ۱۱۲
۴-۹- اندازه‌گیری مقدار آهن درون سلولی ۱۱۴
۴-۱۰- بررسی تأثیر نشانه‌گذاری سلول‌های بنیادی جنینی در تمایز به سلول‌های عصبی ۱۱۶
۴-۱۱- مطالعات MRI فانتوم‌های سلولی ۱۱۷
۵- نتیجه‌گیری و پیشنهادها
۵-۱- نتیجه‌گیری ۱۲۳
۵-۲- مشارکت در تولید دانش ۱۲۵
۵-۳- پیشنهادها ۱۲۶
مراجع ۱۲۶
پیوست الف ۱۳۹
واژه نامه انگلیسی به فارسی ۱۴۳
واژه‌نامه فارسی به انگلیسی ۱۴۴

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۲-۱- الف- تعداد مقاله‌های چاپ شده در مورد نشانه‌گذاری سلول‌های بنیادی جنینی با انواع مختلف نانوذرات در مقایسه با سلول‌های نشانه‌گذاری شده با نانوذرات سوپرمغناطیسی آهن ۳۴

شکل ۲-۱- ب- تعداد مقاله‌های چاپ شده (٪) برای کاربرد نانوذرات سوپرمغناطیسی آهن در حوزه‌های مختلف پزشکی..... ۳۴

شکل ۳-۱- شماتیک سنتز پلیمر دکستران- اسپرمین..... ۶۱

شکل ۴-۱- منحنی استاندارد برای محاسبه گروه‌های آمینی..... ۸۸

شکل ۴-۲- منحنی H-NMR پلیمر دکستران-اسپرمین..... ۸۹

شکل ۴-۳- مقادیر پیش‌بینی شده بر حسب مقدار واقعی..... ۹۴

شکل ۴-۴-A) برهمکنش بین pH و غلظت دکستران- اسپرمین..... ۹۶

شکل ۴-۴-B) برهمکنش بین pH و نسبت غلظت سدیم تری پلی فسفات به غلظت دکستران- اسپرمین ۹۶

شکل ۴-۴-C) برهمکنش بین pH و سرعت اضافه کردن تری پلی فسفات به محلول پلیمر ۹۶

شکل ۴-۴-D) برهمکنش نسبت غلظت سدیم تری پلی فسفات به غلظت دکستران- اسپرمین و سرعت اضافه کردن تری پلی فسفات به محلول پلیمر ۹۶

شکل ۴-۴-E) برهمکنش بین غلظت دکستران- اسپرمین و سرعت اضافه کردن تری پلی فسفات به محلول پلیمر..... ۹۶

شکل ۴-۵-A) برهمکنش بین pH و غلظت دکستران- اسپرمین..... ۹۸

شکل ۴-۵-B) برهمکنش بین pH و نسبت غلظت سدیم تری پلی فسفات به غلظت دکستران- اسپرمین ۹۸

شکل ۴-۵-C) برهمکنش بین pH و سرعت اضافه کردن تری پلی فسفات به محلول پلیمر ۹۸

شکل ۴-۵-D) برهمکنش نسبت غلظت سدیم تری پلی فسفات به غلظت دکستران- اسپرمین و سرعت اضافه کردن تری پلی فسفات به محلول پلیمر ۹۸

شکل ۴-۵-E) برهمکنش بین غلظت دکستران- اسپرمین و سرعت اضافه کردن تری پلی فسفات به محلول پلیمر و غلظت نانوذرات مغناطیسی آهن/ غلظت پلیمر دکستران-اسپرمین..... ۹۸

شکل ۴-۶- تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) از نانوحامل‌های مغناطیسی دکستران- اسپرمین ۱۰۱

شکل ۴-۷- پروفایل رهایش نانوذرات مغناطیسی آهن از نانوحامل‌های مغناطیسی دکستران- اسپرمین در بافر استات در دمای ۳۷ درجه سلسیوس ۱۰۲

شکل ۴-۸- نتایج آزمون اندازه‌گیری خاصیت مغناطیسی AGFM ۱) نانوذرات مغناطیسی آهن ۲) نانوحامل‌های مغناطیسی دکستران- اسپرمین در ۳۰۰K ۱۰۳

