



دانشگاه اراک

دانشکده علوم پایه

کارشناسی ارشد زیست شناسی جانوری

(گرایش سلولی - تکوینی)

بررسی اثر ویتامین E بر قدرت زیستی و مهار آپوپتوزیس القاء شده توسط
بیسفنول A در سلولهای بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ

پژوهشگر

افسانه خانی پور

اساتید راهنما

دکتر ملک سلیمانی مهرنجانی

دکتر مجید مهدیه نجف آبادی

استاد مشاور

دکتر سید محمد علی شریعت زاده

بهمن ۹۲



بسم الله الرحمن الرحيم

بررسی اثر ویتامین E بر قدرت زیستی و مهار آپوپتوزیس القاء شده
توسط بیسفنول A در سلولهای بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت

توسط:

افسانه خانی پور

پایان نامه

ارائه شده به مدیریت تحصیلات تکمیلی به عنوان بخشی از فعالیت های تحصیلی لازم برای
اخذ درجه کارشناسی ارشد
در رشته زیست شناسی (گرایش سلولی-تکونی)

از

دانشگاه اراک

اراک-ایران

ارزیابی و تصویب شده توسط کمیته پایان نامه با درجه عالی

دانشیار	دکتر ملک سلیمانی مهرنجانی (استاد راهنما اول)
استادیار	دکتر مجید مهدیه نجف آبادی (استاد راهنما دوم)
استاد	دکتر سید محمدعلی شریعت زاده (استاد مشاور)
دانشیار	دکتر حمیدرضا مؤمنی (استاد مدعو)

شکر و قدرانی:

شکر و سپاس خداوند متعال را که توفیق داد این پایان نامه را به سرانجام برسانم. از خداوند منان توفیق و سعادت همه پویندگان و رهروان علم و دانش را خواهم.

به مصداق حدیث شریف:

"من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق"

بر خود لازم می دانم که در کمال ادب و احترام مراتب سپاس و قدر دانی خالصانه و صمیمانه خویش را از همه کسانی که مراد انجام این تحقیق یاری رسانده اند، ابراز دارم:

استاد ارجمند جناب آقای دکتر ملک سلیمانی که شاگردی در محضر ایشان مایه افتخار من می باشد و بی شک بدون راهنمایی های ارزنده ایشان و زحمات، کمک ها و حمایت های بی دریغشان انجام این تحقیق مقدور نبود.

باشکر و سپاس فراوان از جناب آقای دکتر مجید مهدیه نجف آبادی برای راهنمایی های ارزنده و لطف و محبت بی دریغشان و تمام امکانات آزمایشگاه زیست گیاهی که بزرگوارانه در اختیار من قرار دادند.

بانشکر و سپاس فراوان از جناب آقای دکتر سید محمد علی شریعت زاده به پاس راهنمایی های ارزنده و کمک های بی دریغشان و هر آنچه از ایشان آموختم.

از استاد فرهیخته و بزرگوارم جناب آقای دکتر مومنی که زحمت خواندن و داوری این پایان نامه را تقبل نموده اند صمیمانه و خالصانه تشکر می‌کنم.

از همی دوستان خوب و عزیزم در مقطع دکترا و کارشناسی ارشد که در این مدت یاریم کردند بی نهایت سپاسگزارم.

بانشکر از کارشناسان و کارکنان محترم آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی تکوینی سرکار خانم الهام شجاع فر، جناب آقای فراهانی، سرکار خانم نیره محمودی، جناب آقای بنو و بانشکر از جناب آقای میرجعفری، سرکار خانم دکتر زینب شرفی و سرکار خانم دکتر مهرنوش مقدسی.

از عزیزترین عزیزانم

آیرین، رضا، محمد، آرمان، آرام، دینا، آرشین، آرتین و یزدان که از دعای خیرشان بهره گرفته‌ام سپاسگزارم.

بایاد و نام سالار و سرور آزادگان امام حسین (ع)

برک سبزی است تقدیم به:

پدر و مادر محبوب و مهرورزم که ژرفای عشق به فرزند را در عمق نگاه های عطوفت خیز و

ناقذشان حس کردم؛ و به برادران و خواهرانم که آفتاب مهرشان در آستانه قلم بیچ گاه

غروب نخواهد کرد. از آنجا که خانواده ام قدردان تلاشم قبل از رسیدن به نتیجه بوده

اند و تلاشم را ارج نهاده اند، صادقانه در مقابل این همه محبتشان جز این سخن ندارم: "

من چه در پای تو ریزم که پسند تو بود سرو جان را توان گفت که مقداری هست

چکیده:

سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان (MSCs) سلول‌های چند توانی هستند که توانایی تمایز به رده‌های مختلف سلولی را دارند. بیسفنول A که کاربرد وسیعی در دندانپزشکی و صنعت دارد، به عنوان یکی از مختل‌کننده‌های محیطی سیستم اندوکرینی محسوب می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد که بیسفنول A علاوه بر مشکلات محیطی بر سلامت انسان نیز آثار مضر دارد. ویتامین E یک آنتی-اکسیدان زنجیره شکن محلول در چربی در پلاسمای انسان می‌باشد که با جلوگیری از پیشرفت واکنش‌های رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدی از لیپوپروتئین‌ها و غشاء‌های بیولوژیکی محافظت می‌کند. با توجه به وجود بیسفنول A به عنوان یک آلاینده‌ی زیست محیطی بخصوص در جوامع صنعتی، همچنین وجود ویتامین E به عنوان اولین خط دفاعی سلول‌ها برای جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدی، اثر ویتامین E بر مهار آپوپتوز القاء شده به وسیله‌ی بیسفنول A در MSCs بررسی شد. پس از استخراج و کشت MSCs، سلول‌های پاساژ ۳ طی ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۰ ساعت و ۳، ۵ و ۷ روز در معرض دوزهای مختلف بیسفنول A (۲۵۰ و ۲۰۰، ۱۲۵، ۱۵۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۰، ۵، ۱، ۰/۵ میکرومولار) قرار گرفتند. سپس میزان بقا و توانایی زیستی سلول‌ها با تست MTT بررسی شد. پس از یافتن دوز موثر، سلول‌ها با دوز ۵۰ میکرومولار بیسفنول A و دوزهای مختلف ویتامین E (۱۰۰ و ۵۰، ۲۵، ۱۰، ۵ میکرومولار) به مدت ۳ روز تیمار شدند. برای ادامه مطالعه، دوز 50 میکرومولار بیسفنول A و ۲۵ میکرومولار ویتامین E انتخاب شد. پس از یافتن دوز موثر، مورفولوژی سلول‌ها توسط رنگ‌آمیزی فلورسنت، سلامت DNA با تست کامت و الکتروفورز ارزیابی و مرگ سلولی با تست TUNEL و واکنش RT-PCR، بررسی شد. نتایج نشان داد که بیسفنول A باعث کاهش معنی‌دار توان زیستی سلول‌ها و تکثیر آنها بصورت وابسته به دوز و زمان شد. بررسی‌های مورفولوژیک، انجام تست کامت و ژل الکتروفورز DNA، تخریب و قطعه قطعه شدن DNA را نشان داد. و مثبت شدن تست TUNEL بیان گر نوع مرگ سلولی برنامه ریزی شده بود. همچنین بیسفنول A، میزان بیان Bax و BCL₂ را در سلول‌های MSCs به ترتیب افزایش و کاهش می‌دهد. نتایج، اثرات محافظتی ویتامین E را در برابر سمیت بیسفنول A نشان دادند.

فصل اول: مقدمه

۲	۱-۱. سلولهای بنیادی
۴	۱-۱-۱: دسته‌بندی سلول‌های بنیادی بر حسب قابلیت تمایز آن‌ها
۴	۱-۱-۱-۱ همه توان
۵	۱-۱-۱-۲ پرتوان
۵	۱-۱-۱-۳ چند توان
۵	۱-۱-۱-۴ الیگوپوتنت
۵	۱-۱-۱-۵ تک توان
۶	۲-۱-۱. دسته‌بندی سلول‌های بنیادی بر اساس منشأ
۶	۱-۲-۱-۱. سلول‌های بنیادی جنینی
۹	۱-۱-۲-۱-۱. ویژگی‌های بنیادی سلول‌های ES
۱۰	۲-۲-۱-۱. سلول‌های بنیادی بند ناف
۱۲	۳-۲-۱-۱. سلول‌های بنیادی بالغ
۱۳	۲-۱. استخوان و بافت مغز استخوان
۱۴	۱-۲-۱. سلول‌های بنیادی مشتق شده مغز استخوان (BMSCs)
۱۶	۲-۲-۱. سلول‌های بنیادی مزانشیم
۱۷	۳-۲-۱. تاریخچه‌ی سلول‌های بنیادی مزانشیم
۱۸	۴-۲-۱. تعریف نیچ (کنام) سلول‌های بنیادی
۲۰	۱-۴-۲-۱. فاکتورهای لازم برای بقاء نیچ سلول بنیادی
۲۰	۱-۱-۴-۲-۱. اجزای سلولی
۲۲	۲-۱-۴-۲-۱. اجزای غیر سلولی
۲۲	۱-۲-۱-۴-۲-۱. ماتریکس خارج سلولی (ECM)
۲۲	۲-۲-۱-۴-۲-۱. β -اینترگرین‌ها
۲۳	۳-۲-۱-۴-۲-۱. تناسین C (TNC)
۲۳	۴-۲-۱-۴-۲-۱. استئوپونتین (OPN)
۲۴	۵-۲-۱-۴-۲-۱. Sonic-hedgehog
۲۴	۶-۲-۱-۴-۲-۱. افرین‌ها
۲۴	۵-۲-۱. نیچ سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان
۲۷	۶-۲-۱. مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیم
۲۷	۷-۲-۱. ویژگی‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی
۲۹	۸-۲-۱. قابلیت‌های سلول‌های مزانشیمی در شرایط <i>In vivo</i>
۳۰	۳-۱. انواع مرگ سلولی

