بسم الله الرحمن الرحیم

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

خانم بی بی صفورا خواجه نیازی رشته **بیوشیمی بالینی** رساله **دکتری** خود را با عنوان **« بررسی ارتباط بین بیان سیکلواکسیژناز ۲ با فاکتورهای ترمیم مولکولی در خلال تمایز هپاتوسیتها از سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از خون بندناف انسان »** در تاریخ **۱۳۹۲/۴/۲۵** ارائه کردند.

بدینوسیله 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 راهنما	دکتر عبدالامیر علامه	
استاد مشاور	دکتر اسماعیل مرتاض	
استاد مشاور	دکتر مسعود سلیمانی	
استاد ناظر	دکتر عباس صاحبقدم لطفی	
استاد ناظر	دکتر محمد جواد رسایی	
استاد ناظر	دکتر محمد جعفر آی	
استاد ناظر	دکتر محسن فیروز رای	
نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر علی رضا 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 می‌باشد 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 می‌باشد.

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 دانشکده‌ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده‌ها، 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 یافته‌ها 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 صفورا خواجه نیازی دانشجوی رشته بیوشیمی بالینی ورودی سال تحصیلی ۱۳۸۷ مقطع دکتری دانشکده علوم پزشکی متعهد می‌شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش‌های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته‌های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می‌دهم 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 ».

نام و نام خانوادگی صفورا خواجه نیازی

تاریخ و امضا

۹۲/۶/۱۰

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 صفورا خواجه نیازی در رشتهبیوشیمی بالینی است که در سال در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی دکتر عبدالامیر علامه، مشاوره دکتر مسعود سلیمانی و دکتر اسماعیل مرتاض 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 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 ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶: اینجانب صفورا خواجه نیازی دانشجوی رشته بیوشیمی بالینی مقطع دکتری تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی صفورا خواجه نیازی

تاریخ و امضا

۹۲/۶/۱۰

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

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

عنوان

بررسی ارتباط بین بیان سیکلواکسیژناز۲ با فاکتورهای ترمیم مولکولی در خلال تمایز هپاتوسیتها از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون بند ناف انسان

نگارش

صفورا خواجه نیازی

استاد راهنما

دکتر عبدالامیر علامه

اساتید مشاور

دکتر مسعود سلیمانی

دکتر اسماعیل مرتاض

تابستان ۱۳۹۲

تقدیم به:

پدر و مادر عزیزم؛

که هرچه دارم از لطف و محبت بی دریغ آنهاست.

خواهر و برادرانم؛

و سایر بستگانی که همیشه لطفشان شامل حالم بوده است.

تشکر و قدردانی

در گرداب زندگی آنچه فریادرس ترین است، نگاه خداست حتی برای لحظه‌ای

زیباترین زمزمه‌ها ذکر خداست و شادترین ترانه‌ها در وصف او

پس:

تشکر میکنم از **خداوند** قادر و حکیم بابت همه داده‌ها و نداده‌های حکیمانه اش.

و تشکر می‌کنم از زیباترین نعماتی که خداوند خلق و به من عطا فرمود،

پدر و مادر عزیزم که هر آنچه دارم از دعای خیر آنهاست.

چکیده:

تمایز سلول‌های بنیادی به رده سلولی ویژه در حضور محرکهای ویژه‌ای با آسیب‌های سلولی و مولکولی همراه می‌شود. تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی نیز به هپاتوسیتهای فعال به فاکتورهای تنظیمی ویژه‌ای وابسته می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر بررسی نقش P53 و COX-2 در تنظیم بیان هم و تولید محصولات حاصل از اکسیداسیون لیپید و پروتئین در طی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون بند ناف به هپاتوسیتها می‌باشد.