شکل ۴-۹- منحنی زمان آسایش (T_2) برای نانوحامل‌های مغناطیسی دکستران- اسپرمین ۱۰۴

شکل ۴-۱۰- منحنی زمان آسایش (T^*_2) برای نانوحامل‌های مغناطیسی دکستران- اسپرمین ۱۰۵

شکل ۴-۱۱-تصویربرداری MRI از نانوذرات مغناطیسی آهن و نانوحامل‌های مغناطیسی دکستران- اسپرمین در فانتوم‌های ژل آگار (TE = 7 ms) ۱۰۵

شکل ۴- ۱۲- نرخ آسایش R_2 بر حسب غلظت آهن الف) نانو ذرات مغناطیسی بر حسب غلظت آهن ب) نانوحامل‌های مغناطیسی دکستران- اسپرمین ۱۰۷

شکل ۴- ۱۳- نرخ آسایش R^*_2 بر حسب غلظت آهن الف) نانو ذرات مغناطیسی آهن در ژل آگار ب) نانوحامل‌های مغناطیسی دکستران- اسپرمین در ژل آگار ۱۰۸

شکل ۴-۱۴- نشانه‌گذاری سلول‌های بنیادی با غلظت‌های مختلف آهن A) سلول‌های کنترل B) سلول‌های نشانه‌گذاری شده با ۲۰۰ میکروگرم آهن در میلی لیتر محیط کشت C) سلول‌های نشانه‌گذاری شده با ۲۰ میکروگرم آهن در میلی لیتر محیط کشت D) سلول‌های نشانه‌گذاری شده با ۲ میکروگرم آهن در میلی لیتر محیط کشت E) سلول‌های نشانه‌گذاری شده با ۰/۲ میکروگرم آهن در میلی لیتر محیط کشت ۱۱۰

شکل ۴-۱۵- نانوحامل‌های مغناطیسی آهن درون سلول در غلظت ۲۰µg/ml آهن A، D) سلول‌های کنترل B) سلول‌های نشانه‌گذاری شده قبل از رنگ آمیزی آهن C) سلول‌های نشانه‌گذاری شده بعد از رنگ آمیزی آهن E) سلول‌های نشانه‌گذاری شده پاساژ دوم قبل از رنگ آمیزی F) سلول‌های نشانه‌گذاری شده پاساژ دوم از بعد رنگ آمیزی آهن ۱۱۱

شکل ۴-۱۶- تصویربرداری از سلول‌های نشانه‌گذاری شده با نانوحامل‌های مغناطیسی دکستران- اسپرمین (۲۰µg/ml آهن) الف) سلول‌های کنترل ب) سلول‌های نشانه‌گذاری شده بعد از ۲۴ ساعت ج) سلول‌های نشانه‌گذاری شده بعد از دو پاساژ ۱۱۲

شکل ۴-۱۷- حیات سلول‌های بنیادی جنینی نشانه‌گذاری شده با غلظت‌های مختلف نانوحامل‌های مغناطیسی دکستران ۱۱۳

شکل ۴-۱۸- نمودار تکثیر سلولی برای سلول‌های بنیادی جنینی نشانه‌گذاری شده با غلظت‌های مختلف آهن ۱۱۴

شکل ۴-۱۹- نمودار مقدار آهن موجود درون سلولی بر حسب زمان ۱۱۵

شکل ۴- ۲۰- آنالیزRT-PCR برای بررسی بیان ژن‌های مشخص شده در تمایز به عصب سلول‌های بنیادی جنینی نشانه‌گذاری شده و کنترل ۱۱۷

شکل ۴-۲۱- تصویربرداری تشدید مغناطیسی فانتوم‌های آگار ژل سلول‌های بنیادی جنینی الف) تعداد افزایشی سلول‌ها نشانه‌گذاری شده با غلظت ثابت آهن ۲۰ میکروگرم در لیتر ب) تعداد 10^5 سلول نشانه‌گذاری شده با غلظت‌های افزایشی آهن..... ۱۱۹

شکل ۴-۲۲- الف) شکل نشان دهنده کاهش زمان آسایش با افزایش تعداد سلول‌های نشانه‌گذاری شده می باشد ب) شکل نشان دهنده کاهش زمان آسایش با افزایش غلظت آهن می باشد. زمان های T_2 از رسم نمودار شدت سیگنال برحسب TEs (۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۴۰ و ۵۰ میلی ثانیه به دست آمده است..... ۱۲۰

