بسم الله الرحمن الرحيم

١٠٣٤٩٦

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم پزشکی

رساله دوره دکتری تخصصی (Ph.D) رشته بیوشیمی بالینی

عنوان

بررسی تغییرات بیان پروتئینی بتا ـ کاتنین و گیرنده فاکتور رشد سلولهای آندوتلیال (VEGFR2) در مسیر تمایزی شبکه مویرگی تشکیل یافته از سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان

نگارش

مریم جزایری

استاد راهنما:

جناب آقای دکتر عبدالامیر علامه

استاد مشاور:

جناب آقای دکتر مسعود سلیمانی

۱۳۸۷ /۷/ ۱۷

تیر ماه ۱۳۷۸

۱۰۳۴۹۶

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

خانم / آقای **مریم جزایری** رساله **دکتری** واحدی خود را با عنوان : **" بررسی تغییرات بیان پروتئینی بتا – کاتنین و گیرنده فاکتور رشد سلولهای آندوتلیال (VEGFR2) در مسیر تمایزی شبکه مویرگی تشکیل یافته از سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان "** در تاریخ ۸۷/٤/۱٦ ارائه کردند. **اعضای هیأت داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تأیید کرده است و پذیرش آنرا** برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می کنند .

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	امضاء
۱- استاد راهنما	دکترعبدالامیر علامه	
۲-استاد مشاور	دکتر مسعود سلیمانی	
۳-استاد ناظر	دکتر منصوره موحدین	
٤-استاد ناظر	دکتر محمد جواد رسایی	
٥-استاد ناظر	دکتر دردی قوچق	
٦-استاد ناظر	دکتر کامران علی مقدم	
۷-نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر سید علیرضا مصباح	

۱۳۸۷ /۷/ ۱۷

آئین نامه پایان نامه (رساله) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس مبین بخشی از فعالیتهای علمی ـ پژوهشی دانشگاه است .بنابراین به منظورآگاهی و رعایت حقوق دانشگاه ، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود ،مراتب را قبلا به طور 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 پایان نامه کارشناسی ارشد / رساله دکتری نگارنده دررشته بیوشیمی بالینی است که در سال ۱۳۸۷ دردانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی [illegible] ، مشاوره [illegible] از آن دفاع شده است."

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

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

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

ماده ۶: اینجانب مریم حیدری دانشجوی رشته بیوشیمی بالینی مقطع دکتری تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده ، به آن ملتزم می شوم.

نام ونام خانوادگی مریم حیدری

تاریخ و امضا

۸۷/۴/۱۷

دستورالعمل حق مالکیت مادي و معنوي در مورد نتایج پژوهشهاي علمي
دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست های پژوهشی 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 هیات علمی، دانشجویان ، دانش آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی تحت عناوین پایان نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی که با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده ۱- حقوق مادی و معنوی پایان نامه ها/ رساله های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هر گونه بهره برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین نامه ها و دستورالعمل های مصوب دانشگاه باشد.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما مسئول مکاتبات مقاله باشند.
تبصره: در مقالاتی که پس از دانش آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان نامه/ رساله نیز منتشر می شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و بر اساس آئین نامه های مصوب انجام می شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره های ملی، منطقه ای و بین المللی حاصل از نتایج مستخرج از پایان نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸٤/٤/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم الاجرا است و هر گونه تخلف از مفاد این دستورالعمل، از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

نام و نام خانوادگی : مریم حراسی
تاریخ و امضاء : ۸۷/۴/۱۷

تقدیم به:

مظهر همه خوبیها

برادر عزیزم

دکتر سید حمید جزایری

تشکر و قدردانی

با سپاس خدای حکیم و علیم که توفیق این تحقیق را نصیبم کرد، شایسته است صمیمانه ترین تشکرات خود را به حضور عزیزان بزرگواری که مرا در این پژوهش یاری نموده اند، تقدیم دارم.