۳۱	۱-۳-۱. آپوتوز و نکروز
۳۳	۱-۳-۲. آپوتوزیس
۳۶	۱-۳-۳. خصوصیات سلول‌های آپوتوزیس از نظر تغییرات مورفولوژیک و بیوشیمیایی
۳۶	۱-۳-۳-۱. تغییرات مورفولوژیک
۳۷	۱-۳-۳-۲. تغییرات بیوشیمیایی
۳۹	۱-۳-۴. مسیرهای آپوتوزی
۳۹	۱-۳-۴-۱. مسیر خارجی یا آپوتوز القاء شده توسط گیرنده‌های مرگ
۴۱	۱-۳-۴-۲. مسیر داخلی یا مسیر میتوکندریایی آپوتوز
۴۳	۱-۳-۵. عوامل القاء کننده و مهار کننده آپوتوزیس
۴۳	۱-۳-۵-۱. کاسپازها
۴۵	۱-۳-۵-۲. خانواده Bcl-2
۴۶	۱-۳-۵-۳. مولکول‌های خانواده IAPs
۴۷	۱-۴-۱. آلاینده‌های زیست محیطی
۴۷	۱-۴-۱. بیسفنول A
۴۹	۱-۴-۲. اثرات بیسفنول A
۴۹	۱-۴-۳. بیسفنول A، استرس اکسیداتیو و القای آپوتوزیس
۵۰	۱-۵-۵. ویتامین E
۵۲	۱-۵-۱. اشکال مختلف ویتامین E
۵۳	۱-۵-۲. نقش ویتامین E
۵۵	۱-۶. مروری بر مطالعات گذشته
۵۸	۱-۷. هدف از مطالعه
۶۱	فصل دوم: مواد و روش‌ها
۶۱	۱-۲. انتخاب حیوان
۶۱	۲-۲. جدا سازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان
۶۳	۲-۲-۱. اجرای پاساژ
۶۴	۲-۲-۲. اثبات مزانشیم بودن سلول‌های استخراج شده:
۶۴	۲-۳. بررسی حیات سلول بر پایه‌ی رنگ سنجی (MTT)
۶۴	۲-۳-۱. مراحل سنجش تترازولیوم
۶۵	۲-۳-۲. ترسیم منحنی استاندارد با استفاده از سنجش تترازولیوم
۶۶	۲-۴. انتخاب دوز و زمان تیمار
۶۶	۲-۴-۱. اثر همزمان بیسفنول A و ویتامین E بر توانایی زیستی سلول‌های بنیادی مزانشیم
۶۷	۲-۴-۲. تعیین دوز موثر ویتامین E
۶۷	۲-۵. بررسی آپوتوزیس
۶۷	۲-۵-۱. بررسی تغییرات مورفولوژیکی با استفاده از رنگ‌آمیزی فلورسنت

