بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

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

عنوان

بررسی نقش سیستم گلوتاتیون در روند تکثیر، تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمال مغز استخوان بالغ انسانی به سلول های کبدی فعال

نگارش

حمیدرضا احمدی آشتیانی

اساتید راهنما

دکتر عبدالامیر علامه

دکتر حسین رستگار

استاد مشاور

دکتر مسعود سلیمانی

تابستان ۱۳۹۰

دانشگاه تربیت مدرس

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای حمیدرضا احمدی آشتیانی رشته بیوشیمی بالینی رساله دکتری خود را با عنوان: « نقش سیستم گلوتاتیون در روند تکثیر و تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمال مغز استخوان بالغ انسانی به سلولهای کبدی فعال» در تاریخ ۱۳۹۰/۶/۳۰ ارائه کردند.

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

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	امضاء
استاد راهنمای اصلی	دکتر عبدالامیر علامه	
استاد راهنمای دوم	دکتر حسین رستگار	
استاد مشاور	دکتر مسعود سلیمانی	
استاد ناظر	دکترعباس صاحبقدم لطفی	
استاد ناظر	دکتر احمد قره باغیان	
استاد ناظر	دکتر سیدمهدی رضایت	
استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر علیرضا مصباح نمین	

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 آئیننامههای مصوب انجام شود.

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

«اینجانب **حمیدرضا احمدی آشتیانی** دانشجوی رشته **بیوشیمی بالینی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۵** مقطع **دکتری** دانشکده **علوم پزشکی** 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

تاریخ

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

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

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

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

" کتاب حاضر، حاصل **رساله دکتری** نگارنده در رشته **بیوشیمی بالینی** است که در سال **۱۳۹۰** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر عبدالامیر علامه و دکتر حسین رستگار** ، مشاوره **مسعود سلیمانی** از آن دفاع شده است.

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

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

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

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

نام و نام خانوادگی
تاریخ و امضا

تقدیم به :

هر فردی که برای پیشرفت ایران تلاش می کند

تشکر و قدردانی

از اساتیدم

جناب آقای پرفسور عبدالامیر علامه

جناب آقای دکتر حسین رستگار

جناب آقای دکتر مسعود سلیمانی

که من را در مسیر انجام این پروژه راهنمایی فرمودند.

از مادرم، پدرم که با صبوری من را راهنمایی کرده و به من آرامش داده اند.

چکیده

از سال ۱۹۹۹ تا کنون در مقالات متعددی به تولید هپاتوسیت‌ها از انواع مختلف سلول‌های بنیادی یا پیش‌ساز خارج کبدی اشاره شده است. این امر افق وسیعی را برای مطالعات داروشناسی، سم‌شناسی و همچنین سلول درمانی فراهم نموده است. سال‌های زیادی است که محققان به دنبال راه‌هایی برای کاربردی نمودن سلول‌های بنیادی برای پیوند بافت و سلول در موارد بیماری و آسیب هستند. اما همچنان انجام تحقیقات بیشتر قبل از فراگیر شدن استفاده از این سلول‌ها در موارد بالینی ضروری می‌نماید. از سوی دیگر و همسو با هدف فوق دست یابی به روش هایی که کارایی و بهره تکثیر و تمایز را در سلول های بنیادی افزایش دهد از اولویت های تحقیقاتی در این زمینه به شمار می روند. شرایط اکسید و احیا سلول نقش های محوری در روند تکثیر، تمایز، بقا و عملکرد طبیعی سلول ها به عهده دارد که در این بین سیستم گلوتاتیون و گونه های فعال اکسیژن دو عامل اصلی در تعیین و تغییر وضعیت این شرایط می باشند. همچنین سلول های کبدی محل اصلی تولید گلوتاتیون بوده و بعلت نوع عملکرد بیشترین تقابلات را با رادیکال های آزاد داشته و سیستم گلوتاتیون در آنها نقش کلیدی تری را به عهده دارد. بنابراین در این مطالعه سعی شده که وضعیت شاخص استرس اکسیداتیو، سیستم گلوتاتیون و همچنین وضعیت اکسید و احیا گلوتاتیون در سلول های مزانشیمال مشتق از مغز استخوان قبل از القا تمایز، پس از شروع تمایز، در طی مراحل مختلف تمایز به سلول های کبدی و همچنین در سلول های کبدی حاصل بررسی شود و علاوه بر آن تاثیر کاهش و همچنین تقویت گلوتاتیون را بر تکثیر، شاخص های تمایزی، سیستم گلوتاتیون و شاخص استرس اکسیداتیو در وضعیتی مشابه حالت قبل مورد مطالعه قرار داده شد. در تکمیل طرح عواملی چون iNOS،COX-2 و برخی اینترلوکین ها در همان شرایط ذکر شده مطالعه شدند. بدین منظور نمونه مغز استخوان تهیه و پس از جدا سازی سلول های بنیادی مزانشیمال و تایید آنها با فلوسایتومتری مطالعات آغاز گردید بدین ترتیب که قبل از القا تمایز وضعیت گلوتاتیون اکسید، گلوتاتیون احیا، گلوتاتیون تام، گلوتاتیون ردوکتاز، گلوتاتیون پراکسیداز، ROS و iNOS،COX-2 و برخی اینترلوکین ها در شرایط طبیعی، تخلیه کامل گلوتاتیون، تخلیه نسبی گلوتاتیون، تقویت کامل گلوتاتیون و تقویت نسبی گلوتاتیون با آزمایشات بیوشیمیایی بررسی گردیدند و پس از القا تمایز به سمت سلول های کبدی همین نوع مطالعات در روند تمایز و در بازه های زمانی بلافاصله،۷ و ۱٤روز پس از شروع تمایز نیز انجام پذیرفت. وضعیت شاخص های تمایز کبدی همچون آلبومین، آلفا فیتو پروتئین و CK۱۹ در شرایط مختلف مذکور با تکنیک RT-PCR ارزیابی گردیدند.