بالاخص از:

- استاد گرامی جناب آقای دکتر علامه که با راهنمایی های ارزشمند خود روشنگر مسیر این پژوهش بوده اند.
- استاد ارجمند جناب آقای دکتر سلیمانی که با خلوص نیت از هر گونه مشاورت و مساعدت دریغ نکردند.
- اساتید و مدیریت محترم گروه های بیوشیمی و هماتولوژی آقایان جناب دکتر مصباح و جناب دکتر کاویانی و نیز کارشناس گروه هماتولوژی سرکار خانم رهنمایی و نیز کارشناسان گروه بیوشیمی سرکار خانمها اعتمادی، افشار و بنا صادق.
- مرکز پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی، بخش فلوسیتومتری سازمان انتقال خون ایران سرکار خانم دکتر نیکوگفتار، بخش آزمایشگاه حیوانات بیمارستان امام خمینی جناب آقای دکتر امانپور، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه شهید بهشتی جناب آقای دکتر کاظمی، بخش پاتولوژی بیمارستان بقیه الله جناب آقای دکتر نصیری ، بخش میکروسکوپ الکترونی دانشگاه شهید بهشتی جناب آقای پیریایی و انستیتو پاستور ایران جناب آقای دکتر خلج و سرکار خانم عنایتی.
- و نیز خانواده عزیزم

چکیده

سلولهای بنیادین مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان (hBMSCs) توانایی بالقوه ای در تمایز به برخی از سلولها نظیر سلولهای چربی، استخوانی و کبدی را دارند. هدف از این مطالعه، در مرحله اول بهینه سازی شرایط کشت سلول جهت تمایز سلولهای مزانشیمال مغز استخوان به سلولهای آندوتلیال و سپس ارزیابی بیان شاخصهای اختصاصی آندوتلیال جهت تایید سلولهای تمایز یافته و تغییرات بیان پروتئینی بتا- کاتنین در طی روند تمایز بود. هدف بعدی توانایی سلولهای آندوتلیال تمایز یافته در تشکیل شبکه مویرگی در *in vitro* و *in vivo* و نیز تغییرات فراساختاری در سلولهای تمایز یافته می باشد.

بدین منظور ابتدا سلولهای مزانشیمی از مغز استخوان افراد سالم اهدا کننده جداسازی شدند و تایید حضور مارکرهای سطحی آنها توسط روش فلوسیتومتری انجام شد. سپس بهینه سازی شرایط کشت تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی به سلولهای آندوتلیال در حضور فاکتور رشد آندوتلیال عروقی (VEGF) و فاکتور رشد شبه انسولین (IGF-1) انجام گردید. جهت تائید سلولهای تمایز یافته از روشهای ایمونوسیتوشیمی، فلوسیتومتری و RT-PCR استفاده شد و روشهای الایزا، وسترن بلات و فلوسیتومتری برای تعیین تغییرات بیان پروتئین بتا- کاتنین در روزهای مختلف تمایز مورد استفاده قرار گرفتند. سپس قابلیت سلولهای تمایز یافته در ایجاد شبکه مویرگی (توبولوژنز) روی بستر ژل ماتریکس خارج سلولی(ECM) در in vitro بررسی شد و نیز تغییرات فراساختاری سلولها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه in vivo ، سلولهای تمایز یافته ٢٤ ساعت قبل از تزریق به بافت زیر جلدی موش Nude-scid با مارکر BrdU نشاندار شدند و پس از یک ماه، از نمونه های بافتی رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی double staining به عمل آمد.

سلولهای بنیادین مزانشیمی مشتق از مغز استخوان توانایی بیان مارکرهای CD105, CD44, CD166 را داشتند. شرایط بهینه تمایز سلولهای مزانشیمی به سلولهای آندوتلیال شامل محیط (٢٠ng/ml) IGF-1، (٥٠ng/ml) VEGF، (٥٪) FBS، MCDB131 است. سلولهای آندوتلیال تمایز یافته قادر به بیان مارکرهای اختصاصی آندوتلیال نظیر فاکتور فون ویلبراند (vWF) ، گیرنده فاکتور رشد آندوتلیال عروقی (VEGFR2) ، CD31، FLT-1، Tie2 و VE-cadherin بودند. همچنین تفاوت معنا داری (٠/٠٥ >P) در مقادیر بتا-کاتنین بین سلول‌های تمایز یافته در روزهای مختلف تمایز و نیز سلولهای مزانشیمال مشاهده شد. حدود ٨٥٪ سلولهای تمایز یافته توانایی تشکیل شبکه شبه مویرگی را روی بستر نیمه جامد ECM دارا بودند و نیز مطالعات فراساختاری سلول‌های تمایز یافته نشان داده بود که

این سلولها دارای ارگانلهای اختصاصی آندوتلیال نظیر اجسام Weibel-Palade bodies (WP) و Caveolae می باشند. همچنین سلول‌های تمایز یافته توانایی شرکت در توبولوژنز را در سیستم in vivo دارا بودند.