۶۹	۲-۵-۲. آزمون کامت
۶۹	۲-۵-۲. ۱. آماده‌سازی لام‌ها
۷۰	۲-۵-۲. ۲. لیز کردن سلول‌ها
۷۰	۲-۵-۲. ۳. تیمار قلیایی سلول‌ها
۷۰	۲-۵-۲. ۴. الکتروفورز سلول‌ها
۷۱	۲-۵-۲. ۵. خنثی‌سازی و تثبیت
۷۱	۲-۵-۲. ۶. رنگ‌آمیزی
۷۱	۲-۵-۲. ۷. بررسی میکروسکوپی و عکس‌برداری
۷۲	۳-۵-۲. تست TUNEL
۷۳	۴-۵-۲. DNA Ladder
۷۴	۱-۴-۵-۲. استخراج DNA سلول
۷۵	۲-۴-۵-۲. الکتروفورز و مراحل انجام آن
۷۷	۵-۵-۲. بررسی تغییر الگوی بیان ژن‌های BAX و Bcl-2 در سلول‌های مزانشیم تیماری
۷۷	۱-۵-۵-۲. استخراج RNA از سلول‌ها
۷۹	۱-۱-۵-۵-۲. بررسی کمی و کیفی RNA از سلول‌ها
۷۹	۲-۵-۵-۲. واکنش نسخه‌برداری معکوس
۸۰	۱-۲-۵-۵-۲. روش کار و سنتز cDNA
۸۱	۲-۲-۵-۵-۲. بررسی کمی و کیفی cDNA
۸۱	۳-۵-۵-۲. واکنش زنجیره ای پلیمرز PCR
۸۲	۱-۳-۵-۵-۲. روش کار
۸۴	۲-۳-۵-۵-۲. ارزیابی محصول PCR
۸۵	۶-۲. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها
	فصل سوم: نتایج
۸۷	۱-۳. رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیم
۸۸	۲-۳. دوزیابی
۸۸	۱-۲-۳. نتایج حاصل از توانایی زیستی بر پایه روش MTT (رنگ سنجی)
۹۲	۲-۲-۳. انتخاب دوز موثر بیسفنول A
۹۲	۳-۲-۳. نتایج حاصل از تیمار همزمان ویتامین E و بیسفنول A بر توانایی زیستی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت
۹۵	۳-۳. بررسی مرگ سلولی در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان
۹۵	۱-۳-۳. بررسی تغییرات مورفولوژیک با استفاده از رنگ‌آمیزی فلورسنت
۹۷	۲-۳-۳. نتایج حاصل از آزمون RT-PCR
۹۷	۱-۲-۳-۳. بررسی بیان ژن Bax
۹۸	۲-۲-۳-۳. بررسی بیان ژن Bcl-2

۱۰۰	۳-۳-۳. آزمون تانل
۱۰۱	۳-۴. آزمون کامت
۱۰۳	۳-۳-۵. ژل الکتروفورز DNA
۱۰۲	فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری
۱۰۵	۴-۱: بررسی توانایی زیستی سلول‌ها
۱۰۹	۴-۲: بررسی میزان شکستگی DNA در سلول‌ها
۱۱۱	۴-۳: بررسی تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها
۱۱۳	۴-۴: بررسی تغییر الگوی بیلن ژن‌های Bax و Bcl ₂ در سلول‌ها
۱۱۵	۴-۵. نتیجه‌گیری
۱۱۶	۴-۶. پیشنهادات
	فصل پنجم: پیوست‌ها
۱۱۸	۵-۱. روش تهیه محیط کشت
۱۱۸	۵-۲. تهیه فسفات بافر سالین PBS
۱۱۹	۵-۳. روش تهیه محلول MTT
۱۱۹	۵-۴. روش تهیه محلول آگارز با نقطه‌ی ذوب معمولی
۱۱۹	۵-۵. روش تهیه محلول آگارز با نقطه ذوب پائین
۱۱۹	۵-۶. محلول لیز کننده
۱۲۰	۵-۷. بافر الکتروفورز
۱۲۰	۵-۸. بافر خنثی
۱۲۰	۵-۹. بافر لیزکننده سلولی (TE) جهت استخراج DNA
۱۲۰	۵-۱۰. طرز تهیه‌ی ژل آگارز ۲٪
۱۲۰	۵-۱۱. طرز تهیه‌ی بافر TAE 10X
۱۲۱	۵-۱۲. طرز تهیه‌ی محلول اتیدیوم بروماید
۱۲۳	فصل ششم: منابع