شکل ۴-۲۳- تصاویر MRI از سلول‌های نشانه‌گذاری شده تزریق شده به پهلوی موش a) ۴ ساعت بعد از تزریق b) ۷ روز بعد از تزریق c) ۱۴ روز بعد از تزریق d) ۲۸ روز بعد از تزریق e) ۴۲ روز بعد از تزریق f) افزایش شدت سیگنال تصویر در محل تزریق سلول‌های نشانه‌گذاری شده درطی ۶ هفته ۱۲۱

شکل ۴-۲۴- تصاویر MRI از سلول‌های نشانه‌گذاری شده تزریق شده به پهلوی موش a) ۴ ساعت بعد از تزریق b) ۷ روز بعد از تزریق c) ۱۴ روز بعد از تزریق d) ۲۸ روز بعد از تزریق e) ۴۲ روز بعد از تزریق ۱۲۲

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱- موارد استفاده شده برای ردیابی سلول‌های نشانه‌گذاری شده با نانوذرات در انسان و حیوان..... ۱۵

جدول ۲-۲- روش های مختلف برای ساختن نانوذرات سوپرمغناطیسی آهن برهنه (بدون پوشش)..۳۵

جدول ۲-۳- عامل کنتراست MRI برای نشان‌دار کردن سلول بنیادی..... ۵۷

جدول ۳-۱- متغیرها و سطوح مورد مطالعه در طراحی مرکب مرکزی برای تولید نانوحامل‌های مغناطیسی دکستران – اسپرمین..... ۶۵

جدول ۳-۲- طراحی آزمایش‌های بهینه‌سازی ساخت نانوذرات مغناطیسی کاتیونیک دکستران بر اساس روش پاسخ سطح..... ۶۵

جدول ۳-۳- ترکیبات محیط کشت سلول‌های بنیادی جنینی..... ۷۳

جدول ۳-۴- مواد لازم برای انجام واکنش PCR..... ۸۲

جدول ۳-۵- پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR..... ۸۳

جدول ۴-۱- فاکتورها و سطوح در نظرگرفته شده برای طراحی مرکب مرکزی..... ۹۱

جدول ۴-۲- نتایج طراحی آزمایش‌های بهینه‌سازی ساخت نانوذرات مغناطیسی کاتیونیک دکستران براساس روش پاسخ سطح..... ۹۱

جدول ۴-۳- آنالیز واریانس (ANOVA) برای تهیه نانوحامل‌های مغناطیسی دکستران- اسپرمین... ۹۳

جدول ۴-۴- مشخصات نانوحامل‌های مغناطیسی دکستران – اسپرمین..... ۱۰۰

جدول ۴-۵- غلظت و خلوص RNA برای نمونه‌های تست و کنترل..... ۱۱۶

جدول ۴- ۶- بیان ژن‌ها در سلول‌های تمایز یافته آزمون و کنترل..... ۱۱۷

فصل اول

مقدمه

۱-۱- بیان مسئله و سؤال اصلی پژوهش

نانوفناوری ابزاری لازم برای مطالعات سلول‌های بنیادی است، فناوری‌های نانو می‌توانند برای اندازه‌گیری، فهم و دست‌کاری سلول‌های بنیادی مورد استفاده قرار گیرند. برای مثال، در این زمینه می‌توان به نانوذرات مغناطیسی آهن و نقاط کوانتومی که برای نشانه‌گذاری و ردیابی این سلول‌ها بعد از پیوند زده شدن مورد استفاده قرار می‌گیرند، اشاره نمود [۱]. برای بعضی مصارف زیست دارویی، به نانوذرات هسته-پوسته‌ی مغناطیسی نیاز است. آن‌ها شامل یک هسته‌ی فلزی یا اکسید فلزی می‌شوند که در یک پوشش پلیمری آلی یا غیر آلی که ذرات را زیست سازگار، پایدار و قادر به استفاده به عنوان پلیمرها می‌کند، کپسوله می‌شوند. خواص مغناطیسی آن‌ها، این ذرات را قادر به استفاده در موارد فراوانی می‌کند: ۱- عوامل حاجب مغناطیسی در تصویربرداری تشدید مغناطیسی[1]، ۲- عوامل فرا داغ شونده، جایی که ذرات مغناطیسی به وسیله‌ی به‌کارگیری یک میدان مغناطیسی فرکانس بالا به صورت انتخابی گرمادهی می‌شوند (استفاده در مقابله‌ی گرمایی با بافت تومور)، ۳- بردارهای مغناطیسی[2] که می‌توانند به وسیله‌ی گرادیان میدان مغناطیسی، به طرف یک موقعیت مشخص هدف گیری شوند، همان گونه که در دارورسانی هدفمند صورت می‌گیرد.