نتایج بدست آمده حاکی از آن است که ویژگیهای بیوشیمیایی و مرفولوژیکی سلولهای آندوتلیال تمایز یافته از سلولهای بنیادین مزانشیمی در ارتباط با خصوصیات فراساختاری سلولهایی است که توانایی تشکیل شبکه های مویرگی را دارند. از سویی دیگر کاهش بیان پروتئین بتا ـ کاتنین همزمان با تمایز به عنوان شاخصی برای شروع تمایز می باشد.

کلمات کلیدی: سلول بنیادی مزانشیمی، سلول آندوتلیال، رگزایی، تمایز، توبولوژنز، بتا- کاتنین

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول - مقدمه

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۲- سلولهای پیش‌ساز آندوتلیال ٤

۱-۳- تعریف سلول بنیادین ٥

۱-٤- اهمیت سلول بنیادین ٥

۱-٥- طبقه‌بندی سلول بنیادی ٦

۱-٥-۱- سلولهای بنیادی جنینی ٦

۱-٥-۲- سلولهای بنیادی بالغ ۷

۱-٦- منشاء سلولهای بنیادین بالغ ۷

۱-٦-۱- مغز استخوان ۹

۱-۷- سلولهای بنیادی خونساز (HSCs) ۱۰

۱-۷-۱- مارکرهای سطحی سلول HSC ۱۰

۱-۸- سلولهای پیش‌ساز آندوتلیال (EPC) ۱۱

۱-۹- سلول پیش‌ساز چند ظرفیتی (MAPCs) ۱۲

۱-۱۰- سلولهای بنیادی مزانشیمی (MSCs) ۱۳

۱-۱۰-۱- ماهیت MSCs ۱٤

۱-۱۰-۲- مارکرهای سطحی MSCs ۱٥

۱-۱۰-۳- خصوصیات عملکردی و ظرفیت‌های تمایزی سلولهای بنیادی مزانشیمی ۱٦

۱-۱۰-٤- جداسازی و کشت MSCs ۱۷

۱-۱۱- عوامل مؤثر بر مهاجرت و تمایز سلولهای بنیادین ۱۷

۱-۱۲- بیوشیمی سلولهای آندوتلیال ۲۰

۱-۱۲-۱- نقش سلولهای آندوتلیال در آنژیوژنز ۲۱

۱-۱۲-۲- نقش ضد انعقادی و ضد لخته‌ای سلولهای آندوتلیال ۲٤

۱-۱۲-۳- نقش سلولهای آندوتلیال در انعقاد ۲٥

۱-۱۲-٤- نقش سلولهای آندوتلیال در کنترل کشش عروقی ۲٦

۱-۱۲-٥- نقش مولکول‌های چسبنده در بیولوژی سلولهای آندوتلیال ۲۷

۱-۱۲-٦- سیتولوژی سلولهای آندوتلیال ۲۸
۱-۱۳- بیوشیمی مولکول β-catenin ۳۰
۱-۱٤- Wnt β-catenin Signaling در آنژیوژنز ۳۱
۱-۱۵- کاربرد کلینیکی MSCs ۳۳