کلمات کلیدی: گلوتاتیون اکسید، گلوتاتیون احیا، گلوتاتیون پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز، ROS، سلول های بنیادی مزانشیمال، سلول های شبه کبدی، بقا، تکثیر، تمایز، آلبومین، آلفا فیتو پروتئین، CK۱۹

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات انجام شده	۱
۱-۱. تاریخچه مطالعات بر روی بن‌یاخته‌ها	۲
۱-۲. انواع بن‌یاخته‌ها	۳
۱-۲-۱. انواع بن‌یاخته‌ها براساس قابلیت تمایز	۳
۱-۲-۲. انواع بن‌یاخته‌های انسانی براساس منشأ	۴
۱-۲-۲-۱. بن‌یاخته‌های رویانی انسان	۵
۱-۲-۲-۲. بن‌یاخته‌های زایای انسان	۶
۱-۲-۲-۳. بن‌یاخته‌های بالغ انسانی	۶
۱-۳. منابع بن‌یاخته‌های بالغ انسان	۷
۱-۳-۱. بند ناف	۸
۱-۳-۲. بن‌یاخته‌های خون بند ناف (UCB)	۹
۱-۳-۲-۱ بن‌یاخته‌های خون‌ساز (HSCs)	۱۱
۱-۳-۲-۱-۱. شناسایی بن‌یاخته‌های خون‌ساز	۱۲
۱-۳-۲-۱-۱-۱. شناسایی HSCها براساس مارکرهای سطحی	۱۲
۱-۳-۲-۱-۱-۲. شناسایی HSCها براساس رنگ‌آمیزی فلورسانت	۱۳

۱-۳-۲-۱-۱-۳. آزمون جمعیت جنبی ۱۳
۱-۳-۲-۲. بن‌یاخته‌های مزانشیمی (MSCs)..... ۱۴
۱-۳-۲-۱. جداسازی و شناسایی بن‌یاخته‌های مزانشیمی..... ۱۶
۱-۳-۲-۲. جداسازی بن‌یاخته‌های مزانشیمی..... ۱۷
۱-۳-۲-۳. شناسایی بن‌یاخته‌های مزانشیمی ۱۹
۱-۴ کاربردهای بن‌یاخته‌ها..... ۲۲
۱-۴-۱. استفاده از بن‌یاخته‌ها و یاخته‌های تمایزی در داروشناسی و سم شناسی..... ۲۲
۱-۴-۲. کاربرد بن‌یاخته‌ها در موارد بالینی ۲۵
۱-۴-۲-۱. بن‌یاخته‌ها و بافت کبد ۲۵
۱-۴-۲-۱-۱. عوامل مؤثر در تمایز و تکثیر هپاتوسیت‌ها ۲۶
۱-۴-۲-۱-۱-۱. فاکتور رشد کبدی (HGF) ۲۹
۱-۴-۲-۱-۱-۲. انکواستاتین M (OSM) ۳۰
۱-۴-۲-۱-۱-۳. دگزامتازون (DEX) ۳۱
۱-۴-۲-۱-۲. معیارهای لازم در تعریف هپاتوسیت‌های حاصل از بن‌یاخته‌ها ۳۱
۱-۴-۲-۱-۳ بن‌یاخته‌های خون بند ناف و هپاتوسیت‌ها ۳۴
۱-۵. اهداف و فرضیه ها ۳۵
فصل دوم: مواد و روشها ۳۶
۲-۱. جداسازی سلولهای بنیادی مزانشیمی ۳۷
۲-۱-۱. روش جداسازی سلولهای بنیادی مزانشیمی ۳۷
۲-۱-۱-۱. آسپیراسیون مغز استخوان ۳۷