بدین منظور بن‌یاخته‌های مزانشیمی از خون بندناف انسان جدا شدند. این یاخته‌ها بعد از تعیین ویژگی به یاخته‌های شبه هپاتوسیتی تمایز داده شدند و به دنبال آن تأیید تمایز با روش RT-PCR برای ژنهای آلبومین، آلفافیتوپروتئین و سیتوکروم 3A4 و همچنین سنجش آلبومین ترشح شده در محیط کشت انجام شد.

در طی ۳ هفته که فرآیند تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های شبه هپاتوسیتی انجام شد، بیان مارکرهای ویژه کبدی با افزایش سطوح تشکیل گروههای کربونیل و پراکسیدهای لیپیدی همراه شد. که این افزایش در طی تمایز معنی دار بود.

بیان P53 و COX-2 در سطح mRNA و پروتئین در سلول‌های بنیادی مزانشیمی قبل و بعد از تمایز در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ به وسیله QPCR و ایمنوسیتوشیمی بررسی شد.

در طی این رساله نشان داده شد که افزایش بیان COX-2 با افزایش سرعت تکثیر سلولی، تغییرات بیوشیمیایی و مورفولوژیکی سلول‌های شبه هپاتوسیتی همراه شد.

بیان P53 در سطح mRNA و پروتئین در طی تمایز هپاتوژنیک روند کاهشی داشت و در مراحل آخر تمایز از تجمع آنها در هسته کاسته شد. مقایسه تغییرات بیان COX-2 و P53 قبل و بعد از تمایز از لحاظ آماری کاملا معنی دار بود.

این نتایج ممکن است وجود یک مسیر P53-COX-2 در تنظیم تمایز هپاتوژنیک از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون بند ناف که با تمایز وابسته به آسیب اکسیداتیو مولکولی مرتبط باشد پیشنهاد کند.

کلمات‌کلیدی: COX-2، P53، لیپیدپراکسیداسیون، هپاتوسیت‌ها، تمایز، گروههای کربونیل، بن‌یاخته، QPCR