فصل دوم – مواد و روشها

۲-۱- مواد وسایل ۳۷
۲-۱-۱- مواد مورد نیاز ۳۷
۲-۱-۲- وسایل مورد نیاز ۳۹
۲-۳- محلول‌ها و بافرهای مورد نیاز ٤۱
۲-۳-۱- روش تهیه PBS بدون کلسیم و منیزیم (pH =۷/۳) ٤۱
۲-۳-۲- محلول تریپسین ـ EDTA (pH =۷/۳) ٤۱
۲-۳-۳- طرز تهیه بافر PBS حاوی EDTA ٤۲
۲-۳-٤- تهیه رنگ تریپان بلو ٤۲
۲-٤- طرز تهیه محیط‌های کشت سلولی و فاکتورهای رشد مورد نیاز ٤۲
۲-٤-۱- طرز تهیه محیط کشت DMEM ٤۲
۲-٤-۲- طرز تهیه محیط کشت MCDB131 ..... ٤۳
۲-٤-۳- تهیه و آماده سازی فاکتورهای رشد ٤۳
۲-٤-۳-۱- تهیه محلول ذخیره (stock) فاکتور رشد VEGF ٤٤
۲-٤-۳-۲- تهیه محلول ذخیره (stock) فاکتور رشد IGF-1 ..... ٤٤
۲-۵- جداسازی سلولهای بنیادین مزانشیمی مغز استخوان انسان (hBMSCs) ٤٤
۲-۵-۱- نمونه آسپیره مغز استخوان ٤٤
۲-۵-۲- جداسازی سلولهای تک هسته‌ای از نمونه آسپیره مغز استخوان ٤۵
۲-۵-۳- جداسازی و کشت سلولهای بنیادی مزانشیمی ٤٦
۲-۵-٤- تعیین مارکرهای سطحی سلولهای بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان ٤٦
۲-۵-٦- انجماد سلولها ٤۷
۲-۵-۷- پاساژ سلولهای منجمد ٤۷
۲-۵-۸- شمارش سلولی ٤۷
۲-۵-۹- تعیین درصد زنده بودن سلولها (Viability test) ٤۸
۲-۵-۱۰- تعیین رشد سلولهای بنیادی مزانشیمی با استفاده از روش MTT ٤۸
۲-۵-۱۱- کشت سلولهای بنیادی مزانشیمی در محیط‌های کشت ویژه تمایز ٤۹
۲-۵-۱۱-۱- تمایز سلولهای بنیادی به سلولهای بافت چربی (آدیپوسیت) ٤۹
۲-۵-۱۱-۲- تمایز سلولها بنیادی به سلولهای بافت استخوانی (استئوبلاست) ۵۰

۲-٦- تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی به سلولهای آندوتلیال ۵۰
۲-٦-۱- بهینه‌سازی محیط کشت سلولی مناسب جهت تمایز سلولهای آندوتلیال ۵۰
۲-٦-۲- بهینه‌سازی غلظت مناسب فاکتور رشد VEGF جهت تمایز سلولهای آندوتلیال ۵۱
۲-۷- تأیید تمایز سلولهای آندوتلیال ۵۲
۲-۷-۱- روش ایمونوسیتوشیمی مارکرهای اختصاصی آندوتلیال ۵۲
۲-۷-۲- ارزیابی بیان مارکرهای اختصاصی آندوتلیال در سلولهای تمایز یافته از سلولهای بنیادی مزانشیمی با استفاده از روش فلوسایتومتری : ۵۳
۲-۷-۳- ارزیابی بیان ژنی مارکرهای اختصاصی آندوتلیال در سطح mRNA با استفاده از روش RT-PCR ۵۵
۲-۷-۳-۱- استخراج RNA ۵۵
۲-۷-۳-۱-۱- فرایند حذف RNase ۵۵
۲-۷-۳-۱-۲- استخراج RNA از سلولهای تمایز یافته ۵٦
۲-۷-۳-۲- واکنش پلیمراز معکوس (RT) ۵۷
۲-۷-۳-۳- فرایند PCR ۵۸
۲-۷-۳-٤- بهینه‌سازی PCR مربوط به هر ژن ٦۰
۲-۷-۳-۵- الکتروفورز محصولات PCR ٦۱
۲-۷-۳-٦- بهینه سازی شرایط درجه حرارت هیبرید شدن پرایمرها با DNA الگو ٦۲
۲-۸- سنجش میزان β-Catenin به روش الایزا ٦۳
۲-۸-۱- لیز کردن غشاء سلوهای کشت داده شده با استفاده از بافرلیز کننده ٦۳
۲-۸-۲- ارزیابی بیان پروتئینی β-Catenin با استفاده از کیت الایزا ٦٤
۲-۹- ارزیابی بیان پروتئینی β-Catenin در سلولهای تمایز یافته با استفاده از روش وسترن بلات ٦٦
۲-۹-۲- انتقال پروتئین به ورق نیتروسلولز ٦۸
۲-۹-۳- رنگ‌آمیزی ایمونولوژیکی پروتئین‌های انتقال یافته به روی ورق نیتروسلولز ٦۹
۲-۱۰- بررسی مدل شبکه مویرگی تشکیل یافته از سلولهای آندوتلیال تمایز یافته از سلولهای مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در شرایط in vitro ٦۹
۲-۱۰-۱- ارزیابی رگزایی (آنژیوژنز یا توبولوژنز) در مدل in vitro ۷۱
۲-۱۱- ارزیابی تغییرات فراساختاری سلولهای آندوتلیال تمایز یافته از سلولهای بنیادین مزانشیمی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (TEM) ۷۲
۲-۱۱-۱- آماده سازی سلول‌ها ۷۲
۲-۱۱-۲- آماده سازی نمونه ها جهت مشاهده با میکروسکوپ الکترونی ترانسمیشن: ۷۲
۲-۱۲- بررسی شبکه مویرگی تشکیل یافته از سلولهای آندوتلیال تمایز یافته از سلولهای مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در شرایط in vivo ۷٤