۲-۱-۱-۳. جداسازی سلول های بنیادی مزانشیمی از سلول های تک هسته..... ۳۹
۲-۱-۲. طرز تهیه محلولها و معرفهای به کار رفته ۳۹
۲-۱-۲-۱. محیط کشت DMEM ۳۹
۲-۱-۲-۲ . FBS ۳۹
۲-۱-۲-۳. بافر PBS ۴۰
۲-۲. انجماد بن یاخته های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان hBMSCs ۴۰
۲-۲-۱. روش انجماد ۴۰
۲-۳.ذوب شدن و پاساژ سلول ها ۴۰
۲-۴. شمارش سلولی ۴۱
۲-۵. تعیین درصد زنده بودن سلول ها ۴۱
۲-۵-۱. طرز تهیه رنگ تریپان بلو (۴ ٪) ۴۲
۲-۶.شتشوی وسایل مورد نیاز ۴۲
۲-۷. تعیین مارکرهای سطحی hBMSCs با روش فلوسایتومتری ۴۲
۲-۷-۱. مواد و وسایل مورد نیاز ۴۲
۲-۷-۲. طرز تهیه محلولهای بکار رفته در فلوسایتومتری ۴۳
۲-۷-۲-۱. محلول ۳٪ HAS_PBS ۴۳
۲-۷-۲-۲. طرز ساخت محلول محلول فیکساتیو پارافرم آلدئید ۱٪ ۴۳
۲-۷-۳. روش آزمایش فلوسایتومتری ۴۴
۲-۸ . بررسی پتانسیل تمایزی سلولهای مزانشیمی ۴۴

۲-۸-۱ .القاء تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی به سمت سلولهای چربی ۴۴
۲-۸-۱-۱. رنگ آمیزی سلولهای تمایز داده شده به سمت سلولهای چربی ۴۵
۲-۸-۱-۱-۱. مواد لازم ۴۵
۲-۸-۱-۱-۲. روش رنگ آمیزی ۴۵
۲-۸-۱-۱-۳. روش تهیه محلول oil red o ۴۵
۲-۸-۱-۱-۳-۱. مواد لازم ۴۵
۲-۸-۱-۱-۳-۲. طرز تهیه ۴۶
۲-۸-۲. تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی به سمت سلولهای استخوانی ۴۶
۲-۸-۲-۱. رنگ آمیزی اختصاصی کلسیم در سلولهای تمایز داده شده به سمت استئوبلاست ۴۶
۲-۸-۲-۱-۱. مواد لازم ۴۶
۲-۸-۲-۲. روش رنگ آمیزی ۴۶
۲-۹. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نسخه برداری معکوس (RT-PCR) ۴۷
۲-۹-۱. استخراج RNA ۴۷
۲-۹-۱-۱. نحوه استخراج RNA و کنترل کیفی آن ۴۷
۲-۹-۲. سنتز cDNA از RNA استخراج شده ۴۸
۲-۹-۳. انتخاب پرایمر برای ژن‌های انتخاب شده برای RT-PCR ۴۸
۲-۹-۳-۱. آماده سازی پرایمرها برای واکنش PCR ۴۹
۲-۹-۴. انجام واکنش PCR ۴۹
۲-۹-۵. الکتروفورز محصولات PCR ۵۰
۲-۹-۵-۱. انجام الکتروفورز ۵۲