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و مروری برمطالعات گذشته ۱

۱-۱- تاریخچه کشف سلول‌های بنیادی..... ۲

۱-۲- انواع بن‌یاخته‌ها..... ۳

۱-۲-۱- طبقه بندی بن‌یاخته‌ها براساس قابلیت تمایز..... ۳

۱-۲-۲- انواع بن‌یاخته‌های انسانی براساس منشأ..... ۳

۱-۲-۲-۱- بن‌یاخته‌های رویانی انسان..... ۳

۱-۲-۲-۲- بن‌یاخته‌های جنینی انسان..... ۴

۱-۲-۲-۳- بن‌یاخته‌های بالغ انسانی..... ۴

۱-۲-۲-۳-۱- بن‌یاخته‌های خون بند ناف..... ۵

۱-۲-۲-۳-۲- بن‌یاخته‌های مزانشیمی (MSCs)..... ۶

۱-۳- کاربرد بن‌یاخته‌ها..... ۶

۱-۳-۲-۱- بن‌یاخته‌ها و بافت کبد..... ۶

۱-۳-۲-۱-۱- عوامل مؤثر در تمایز و تکثیر هپاتوسیت‌ها..... ۷

۱-۳-۲-۱-۱-۱- فاکتور رشد کبدی (HGF)..... ۷

۱-۳-۲-۱-۱-۲- انکواستاتین M (OSM)..... ۸

۱-۳-۲-۱-۱-۳- دگزامتازون (DEX)..... ۸

۱-۳-۲-۱-۲- معیارهای لازم در تعریف هپاتوسیت‌های حاصل از بن‌یاخته‌ها..... ۸

۱-۴- فرایندهای التهابی و استرس اکسیداتیو در سلول‌های بنیادی..... ۹

۱-۴-۱- ساختار و عمل P53 و نقش آن در تمایز..... ۱۱

۱-۴-۲- ساختار و عمل آنزیم سیکلواکسیژناز۲ در تمایز..... ۱۴

۱-۵-۳- استرس اکسیداتیو و شاخص‌های آن..... ۱۷

۱-۵-۳-۱- اکسیداسیون لیپید و پروتئین شاخص‌های استرس اکسیداتیو..... ۱۷

۱-۵- اهداف رساله..... ۱۹

۱-۵-۱- اهداف جزئی..... ۲۰

۱-۶- فرضیات پژوهش ۲۰

فصل دوم: مواد و روش‌ها ۲۱

۲-۱- کشت و تمایز یاخته‌ها و تعیین ویژگی ۲۲

۲-۱-۱- جدا سازی بن‌یاخته‌های مزانشیمی ۲۲

۲-۱-۱-۱- تهیه خون بند ناف ۲۲

۲-۱-۱-۲- جداسازی یاخته‌های تک هسته‌ای (MNCs) برپایه دانسیته ۲۲

۲-۱-۱-۲-۱- مراحل انجام جداسازی یاخته‌های تک هسته‌ای (MNCs) خون بند ناف ۲۳

۲-۱-۱-۲-۲- جداسازی بن‌یاخته‌های مزانشیمی از یاخته‌های تک هسته‌ای خون بند ناف ۲۴

۲-۱-۲- تعیین درصد زنده بودن یاخته‌ها ۲۵

۲-۱-۲-۱- تعیین میزان زنده بودن یاخته‌ها ۲۵

۲-۱-۳- تهیه محلول‌ها و مواد مورد استفاده برای کشت یاخته‌ها ۲۶

۲-۱-۳-۱- محیط کشت DMEM-Low Glucose (DMEM-LG) ۲۶

۲-۱-۳-۲- سرم جنین گاو (FBS) ۲۶

۲-۱-۳-۳- بافر PBS حاوی EDTA ۲۷

۲-۱-۳-۴- تریپسین-EDTA ۰/۰۵٪ ۲۷

۲-۱-۴- شمارش یاخته‌ها ۲۷

۲-۱-۴-۱- نحوه‌ی شمارش یاخته‌ها ۲۷

۲-۱-۵- انجماد یاخته‌ها ۲۷

۲-۱-۶- احیا یاخته‌های منجمد (ذوب کردن یاخته‌ها) ۲۸

۲-۱-۷- تعیین ویژگی بن‌یاخته‌های مزانشیمی مشتق از خون بند ناف UCB-MSCs ۲۸

۲-۱-۷-۱- تعیین مارکرهای سطحی بن‌یاخته‌های UCB-MSCs به روش فلوسایتومتری ۲۸

۲-۱-۷-۱-۱- نحوه ساخت محلول‌های مورد استفاده در فلوسایتومتری ۲۹

۲-۱-۷-۱-۲- روش انجام فلوسایتومتری ۳۰

۲-۱-۷-۲- تعیین ویژگی یاخته‌های مزانشیمی از طریق تمایز به رده استئوبلاست ۳۰

۲-۱-۷-۲-۱- مواد و ترکیبات لازم در القا تمایز بن یاخته های مزانشیمی به رده استئوبلاست ۳۱