۲-۱۲-۱- تهیه و آماده سازی سلولهای آندوتلیال تمایز یافته (سلولهای مزانشیمی القاء شده) جهت تزریق به موش (Nude mice) ۷۵
۲-۱۲-۲- تزریق سلولهای القاء شده به موش ۷۵
۲-۱۲-۳- طرز تهیه نمونه‌های بافتی ۷۵
۲-۱۲-٤- رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی توأم BrdU و عروقی (Double Staining) ۷٦
۲-۱۲-٤-۱- رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی برای شناسایی مارکر BrdU ۷٦
۲-۱۲-٤-۲- رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی برای شناسایی مارکر VWF ۷۷
۲-۱۳- آنالیز آماری ۷۸

فصل سوم - نتایج

۳-۱- نتایج حاصل از جداسازی و تایید سلولهای بنیادین مزانشیمی ۸۲
۳-۱-۱- درصد زنده بودن سلولهای بنیادی قبل از کشت ۸۲
۳-۱-۲- تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیمی جدا شده از نمونه مغز استخوان ۸۲
۳-۱-۳- فلوسایتومتری سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان ۸۵
۳-۱-٤- بررسی قابلیت تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی به سایر رده های سلولی ۸۹
۳-۲- بهینه‌سازی شرایط کشت سلولی جهت تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلولهای آندوتلیال ۹۲
۳-۲-۱- بهینه‌سازی محیط پایه کشت سلولی مناسب جهت تمایز به سلولهای آندوتلیال ۹۲
۳-۲-۲- بهینه‌سازی غلظت مناسب فاکتور تمایز دهنده VEGF در محیط کشت تمایزی ۹٤
۳-۳- تأیید تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی به سلولهای آندوتلیال ۹٦
۳-۳-۱- نتایج حاصل از آنالیز فلوسیتومتری سلولهای آندوتلیال تمایز یافته از سلولهای مزانشیمی ۹۷
۳-۳-۲- ایمونوسیتوشیمی سلولهای آندوتلیال تمایز یافته از سلولهای مزانشیمی ۹۹
۳-۳-۳- بیان ژنهای اختصاصی مارکرهای آندوتلیال در سلولهای تمایز یافته ۱۰۲
۳-۳-٤- بررسی بیان پروتئینی VEGFR2 در سلولهای آندوتلیال تمایز یافته در روزهای مختلف تمایز با استفاده از روش فلوسیتومتری ۱۰٦
۳-۳-۵- بررسی بیان پروتئینی CXCR4 در سلولهای آندوتلیال تمایز یافته در حضور وغیاب فاکتور IGF-1 با استفاده از روش فلوسیتومتری ۱۰۸
۳-٤- بیان β-Catenin در سلولهای آندوتلیال تمایز یافته ۱۰۹
۳-٤-۱- ارزیابی میزان بیان β-Catenin در روزهای مختلف تمایز سلولهای آندوتلیال با استفاده از روش الایزا . ۱۰۹
۳-٤-۲- بررسی بیان β-Catenin در سلولهای آندوتلیال تمایز یافته در روزهای مختلف تمایز با استفاده از روش وسترن بلات و فلوسیتومتری ۱۰۹
۳-۵- توانایی سلولهای آندوتلیال تمایز یافته در ایجاد شبکه شبه مویرگی (توبولوژنز) در سیستم in vitro ۱۱٤
۳-۵-۱- تاثیر نوع بستر بر میزان آنژیوژنز سلولهای آندوتلیال تمایز یافته و تشکیل شبکه مویرگی در روز دوازدهم تمایز ۱۱٤