۲-۱۰. تیمار سلول ها با عوامل تغییر دهنده گلوتاتیون جهت انجام تست پایلوت و انتخاب دوز مناسب BSO ۵۲
۲-۱۰-۱. مواد لازم ۵۲
۲-۱۰-۲. روش کار ۵۳
۲-۱۰-۲-۱. محاسبه تعداد سلول برای انتقال سلول ها از فلاسک به پلیت..... ۵۳
۲-۱۰-۲-۲. محلول سازی ۵۴
۲-۱۰-۲-۲-۱. تهیه محلول با مولاریته های مختلف از پودر BSO ۵۴
۲-۱۰-۲-۲-۲. تهیه محلول ۳۰۰ µM از محلول BSO ۲۵۰mM ۵۶
۲-۱۰-۲-۳. طراحی تیمارها در روز شروع و شرح انجام تست ۵۷
۲-۱۰-۲-۳-۱. روز شروع ۵۷
۲-۱۰-۲-۳-۲. روز دوم ۶۰
۲-۱۰-۲-۳-۳. روزچهارم ۶۱
۲-۱۰-۲-۴. تصحیح دوز L-BSO و تیمار سلولها با دوزهای ۱µM و ۵ ..... ۶۱
۲-۱۰-۲-۴-۱. انجام محاسبات و تهیه محلول ۵ µM از پودر BSO ۶۱
۲-۱۰-۲-۴-۲. طراحی تیمارها در روز شروع و شرح انجام تست ۶۲
۲-۱۰-۲-۴-۲-۱. روز شروع ۶۲
۲-۱۰-۲-۴-۲-۲. روز دوم ۶۳
۲-۱۰-۲-۴-۲-۳. روز چهارم ۶۳
۲-۱۰-۲-۴-۲-۴. روز هفتم ۶۴
۲-۱۰-۲-۴-۲-۵. روز چهاردهم ۶۴

۲-۱۱. انجام تست پایلوت و انتخاب دوز مناسب NAC ۶۴
۲-۱۱-۱. انجام حاسبات ۶۴
۲-۱۱-۲. طراحی تیمارها در روز شروع و شرح انجام تست ۶۶
۲-۱۱-۲-۱. روز شروع ۶۶
۲-۱۱-۲-۲. روز دوم ۶۸
۲-۱۱-۲-۳. روز چهارم ۶۹
۲-۱۱-۲-۴. روز هفتم ۶۹
۲-۱۱-۲-۵. روز چهاردهم ۶۹
۲-۱۱-۳. تصحیح دوز NAC و تیمار سلولها با دوزهای ۰/۱ mM و ۱ ..... ۶۹
۲-۱۲. سنجش فاکتورهای بیوشیمیایی در سلولهای تیمار شده با BSO، NAC، سیلیمارین و مقایسه آن با گروه کنترل ۷۱
۲-۱۲-۱. اندازه گیری GSSG،GSH و گلوتاتیون تام ۷۱
۲-۱۲-۱-۱. مواد ۷۲
۲-۱۲-۱-۲. آماده سازی محلولها ۷۲
۲-۱۲-۱-۳. آماده سازی نمونهها ۷۲
۲-۱۲-۱-۴. روش کار ۷۳
۲-۱۲-۲. سنجش سطح TAC ۷۵
۲-۱۲-۲-۱. مواد ۷۵
۲-۱۲-۲-۲. آماده سازی محلولها ۷۵
۲-۱۲-۲-۳. آماده سازی نمونه ۷۶
۲-۱۲-۲-۴. روش کار ۷۶
۲-۱۲-۴. اندازه گیری میزان گونههای فعال اکسیژن ۷۸
۲-۱۲-۴-۱. مواد ۷۸