فهرست جداول

- جدول ۱-۱: محدوده پتانسیل تمایزی سلول‌های بنیادی از سلول بنیادی totipotent به سلول Unipotent ۶
- جدول ۱-۲: ویژگی‌های مورفولوژیکی مدل‌های مختلف مرگ سلولی ۳۲
- جدول ۱-۲: اطلاعات پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های Bcl-2 و Bax ۸۳
- جدول ۲-۲: برنامه مورد استفاده جهت PCR ژن‌های Bcl-2 و Bax ۸۴
- جدول ۱-۳: مقایسه اثر متقابل زمان و دوز بر میانگین تعداد سلول‌های مزانشیم زنده پس از تیمار با دوزهای مختلف بیسفنول A ۹۰
- جدول ۲-۳: مقایسه میانگین توانایی زیستی سلول‌های مزانشیم زنده پس از تیمار با دوزهای مختلف بیسفنول A و تاثیر زمان‌های متفاوت به طور جداگانه ۹۱
- جدول ۳-۳: مقایسه میانگین توانایی سلول‌های بنیادی مزانشیم پس از تیمار ۳ روزه با دوزهای (۱۵۰ و ۵۰ میکرومولار) بیسفنول A و دوزهای مختلف ویتامین E ۹۳
- جدول ۳-۴: مقایسه میانگین قطر هسته در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان موش صحرائی در گروه‌های تیمار با بیسفنول A و ویتامین E با گروه کنترل ۹۵
- جدول ۳-۵: مقایسه میانگین درصد درجه آسیب وارده به DNA در سلول‌های مزانشیم مغز استخوان رت در گروه‌های تیمار با بیسفنول A و ویتامین E با گروه کنترل ۱۰۱
- جدول ۱۳-۵: جدول آنالیز واریانس دوطرفه ۱۲۱

فهرست شکل‌ها

- شکل ۱-۱: تمایز HSCs به سلول‌های خونی بالغ ۴
- شکل ۲-۱: توانایی سلول‌های همه توان و پر توان در تمایز به طیف وسیع سلولی ۶
- شکل ۳-۱: بخش‌های مختلف بلاستوسیس ۸
- شکل ۴-۱: تولید و روش کشت سلول‌های بنیادی جنینی ۹
- شکل ۵-۱: نمایی از ساختمان درونی مغز استخوان ۱۴
- شکل ۶-۱: ارتباط بین سلول‌های استخوانی و سلول‌های بنیادی خونساز ۱۶
- شکل ۷-۱: چند توانی سلول‌های بنیادی مزانشیم ۱۷
- شکل ۸-۱: تأثیر محیط پیرامونی بر عملکرد سلول‌های بنیادی ۱۹
- شکل ۹-۱: مدل شماتیک از تئوری نیچ سلول‌های بنیادی ۲۲
- شکل ۱۰-۱: مدل شماتیک از نیچ سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان ۲۵
- شکل ۱۱-۱: مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در طی تکوین ۳۶
- شکل ۱۲-۱: تصویری شماتیک از ویژگی‌های اصلی مورفولوژیکی و بیوشیمیایی آپوپتوز ۳۷
- شکل ۱۳-۱: مقایسه‌ی ژن‌های اولیه شناخته شده در کرم نماتود (*C.elegans*) و معادل آنها در دیگر جانداران ۳۹
- شکل ۱۴-۱: واکنش‌های آبخاری فعال شدن کاسپازها توسط گیرنده‌های مرگ (مسیر خارجی) ۴۰
- شکل ۱۵-۱: واکنش‌های آبخاری فعال شدن کاسپازها در مسیر میتوکندریایی (مسیر داخلی) و مسیر وابسته به گرانزیم B ۴۲
- ۱۶-۱: ساختار و چگونگی فعال شدن کاسپازها ۴۴
- شکل ۱۷-۱: ساختمان BPA ۴۸
- شکل ۱۸-۱: اشکال مختلف ویتامین E ۵۳
- شکل ۱-۲: رت نژاد ویستار ۶۱
- شکل ۲-۲: تصویر شماتیک از نحوه استخراج سلول‌های مغز استخوان ۶۲
- شکل ۳-۲: نمایی از لام نئوبار ۶۳
- شکل ۴-۲: شکافت MTT بر اثر آنزیم‌های میتوکندریایی ۶۵
- شکل ۵-۲: ساختار مولکولی هوست، پروپیدیوم آیوداید و آکریدین اورنژ ۶۹
- شکل ۶-۲: انواع مختلف دنباله در تکنیک کامت ۷۰
- شکل ۷-۲: ساختار مولکولی اتیدیوم برماید ۷۱
- شکل ۸-۲: رنگ آمیزی با تکنیک تانل ۷۳
- شکل ۹-۲: نواحی شکستگی DNA در آپوپتوزیس که بر روی ژل الکتروفورز به صورت قطعات نردبانی دیده می‌شود ۷۴
- شکل ۱۰-۲: نحوه ریختن محلول آگارز در Cast و خارج کردن شانه پس از بسته شدن ژل ۷۶
- شکل ۱۱-۲: نحوه load کردن نمونه‌ها در چاهک‌های ژل ۷۶
- شکل ۱۲-۲: تانک الکتروفورز ۷۷
- شکل ۱۳-۲: نحوه تکثیر DNA به روش PCR ۸۳
- شکل ۱-۳: مراحل رشد سلول‌های مزانشیمی طی پاساژهای مختلف ۸۸