۳-٦- مشاهدات میکروسکوپ الکترونی ۱۱۸
۳-۷- توانایی سلولهای آندوتلیال تمایز یافته در ایجاد شبکه مویرگی (توبولوژنز) در سیستم in vivo ۱۲٦

فصل چهارم - بحث

٤-۱- بررسی تمایز سلولهای مزانشیمی مغز استخوان به سلولهای آندوتلیال ۱۳۲
٤-۲- بررسی نقش فاکتورهای رشد در تمایز و تاثیر بیان برخی شاخصها در عملکرد سلولهای آندوتلیال ۱۳٤
٤-۳- بررسی نقش بتا-کاتنین در فرایند تمایز و شکل گیری سلولهای آندوتلیال ۱۳۷
٤-٤- بررسی ارتباط بین افزایش بیان شاخصها و تغییرات فراساختاری سلول ۱۳۹
٤-۵- توبولوژنز سلولهای آندوتلیال تمایز یافته در سیستم *in vitro* و *in vivo* ۱٤۲
منابع ۱۳۰

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۲ محصولات سلول آندوتلیال ۲۰

جدول ۲-۱: گروههای تیمار شده با محیط‌های کشت سلولی مختلف ۵۱

جدول ۲-۲: گروههای تیمار شده با غلظتهای متفاوت فاکتور تمایزی ۵۲

جدول ۲-۳: پرایمرهای مورد استفاده در RT-PCR ۶۲

جدول ۲-٤: گروههای تحت تیمار با محیط‌های نیمه جامد القاء کننده توبولوژنز ۷۱

جدول ۳-۱- تعیین غلظت پروتئین β-catenin در روزهای مختلف تمایز سلولهای آندوتلیال بوسیله روش الایزا..... ۱۱۰