۲-۱۲-۴-۲. روش کار ۷۸
۲-۱۲-۵. اندازه گیری میزان H_2O_2 ..... ۷۹
۲-۱۲-۵-۱. مواد ۷۹
۲-۱۲-۵-۲. آماده سازی محلولها ۷۹
۲-۱۲-۵-۳. آماده سازی نمونه ۷۹
۲-۱۲-۵-۴. روش کار ۸۰
۲-۱۲-۶. اندازه گیری سطح آنزیم COXII در نمونه لیز شده سلولی..... ۸۰
۲-۱۲-۶-۱. مواد ۸۰
۲-۱۲-۶-۲. آماده سازی محلولها ۸۱
۲-۱۲-۶-۳. آماده سازی نمونه ۸۱
۲-۱۲-۶-۴. روش کار ۸۲
۲-۱۲-۷. اندازه گیری سطح آنزیم iNOS در نمونه لیز شده سلولی ۸۳
۲-۱۲-۷-۱. مواد ۸۳
۲-۱۲-۷-۲. آماده سازی محلولها ۸۳
۲ -۱۲-۷-۳. آماده سازی نمونه ۸۴
۲-۱۲-۷-۴. روش کار ۸۴
۲-۱۲-۸. اندازه گیری سطح فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز ۸۵
۲-۱۲-۸-۱. مواد ۸۵
۲-۱۲-۸-۲. آماده سازی محلولها ۸۶
۲-۱۲-۸-۳. آماده سازی نمونه ۸۷
۲-۱۲-۸-۴. روش کار ۸۷
۲-۱۲-۹. اندازه گیری سطح فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز ۸۷
۲-۱۲-۹-۱. مواد ۸۸

۲-۱۲-۹-۲. آماده سازی محلولها ۸۸
۲-۱۲-۹-۳. آماده سازی نمونه ۸۹
۲-۱۲-۹-۴. روش کار ۸۹
۲-۱۳. اندازه گیری میزان پرولیفراسیون سلولهای تیمار شده با استفاده از کیت رنگ سنجی Brdu و مقایسه آن با گرو کنترل ۹۰
۲-۱۳-۱. مواد ۹۰
۲-۱۳-۲. آماده سازی محلولها ۹۰
۲-۱۳-۳. روش کار ۹۱
۲-۱۴. اندازه گیری سیتوکینهای التهابی و ضد التهابی در محیط رویی..... ۹۲
۲-۱۴-۱. اندازه گیری IL6 ..... ۹۳
۲-۱۴-۱-۱. مواد ۹۳
۲-۱۴-۱-۲. آماده سازی نمونه ۹۳
۲-۱۴-۱-۳. آماده سازی محلولها ۹۳
۲-۱۴-۱-۴. روش کار ۹۴
۲-۱۴-۲. اندازه گیری سطح IL8 در مایع رویی سلولهای تیمار شده ۹۶
۲-۱۴-۲-۱. مواد ۹۶
۲-۱۴-۲-۲. آماده سازی محلولها ۹۷
۲-۱۴-۲-۳. آماده سازی نمونه ۹۷
۲-۱۴-۲-۴.روش کار ۹۷
۲-۱۴-۳. اندازه گیری سطح IL 10 در مایع رویی سلولهای تیمار شده ۹۸
۲-۱۴-۳-۱. مواد ۹۸
۲-۱۴-۳-۲. آماده سازی محلولها ۹۹
۲-۱۴-۳-۳. آماده سازی نمونه ۹۹

۲-۱۴-۳-۴. روش کار ۹۹
۲-۱۴-۴. اندازه گیری TNF-α در مایع رویی سلولهای تیمار شده..... ۱۰۱
۲-۱۴-۴-۱. مواد ۱۰۱
۲-۱۴-۴-۲. آماده سازی محلولها ۱۰۲
۲-۱۴-۴-۳. آماده سازی نمونه ۱۰۳
۲-۱۴-۴-۴. روش کار ۱۰۳
فصل سوم: نتایج ۱۰۷
۳-۱. بیان شاخص های اختصاصی سلول های بنیادین مزانشیمی با استفاده از روش فلوسایتومتری ۱۰۸
۳-۲. خصوصیات مرفولوژیکی سلول هایMSC ۱۰۹
۳-۳. بررسی توانایی تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست و آدیپوسیت... ۱۱۰
۳-۴. تجمع آلبومین و AFP در سلولهای شبه هپاتوسیت ۱۱۱
۳-۴-۱. بیان پروتئین آلبومین در سلول های شبه هپاتوسیت تمایزی..... ۱۱۱
۳-۴-۲. بیان پروتئین آلفا -فیتوپروتئین در سلول های شبه هپاتوسیت تمایزی..... ۱۱۳
۳-۴-۳. بیان mRNA ژنهای اختصاصی هپاتوسیت در سلول های تمایز داده شده..... ۱۱۴
۳-۵. بررسی نقش ان-استیل سیستئین و ال-بوتیونین سولفوکسیمین در سیستم گلوتاتیون و آنزیم های وابسته در تکثیر سلولهای مزانشیمی بنیادی..... ۱۱۶
۳-۵-۱. تعیین دوز مناسب ان-استیل سیستئین جهت تیمار سلولهای مزانشیمی ... ۱۱۶
۳-۵-۲. تعیین تعیین دوز مناسب ال-بوتیونین سولفوکسیمین جهت تیمار سلولهای مزانشیمی ۱۱۸
۳-۵-۳. بررسی اثرات NAC و BSO بر تعداد سلول های زنده در طی روند تکثیر سلول های بنیادی مزانشیمی ۱۲۰
۳-۵-۴. تعیین میزان پرولیفراسیون سلولهای مزانشیمی تیمار شده با ال-بوتیونین