- شکل ۳-۲: رنگ آمیزی فلورسنت پروپیدیوم آیداید در سلول‌های بنیادی مزانشیم پس از تیمار ۳ روزه با ویتامین E و بیسفنول A
- شکل ۳-۳: رنگ آمیزی فلورسنت هوخست در سلول‌های بنیادی مزانشیم پس از تیمار ۳ روزه با ویتامین E و بیسفنول A
- شکل ۳-۴: رنگ آمیزی فلورسنت آکریدین اورانژ در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان موش صحرایی، پس از تیمار ۳ روزه با ویتامین E و بیسفنول A
- شکل ۳-۵: بررسی میزان بیان ژن Bax در سلول‌های بنیادی مزانشیم
- شکل ۳-۶: بررسی میزان بیان ژن Bcl-2 در سلول‌های بنیادی مزانشیم
- شکل ۳-۷: میزان بیان ژن β -actin در سلول‌های بنیادی مزانشیم برای نرمال سازی
- شکل ۳-۸: تست تانل در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان موش صحرایی، پس از تیمار ۳ روزه با ویتامین E و بیسفنول A
- شکل ۳-۹: تست کامت در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان موش صحرایی پس از تیمار ۳ روزه با ویتامین E و بیسفنول A.
- شکل ۳-۱۰: درجه بندی سلول‌ها بر اساس طول و اندازه‌ی کامت
- شکل ۳-۱۱: طرح نردبانی در ژل الکتروفورز سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت پس از ۳ روز تیمار با بیسفنول A

فهرست علائم اختصاری

ACD/PCD	Apoptosis or active (Programed) cell death
AIF	Apoptosis inducing factor
ALP	Alkaline phosphatase
BeWo	Trophoblast cell line
BFU-E	Burst Forming Unit Erythroblasts
BMP4	Bone morphogenetic protein 4
BMP6	Bone morphogenetic protein 6
BMSCs	Bone Marrow Stem Cells
BPA	Bisphenol A
CARD	Caspase recruitment domain
CAT	Catalase
Ced-3	Cys-Protease=Caspase
CFU-E	Colony Forming Unit Erythroblasts
CFU-GEMM	Colony Forming Unit Granulocyte-Erythroid-Macrophage-Megakaryocyte
CLP	Common lymphoid progenitor
CMP	Common myeloid progenitor
CVD	Cardiovascular disease
DD	Death domain
DED	Death effector domain
Dhh	hedgehog desert
DISC	Death-inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ECM	Extracellular matrix
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EED	Environmental endocrine disruptors
EPH	Ephrins
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ESCs	Epidermal stem cells
FADD/Mort1	Fas-associated death domain
FBS	Fetal Bovin Serum
FGF2	Fibroblast growth factor 2
FSS	Fluid flow-induced shear stress
GPx	Glutation Proxidase
GrB	Granzyme B
HESCs	Human Embryonic stem cells
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen DR
HSCs	Hematopoietic stem cells
HT-22	Mouse hippocampal cell lines
IAPs	Inhibitor of apoptosis proteins
Ihh	Indian hedgehog

JNK	C-Jun N-terminal kinase
LPO	Lipid peroxidation
MAPKs	Mitogen-activated protein kinase
MC3T3-E1	Mouse osteoblastic cell line
MDA	Malondialdehyde
MHCII	Major histocompatibility complex class II
MNCs	Mononuclear cells
MSCs	Mesenchymal stem cells
Nanog	Nanog transcriptional factors
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
Omi /HTRA-2	A mitochondrial serine protease
OPN	Osteopontin
PBS	Saline Phosphate Buffer
PC12	A neuronal cell line
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMN	Polymorphonuclear leukocytes
RAW264.7	Mouse monocyte/macrophage cells
RGD	Arginine- Glycine-Aspartic acid (Arg-Gly-Asp)
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
Shh	Sonic-hedgehog
Smac/DIABLO	Second mitochondria-derived activator of caspases / also known as DIABLO
SOD	Superoxid Dismutase
TM4	line Immature mouse Sertoli cell
TNC	Tenascin-C
TNF	Tumor necrosis factor
UCB	Umbilical Cord Blood
UCBT	Umbilical Cord Blood Transplantation
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A

فصل اول:

مقدمه

و

مروری بر مطالعات گذشته

مقدمه

۱-۱. سلولهای بنیادی^۱

دست یافتن به یک تعریف قابل قبول جهانی برای "سلولهای بنیادی" چندان آسان نیست. با این وجود ویژگی‌های خاصی در موجودات پر سلولی بالغ و در حال تکوین وجود دارد که موجب تمایز و تشخیص سلولهای بنیادی از سایر سلولهای ساکن در بافت‌ها می‌شود. برای مثال، سلولهای بنیادی دارای یک ویژگی منحصر به فرد می‌باشند به طوری که می‌توانند متحمل تقسیمات نامتقارن سلولی شوند. به عبارت دیگر هر سلول بنیادی به یک سلول بنیادی و یک سلول پروژنیاتور^۲ (پیش‌ساز)، تقسیم می‌شود. سلول بنیادی حاصل از تقسیم، جمعیت سلولهای بنیادی را حفظ کرده و سلول پروژنیاتور، با فراهم شدن شرایط تمایز، متمایز می‌شود. بنابراین هیچ تغییری در تعداد کل سلولهای بنیادی حاصل نمی‌شود (۲ و ۱). این ویژگی ذاتی سلولهای بنیادی را می‌توان با یک مثال (تشکیل سلولهای خونی قرمز بالغ) روشن ساخت (شکل ۱-۱). سلولهای بنیادی خونساز^۳ (HSCs)، با استقرار در مغز استخوان، سلولهای بنیادی مسئول برای تولید همه‌ی انواع سلولهای خونی بالغ می‌باشند. پس از نخستین تقسیم، حاصل تقسیم سلولهای بنیادی خونساز یک سلول بنیادی مادر و یک سلول پروژنیاتور (پیش‌ساز) می‌باشد. سلول بنیادی مادر با خودنوزایی^۴ (خودتجدیدی) جمعیت سلولهای بنیادی را حفظ می‌کند و سلولهای پیش‌ساز توان خودنوزایی (خودتجدیدشوندگی) خود را از دست داده و به یک دودمان خاص سلولی متعهد می‌شوند. سلول پروژنیاتور متعهد به خدمت به‌عنوان پیش‌ساز سلولهای لنفوئیدی^۵ (CLP) یا پیش‌ساز سلولهای میلوئیدی^۶ (CMP) می‌شود. سلولهای بنیادی میلوئیدی تولیدکننده پیش‌سازهای گلبول‌های قرمز خونی، نوتروفیلی، ائوزینوفیلی، مونوسیتی،

۱- Stem cells

۲- Progenitor cell

۳- Hematopoietic stem cells

۴- Self renewing

۵- Common lymphoid progenitor or CLP

۶- Common myeloid progenitor or CMP

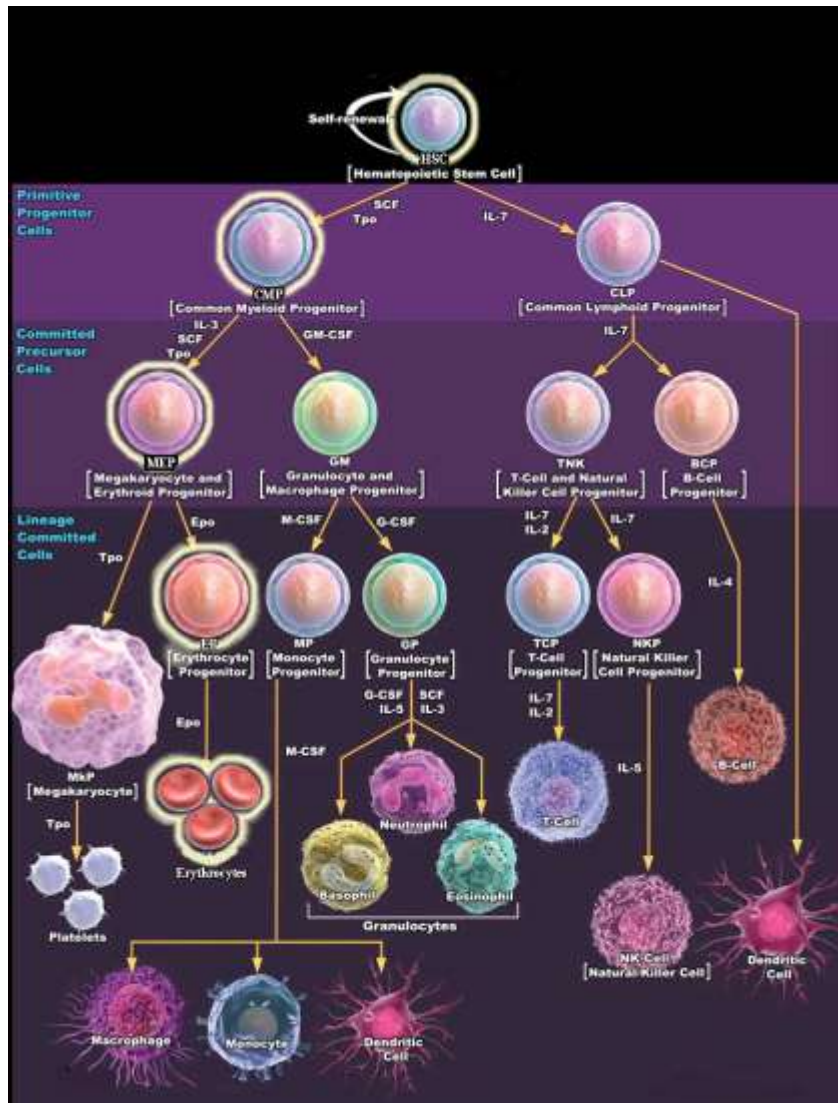
ماست سل‌ها، پلاکت‌ها، بازوفیل‌ها و سلول‌های دندریتیک هستند، در عوض سلول‌های بنیادی لنفوئیدی، پیش‌سازهای سلول‌های T، B و NK (سلول‌های کشنده طبیعی) می‌باشند.