۲-۱-۷-۲-۲- القا تمایز بن‌یاخته‌های مزانشیمی به رده استئوبلاست.....۳۱
۲-۱-۷-۲-۳- رنگ‌آمیزی رسوب کلسیم در یاخته های تمایز داده شده با استفاده از محلول آلیزارین رد-S.....۳۱
۲-۱-۷-۲-۳-۱- نحوه رنگ‌آمیزی رسوب کلسیم.....۳۲
۲-۱-۷-۳- تعیین ویژگی یاخته‌های مزانشیمی از طریق تمایز به رده آدیپوسیت.....۳۲
۲-۱-۷-۳-۱- تمایز بن‌یاخته‌های مزانشیمی به رده آدیپوسیت.....۳۲
۲-۱-۷-۳-۲- مواد و ترکیبات لازم در القا تمایز بن یاخته های مزانشیمی به رده آدیپوسیت.....۳۲
۲-۱-۷-۳-۳- القا تمایز بن‌یاخته‌های مزانشیمی به رده آدیپوسیت.....۳۲
۲-۱-۷-۳-۴- رنگ‌آمیزی قطرات چربی در یاخته های مزانشیمی تمایز داده شده با محلول Oil Red O.....۳۳
۲-۱-۷-۳-۴-۱- تهیه محلول آلیزارین Oil Red O.....۳۳
۲-۱-۷-۳-۴-۲- نحوه رنگ‌آمیزی قطرات چربی.....۳۳
۲-۱-۸- تمایز بن‌یاخته‌های مزانشیمی به یاخته‌های شبه هپاتوسیتی.....۳۳
۲-۱-۸-۱- مواد و ترکیبات لازم در القا تمایز بن یاخته‌های مزانشیمی به رده یاخته‌های شبه هپاتوسیتی.....۳۴
۲-۱-۸-۲- القا تمایز بن‌یاخته‌های مزانشیمی به یاخته‌های شبه هپاتوسیتی.....۳۴
۲-۱-۸-۳- تأیید تمایز بن‌یاخته‌های مزانشیمی به هپاتوسیتها.....۳۴
۲-۱-۸-۳-۱- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نسخه برداری معکوس (RT-PCR).....۳۵
۲-۱-۸-۳-۱-۱- استخراج RNA.....۳۵
۲-۱-۸-۳-۱-۲- نحوه استخراج RNA و کنترل کیفی آن.....۳۵
۲-۱-۸-۳-۱-۳- سنتز cDNA از RNA استخراج شده.....۳۶
۲-۱-۸-۳-۱-۴- انتخاب پرایمر برای ژن‌های انتخاب شده برای RT-PCR.....۳۶
۲-۱-۸-۳-۱-۵- انجام واکنش PCR.....۳۶
۲-۱-۸-۳-۱-۶- الکتروفورز محصولات PCR.....۳۷
۲-۱-۸-۳-۱-۷- انجام الکتروفورز.....۳۸
۲-۱-۸-۳-۲- سنجش میزان تولید آلبومین در محیط کشت با روش الا یزا (ELISA).....۳۹

۲-۱-۸-۳-۲-۱- محتویات کیت ۳۹
۲-۱-۸-۳-۲-۲- مراحل انجام کار ۴۰
۲-۲- انجام QPCR به منظور کمی کردن بیان ژنهای P53 و COX-2 ..... ۴۰
۲-۲-۱- روش PCR کمّی (QPCR) ۴۰
۲-۲-۱-۱- نحوه استخراج RNA و کنترل کیفی آن ۴۱
۲-۲-۱-۲- سنتز cDNA از RNA استخراج شده ۴۱
۲-۲-۱-۳- مواد و ترکیبات مورد استفاده در QPCR ۴۱
۲-۲-۱-۳-۱- مواد لازم جهت PCR ۴۱
۲-۲-۱-۳-۲- شرایط انجام QPCR ۴۲
۲-۲-۱-۳-۳- آنالیز داده‌های QPCR ۴۳
۲-۳- ایمنوسیتوشیمی ۴۳
۲-۳-۱- مراحل انجام ایمنوسیتوشیمی ۴۳
۲-۴- اندازه گیری میزان مالون دی آلدهید به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید ۴۴
۲-۴-۱- اصول آزمایش ۴۴
۲-۴-۲- مواد و محلولهای لازم ۴۵
۲-۴-۴- لیز سلول‌ها ۴۵
۲-۴-۵- روش اندازه گیری میزان پراکسیداسیون لیپید با استفاده از معرف TBA ۴۶
۲-۵- اندازه گیری میزان گروههای کربونیل در طی تمایز ۴۶
۲-۵-۱- لیز سلول‌ها ۴۶
۲-۵-۲- مراحل انجام کار ۴۷
۲-۶- محاسبات آماری ۴۸