حیطه وسیع فناوری‌های نانو، راهکارهای قابل اعتمادی را به منظور مطالعه زیست شناسی سلول‌های بنیادی ارائه داده و موجب پیشرفت و توسعه دیدگاه های جدید در حوزه پیوند و تمایز سلول‌های بنیادی می‌شود [۳،۲]. مثال‌های کاربرد نانوفناوری در مورد پژوهش‌های سلول‌های بنیادی به استفاده از ذرات آلی و غیرآلی [۴،۵]، کوانتوم دات [۱،۶،۷]، نانولیف‌ها [۸-۱۰] و استفاده از بسترهای[3] مهندسی شده با ابعاد نانو [۱۱،۱۲] بر می‌گردد. قابلیت کاربرد نانوفناوری در پژوهش‌های مربوط به سلول‌های بنیادی را می‌توان به چند دسته کلی تقسیم کرد[۱۳،۱۴].

[1] Magnetic resonance imaging (MRI)
[2] Magnetic vectors
[3] Substrates

ردیابی مولکول‌های سطحی سلول‌های بنیادی و آزمایش جزییات حرکت مولکولی بدون رنگ بری نوری[1]

ردیابی غیرتهاجمی و بدون درگیری سلول‌های بنیادی و سلول‌های مولد بعد از پیوند زده شدن در بدن

سامانه های انتقال سلول‌های بنیادی که موجب حفظ سلول‌های پیوند زده شده می‌گردد، این کار با استفاده از آزادسازی بیومولکول های ابقاء کننده انجام می‌گیرد

بسترهایی با ابعاد و مشخصه های نانو که مواد فعال زیستی (هورمون رشد، جایگاه های چسبندگی و پپتیدهای سنتزی) را برای تمایز و پیوند سلول‌های بنیادی در اختیار می‌گذارد.

انتقال درون سلولیDNA، RNA، پروتئین‌ها، پپتیدها و داروهای کوچک برای تمایز سلولی.

اگرچه فناوری‌های نانو با توجه به کنترلی که بر روی محیط‌های ریز و درشت[2] می‌توانند داشته باشند، ابزاری بسیار قدرتمند هستند، اما در کنار اثرات مثبتی که دارند، می‌توانند تأثیرها و جنبه های منفی نیز داشته باشند. بدین منظور، با مطالعات سامان دار باید پروفایل‌های سمیت آن‌ها را مشخص کرده و قابلیت تداخلی آن‌ها را در تقسیم، ترمیم خود به خودی و همچنین برنامه های تمایز سلول‌های بنیادی بررسی کرد.

اگرچه بسیاری از فناوری‌های نانو قبلاً در زیست شناسی سلولی مورد استفاده قرار گرفته است، اما در مورد سلول‌های بنیادی این فناوری‌ها اخیراً مورد استفاده قرارگرفته‌اند. به نظر می‌رسد که این امر با توجه به برخی از دلایل که در ادامه به آن‌ها اشاره شده، رخ داده است. ۱ پیشرفت‌هایی که اخیراً در زمینه تهیه مواد نانو با کیفیت بالاتر برای استفاده های پزشکی به وجود آمده است ۲ رشد آگاهی و اطلاعات در زمینه علم مواد و پژوهش‌های مهندسی بافت بر اساس قابلیت استفاده از سلول‌های بنیادی در پزشکی ترمیمی[3] ۳ موفقیت‌های قابل توجه در کاربردهای نانوفناوری در داروسازی ۴

[1] Photobleaching
[2] Micro and Macro
[3] Regenerative medicien