CMFs مجدداً تقسیم می‌شوند و به پروژنیاتورهای تخصصی‌تر (واحدهای تشکیل دهنده کلونی گرانولوسیتی-اریتروئیدی - ماکروفاژ-مگاکاریوسیت^۱ CFU-GEMM) تبدیل می‌شوند که تنها قادر به تولید یک زیر مجموعه از سلول‌های میلوئیدی (گرانولوسیت‌های نوتروفیل و مونوسیت‌ها) و همچنین گلبول‌های قرمز و پلاکت‌ها می‌باشند. واحدهای تشکیل دهنده کلونی اریتروئیدی^۲ (BFU-E, CFU-E) پروژنیاتورهای مستقیم سلول‌های قرمز خون می‌باشند. متعاقب مراحل مختلف تمایز (proerythroblasts, orthochromatophil, erythroblasts, reticulocytes) CFU-E-S، تبدیل به گلبول‌های قرمز بالغ خواهند شد که قادر به حمل اکسیژن می‌باشند (۵-۳).

بر اساس تعاریف سنتی، سلول بنیادی به سلول تمایز نیافته‌ای اطلاق می‌شود که در محیط آزمایشگاه حداقل دو ویژگی تقسیمات مکرر خودتکثیری و توانایی تمایز به بیش از یک سلول و در محیط زنده توانایی ترمیم را از خود نشان داده است (۶). مفهوم سلول‌های بنیادی از قوانین حاکم بر تکوین جنین به دست آمده است. زیست‌شناسی تکوین شامل مطالعه فرآیندها و قوانینی است که تخم لقاح یافته را به ساختار و عملکرد پیچیده اندام‌های یک کودک کامل و سالم تبدیل می‌کند. در حقیقت یک سلول بنیادی را می‌توان یک "سلول مادر" نامید یعنی سلولی که می‌تواند مولد سلول‌های دیگر باشد. یک سلول بنیادی از دیدگاه دانشمندان به عنوان یک سلول تمایز نیافته با توانایی تکثیر، خودنوزایی و تولید دودمان‌های سلولی متفاوت در نظر گرفته می‌شود (۷).

۱- Colony Forming Unit Granulocyte-Erythroid-Macrophage-Megakaryocyte or CFU-GEMM

۲-Burst Forming Unit Erythroblasts (BFU-E) and Colony Forming Unit Erythroblasts (CFU-E)



شکل ۱-۱: توانایی خودنوزایی و پتانسیل تمایز در سلول‌های بنیادی (تمایز HSCs به سلول‌های خونی بالغ؛ مسیر تمایز این سلول‌ها به دودمان گلبول‌های قرمز با رنگ زرد مشخص شده است). www.biolegend.com website:

۱-۱-۱. دسته‌بندی سلول‌های بنیادی بر حسب قابلیت تمایزی آن‌ها:

سلول‌های بنیادی بر حسب قابلیت تمایز به پنج گروه تقسیم شده:

۱-۱-۱-۱. همه توان! این سلول‌ها در رأس سلول‌های بنیادی قرار دارند و جزء اولین سلول‌هایی می-

باشند که در جنین شکل گرفته‌اند. این سلول‌ها توانایی تولید سه لایه‌ی آندودرم، مزودرم، اکتودرم،