فهرست شکلها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱ تغییرات مربوط به هوستاز بین عوامل پروآنژیوژنیک و آنتی آنژیوژنیک. ۴
شکل ۱-۲ انواع بافتهای دارای سلولهای بنیادی و قابلیت تمایز سلولهای بنیادی بالغ ۸
شکل ۱-۳ منشا و تمایز سلولهای پیش ساز آندوتلیال شامل سلولهای بنیادی خونساز و غیر خونساز..... ۱۳
شکل ۱-٤- مکانیسم احتمالی بکارگیری سلولهای مغز استخوان در ایسکمی بافتی. ۱۹
شکل ۱-٥- آندوتلیوم و کنترل هموستاز عروقی. ۲۱
شکل ۱-٦ مسیر انتقال پیام (signaling) برایVEGFs..... ۲۴
شکل ۱-۷ تصویر ساده‌ای از مسیر A Wnt signaling) در غیاب یک سیگنال Wnt یا زمانیکه Wnt به وسیله یک مهار کننده نظیر FRP مهار می‌گردد. B) هنگامیکه Wnt سبب غیر فعال کردن کمپلکس فسفریلاسیون شده و نهایتا منجر به تجمع β-catenin می‌شود. ۳۲
شکل۳-۱- سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان. ۸۳
شکل۳-۲-۱- تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان به سلولهای چربی. ۹۰
شکل۳-۲-۲- تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان به سلولهای استخوانی. ۹۱
شکل ۳-۳-۱- ایمونوسیتوشیمی VEGFR2 جهت تایید تمایز سلولهای آندوتلیال تمایز یافته..... ۱۰۰
شکل ۳-۳-۲- ایمونوسیتوشیمی VWF و CD31 در سلولهای آندوتلیال تمایز یافته..... ۱۰۱
شکل ۳-٤- RT-PCR مارکرهای اختصاصی آندوتلیال در سلولهای آندوتلیال ورید بند ناف انسان..... ۱۰۳
شکل ۳-٥- RT-PCR مارکرهای اختصاصی آندوتلیال در سلولهای بنیادی مزانشیمی..... ۱۰۴
شکل ۳-٦- RT-PCR مارکرهای اختصاصی آندوتلیال در سلولهای آندوتلیال تمایز یافته از سلولهای مزانشیمی. ۱۰۵
شکل ۳-۷- وسترن بلاتینگ β-catenin ۱۱۲
شکل ۳-۸- تشکیل شبکه مویرگی توسط سلولهای آندوتلیال تمایز یافته بر روی ژل ECM در روز دوازدهم تمایز ۱۱۷
شکل ۳-۹- مطالعه فراساختاری سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان (قبل از تمایز)..... ۱۱۹
شکل ۳-۱۰- مطالعه فراساختاری سلولهای آندوتلیال تمایز یافته از سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان ۱۲۰
شکل ۳-۱۱- آنژیوژنز در in vivo با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (بزرکنمایی X ۸۰). ۱۲۷
شکل ۳-۱۲- ایجاد آنژیوژنز توسط سلولهای آندوتلیال تمایز یافته از سلولهای بنیادی مزانشیمی در in vivo با استفاده از رنگ آمیزی Double staining (بزرگنمایی X ۲۰۰)..... ۱۲۸
شکل ۳-۱۳- بررسی آنژیوژنز در نمونه بافت کنترل با استفاده از رنگ آمیزی Double staining (بزرگنمایی X ۲۰۰). ۱۲۹

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار ۳-۱- تعیین میزان رشد سلولهای بنیادی مزانشیمی با استفاده از روش MTT ۸۴
نمودار ۳-۲-۱- تایید سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان بوسیله آنالیز فلوسیتومتری. ۸۶
نمودار ۳-۲-۲- تایید سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان. ۸۷
نمودار ۳-۳- تایید سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان..... ۸۸
نمودار ۳-٤- مقایسه میزان توبولوژنز در حضور محیطهای پایه کشت سلولی مختلف..... ۹۳
نمودار ۳-۵- بررسی توبولوژنز در حضور غلظتهای متفاوت القاگر VEGF ۹۵
نمودار ۳-٦-۱- تایید مارکرهای اختصاصی آندوتلیال در سلولهای تمایز یافته توسط روش فلوسیتومتری. ۹۷
نمودار ۳-٦-۲- بررسی مارکرهای اختصاصی آندوتلیال توسط روش فلوسیتومتری. ۹۸
نمودار ۳-۷- تغییرات بیان VEGFR2 در روزهای مختلف تمایز سلولهای آندوتلیال مشتق از سلولهای بنیادی مزانشیمی. ۱۰۷
نمودار ۳-۸- تغییرات بیان CXCR4 در سلولهای آندوتلیال تمایز یافته ۱۰۸
نمودار ۳-۹- نمودار خطی استاندارد پروتئین β-catenin ۱۱۰
نمودار ۳-۱۰- ارزیابی تغییرات بیان پروتئینی β-catenin در روزهای مختلف تمایز(روز های ۷، ۵، ۳). ۱۱۱
نمودار ۳-۱۱- فلوسیتومتری β-catenin. ۱۱۳
نمودار ۳-۱۲- مقایسه میزان توبولوژنز در سلولهای مزانشیمی (MSC) بر روی بسترهای کلاژن، فیبرونکتین و ژل ECM ۱۱۵
نمودار ۳-۱۳- مقایسه میزان توبولوژنز در سلولهای مزانشیمی تمایز یافته بر روی بسترهای کلاژن، فیبرونکتین و ECM gel ۱۱۶