سولفوکسیمین با استفاده از آزمون Brdu ۱۲۲
۳-۵-۵. تعیین میزان پرولیفراسیون سلولهای تیمار شده با ان-استیل سیستئین با استفاده از آزمون Brdu ۱۲۳
۳-۵-۶. بررسی اثرات ان-استیل سیستئین و ال-بوتیونین سولفوکسیمین بر روی میزان گلوتاتیون احیا (GSH) در سلولهای مزانشیمی ۱۲۴
۳-۵-۷. بررسی اثرات ان-استیل سیستئین و ال-بوتیونین سولفوکسیمین بر روی میزان گلوتاتیون اکسید شده (GSSG) در سلولهای مزانشیمی ۱۲۵
۳-۵-۸. بررسی اثرات ان-استیل سیستئین و ال-بوتیونین سولفوکسیمین بر روی میزان توتال گلوتاتیون در سلولهای مزانشیمی ۱۲۷
۳-۵-۹. بررسی اثرات ان-استیل سیستئین و ال-بوتیونین سولفوکسیمین بر روی میزان ظرفیت آنتی اکسیدان توتال (TAC) در سلولهای مزانشیمی ۱۲۸
۳-۵-۱۰. بررسی اثرات ان-استیل سیستئین و ال-بوتیونین سولفوکسیمین بر روی میزان گونه های اکسیژن فعال (ROS) در سلولهای مزانشیمی ۱۳۰
۳-۵-۱۱. بررسی اثرات ان-استیل سیستئین و ال-بوتیونین سولفوکسیمین بر میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز در سلولهای مزانشیمی ۱۳۲
۳-۵-۱۲. بررسی اثرات ان-استیل سیستئین و ال-بوتیونین سولفوکسیمین بر میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در سلولهای مزانشیمی ۱۳۳
۳-۵-۱۳. بررسی اثرات ان-استیل سیستئین و ال-بوتیونین سولفوکسیمین بر میزان فعالیت آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ در سلولهای مزانشیمی ۱۳۵
۳-۵-۱۴. بررسی اثرات ان-استیل سیستئین و ال-بوتیونین سولفوکسیمین بر میزان فعالیت آنزیم نیتریک اکسید سنتاز (iNOS) در سلولهای مزانشیمی ۱۳۷
۳-۵-۱۵. بررسی اثرات ان-استیل سیستئین و ال-بوتیونین سولفوکسیمین بر میزان پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در سلولهای مزانشیمی ۱۳۹