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه

رگزایی (آنژیوژنز)[1] فرآیندی ضروری برای رشد رویان، اندام زایی[2]، ترمیم زخم، سیکل‌های دستگاه تولید مثل مؤنث و همچنین تومورزایی می‌باشد [۱]. بر اساس اطلاعات موجود فاکتورهای رشد آندوتلیال عروقی (VEGF)[3] تنظیم کننده اصلی آنژیوژنز هستند [۱]. رگ سازی (vasculogenesis) تشکیل عروق خونی از سلولهای پیش‌ساز آندوتلیال است و آنژیوژنز فرآیند تشکیل عروق خونی جدید از عروق قبلی است [۲]. تغییر ساختار[4] غیرطبیعی عروق می‌تواند ناشی از بیماریهای موروثی باشد. علاوه بر این، رشد ناکافی و غیر طبیعی رگها نه تنها باعث ایسکمی قلبی و مغزی می‌شود بلکه منجر به تخریب سلولهای عصبی، افزایش فشار خون، مسمومیت حاملگی (پره اکلامسی)، زجر (دیسترس) تنفسی، پوکی استخوان (استئوپورزیس) و اختلالات دیگر می‌گردد (جدول ۱-۱) [۲]. همچنین عدم تعادل بین عوامل تحریک کننده و مهار کننده آنژیوژنز منجر به اختلالات پاتولوژیکی می‌شود. پاسخهای آنژیوژنیک می‌توانند به صورت فیزیولوژیکی مانند ترمیم زخم یا به صورت پاتولوژیکی نظیر رشد تومور باشند (شکل ۱-۱) [۳].

شواهد نشان می‌دهند که پیش سازهای سلولهای آندوتلیال در رشد عروق رویان و نیز در بافتهای دچار ایسکمی فرد بالغ نقش دارند و حتی طی فرآیندی به نام رگ زایی درمانی (therapeutic vasculogenesis) رشد رگها را در بافتهای دچار کمبود اکسیژن می‌توانند تحریک نمایند [۵ و ٤].

1. Angiogenesis
2. Organogenesis
3. Vascular Endothelial Growth Factor
4. Remodeling

جدول ۱-۱ بیماریهای مرتبط با کمبود یا فقدان آنژیوژنز

نوع ارگان	بیماری	مکانیسم آنژیوژنیک
سیستم عصبی	بیماری آلزایمر	تخریب عروق کوچک و آنژیوپاتی مغزی بدلیل از بین رفتن سلولهای آندوتلیال
	نروپاتی دیابتی	تخریب آکسونها بدلیل تولید ناکافی VEGF
	سکته	تخریب عروق مغزی
عروق خونی	آترواسکروزیس	آسیب رشد و توسعه عروق خونی
	افزایش فشار خون	نقص در اتساع عروق خونی یا آنژیوژنز
	دیابت	آسیب رشد عروق در اندام‌های تحتانی ایسکمی شده
دستگاه گوارش	زخم معده	تأخیر در ترمیم زخم بدلیل تولید مهار کننده‌های آنژیوژنز بوسیله پاتوژنها
	بیماری Crohn	ایسکمی مخاطی
پوست	ریزش مو	تأخیر در رشد مو بدلیل مهار کننده‌های آنژیوژنز
	پورپورآی پوستی، تلانژکتازیا	کاهش تعداد عروق وابسته به سن بدلیل کوتاه شدن تلومرهای سلولهای آندوتلیال
دستگاه تولید مثل	مسمومیت حاملگی	اختلال عملکرد سلولهای آندوتلیال در عضو آسیب دیده، ایجاد لخته و افزایش فشارخون بدلیل کمبود VEGF
	خونریزی رحم	شکنندگی عروق خونی بدلیل کاهش تولید Ang-1
ریه	سندروم زجر تنفسی نوزادی	نارس بودن ریه‌ها و کمبود تولید سورفاکتانت بدلیل کاهش HIF و VEGF
	فیبروز ریوی	آپوپتوز سلولهای آندوتلیال آلوئلی بدلیل مهار VEGF
کلیه	نفروپاتی	کاهش عروق وابسته به سن
استخوان	پوکی استخوان، آسیب ترمیم شکستگی استخوان	آسیب تشکیل استخوان بدلیل کاهش آنژیوژنز وابسته به VEGF جلوگیری از ترمیم شکستگی بوسیله مهار کننده‌های آنژیوژنز