۳-۵-۱۶. بررسی اثرات ان-استیل سیستئین و ال-بوتیونین سولفوکسیمین بر میزان اینترلوکین۶ (IL6) در سلولهای مزانشیمی ۱۴۱
۳-۵-۱۷. بررسی اثرات ان-استیل سیستئین و ال-بوتیونین سولفوکسیمین بر میزان اینترلوکین۸ (IL8) در سلولهای مزانشیمی ۱۴۳
۳-۵-۱۸. بررسی اثرات ان-استیل سیستئین و ال-بوتیونین سولفوکسیمین بر میزان اینترلوکین۱۰ (IL10) در سلولهای مزانشیمی ۱۴۵
۳-۵-۱۹. بررسی اثرات ان-استیل سیستئین و ال-بوتیونین سولفوکسیمین بر میزان TNF-α در سلولهای مزانشیمی ۱۴۷
۳-۶. بررسی نقش ان-استیل سیستئین و ال-بوتیونین سولفوکسیمین در سیستم گلوتاتیون و آنزیم های وابسته در روند تمایز ۱۴۹
۳-۶-۱.بررسی اثرات ان-استیل سیستئین و ال-بوتیونین سولفوکسیمین در تمایز سلولهای مزانشیمی بنیادی به سلولهای هپاتوسیت ۱۴۹
۳-۶-۲.تعیین درصد زنده ماندن سلولهای تیمار شده با ان-استیل سیستئین و ال-بوتیونین سولفوکسیمین بعد از تمایز به سلولهای هپاتوسیت..... ۱۵۰
۳-۶-۳. بررسی میزان پرولیفراسیون سلولهای تمایز یافته هپاتوسیت تیمار شده با ان-استیل سیستئین و ال-بوتیونین سولفوکسیمین ۱۵۲
۳-۶-۴. بررسی اثرات ان-استیل سیستئین و ال-بوتیونین سولفوکسیمین بر روی میزان گلوتاتیون احیا (GSH) در سلولهای تمایز یافته هپاتوسیت..... ۱۵۴
۳-۶-۵. بررسی اثرات ان-استیل سیستئین و ال-بوتیونین سولفوکسیمین بر روی میزان گلوتاتیون اکسید شده (GSSG) در سلولهای تمایز یافته هپاتوسیت..... ۱۵۶
۳-۶-۶. بررسی اثرات ان-استیل سیستئین و ال-بوتیونین سولفوکسیمین بر روی میزان توتال گلوتاتیون در سلولهای تمایز یافته هپاتوسیت ۱۵۸
۳-۶-۷. بررسی اثرات ان-استیل سیستئین و ال-بوتیونین سولفوکسیمین بر روی ۱۶۰

میزان ظرفیت آنتی اکسیدان توتال (TAC) در سلولهای تمایز یافته هپاتوسیت.....
۳-۶-۸. بررسی اثرات ان-استیل سیستئین و ال-بوتیونین سولفوکسیمین بر روی ۱۶۲
میزان گونه های اکسیژن فعال (ROS) در سلولهای تمایز یافته هپاتوسیت.....
۳-۶-۹. بررسی اثرات ان-استیل سیستئین و ال-بوتیونین سولفوکسیمین بر میزان ۱۶۴
فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز در سلولهای تمایز یافته هپاتوسیت.....
۳-۶-۱۰. بررسی اثرات ان-استیل سیستئین و ال-بوتیونین سولفوکسیمین بر میزان ۱۶۶
فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در سلولهای تمایز یافته هپاتوسیت.....
۳-۶-۱۱. بررسی اثرات ان-استیل سیستئین و ال-بوتیونین سولفوکسیمین بر میزان ۱۶۸
فعالیت آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ در سلولهای تمایز یافته هپاتوسیت.....
۳-۶-۱۲. بررسی اثرات ان-استیل سیستئین و ال-بوتیونین سولفوکسیمین بر میزان ۱۷۰
فعالیت آنزیم نیتریک اکسید سنتاز (iNOS) در سلولهای تمایز یافته هپاتوسیت.....
۳-۶-۱۳. بررسی اثرات ان-استیل سیستئین و ال-بوتیونین سولفوکسیمین بر میزان ۱۷۲
پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در سلولهای تمایز یافته هپاتوسیت.....
۳-۶-۱۴. بررسی اثرات ان-استیل سیستئین و ال-بوتیونین سولفوکسیمین بر میزان ۱۷۴
اینترلوکین۶ (IL6) در سلولهای تمایز یافته هپاتوسیت .....
۳-۶-۱۵. بررسی اثرات ان-استیل سیستئین و ال-بوتیونین سولفوکسیمین بر میزان ۱۷۶
اینترلوکین۸ (IL8) در سلولهای تمایز یافته هپاتوسیت.....
۳-۶-۱۶. بررسی اثرات ان-استیل سیستئین و ال-بوتیونین سولفوکسیمین بر میزان ۱۷۸
TNF-α در سلولهای تمایز یافته هپاتوسیت .....
فصل چهارم: بحث، نتیجهگیری و پیشنهادها ۱۸۰
۴-۱. اهمیت سلولهای بنیادی ۱۸۱
۴-۲- سیستم اکسیداسیون-احیاو تکثیر سلولی ۱۸۲
۴-۳- نقش گلوتاتیون در روند تکثیر و تمایز ۱۸۵