فصل سوم: نتایج ۴۹

۳-۱- درصد زنده بودن بن‌یاخته‌های مزانشیمی جدا شده قبل از کشت و تغییرات تعـداد آن در طی تمایز ۵۰
۳-۲- بیان مارکرهای اختصاصی در سطح بن‌یاخته‌های مزانشیمی ۵۰
۳-۳- بررسی پتانسیل تمایزی بن‌یاخته‌های مزانشیمی به رده‌های استئوبلاست و آدیپوسیت ۵۱

۳-۴- ویژگی‌های ریخت شناسی یاخته‌های هپاتوسیتی مشتق شده از بن‌یاخته‌های مزانشیمی.....۵۳
۳-۵- بررسی بیان ژن‌های اختصاصی هپاتوسیت‌ها در یاخته‌های تمایز یافته در سطح mRNA.....۵۴
۳-۶- سنجش میزان تولید آلبومین با روش الایزا (ELISA).....۵۶
۳-۷- تغییرات بیان COX-2 در سطح mRNA در طی تمایز بن یاخته‌های مزانشیمی خون بند ناف انسان به هپاتوسیتها.....۵۶
۳-۸- تغییرات بیان P53 در سطح mRNA در طی تمایز بن یاخته های مزانشیمی خون بند ناف به هپاتوسیتها.....۵۹
۳-۹- تغییرات بیان COX-2 در سطح پروتئین در طی تمایز بن یاخته های مزانشیمی خون بند ناف به هپاتوسیتها.....۶۱
۳-۱۰- تغییرات بیان P53 در سطح پروتئین در طی تمایز بن یاخته های مزانشیمی خون بند ناف به هپاتوسیتها.....۶۲
۳-۱۱- سنجش میزان پراکسیداسیون لیپید.....۶۳
۳-۱۲- سنجش میزان اکسیداسیون پروتئین.....۶۴

فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها.....۶۶
۴-۱- بحث و نتیجه‌گیری.....۶۷
۴-۲- پیشنهادها.....۸۱

فهرست منابع و مآخذ.....۸۲

چکیده انگلیسی.....۹۲

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول (۲-۱) مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای PCR ژن‌های کبدی..... ۳۶

جدول (۲-۲) شرایط مورد استفاده برای PCR ژن‌های کبدی..... ۳۷

جدول (۲-۳) رقتهای استاندارد تهیه شده برای کیت ترشح آلبومین..... ۴۰

جدول (۲-۴) توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های هسته‌ای در روش QPCR..... ۴۲

جدول (۲-۵) شرایط PCR ژن‌های هسته‌ای در QPCR..... ۴۲

جدول (۳-۱) نتایج حاصل از QPCR ژن COX-2. A نتایج مربوط به روز صفر تمایز، Bنتایج مربوط به روز ۷ تمایز، C نتایج مربوط به روز ۱۴ تمایز، D نتایج مربوط به روز ۲۱ تمایز..... ۵۷

جدول (۳-۲) نتایج حاصل از QPCRژن P53. Aنتایج مربوط به روز صفر تمایز، Bنتایج مربوط به روز ۷ تمایز، Cنتایج مربوط به روز ۱۴ تمایز، D نتایج مربوط به روز ۲۱ تمایز..... ۶۰

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل (۱-۱) ساختار پروتئین P53 ..... ۱۲

شکل (۲-۱) لایه‌های حاصل از سانتریفیوژ خون بند ناف ۲۴

شکل (۳-۱) بررسی میزان تغییرات تعداد سلول‌ها در طی تمایز هپاتوسیتی ۵۰

شکل (۳-۲) بررسی ایمونوتایپینگ بن یاخته های مزانشیمی خون بندناف انسان به روش فلوسایتومتری ۵۱

شکل (۳-۳) تمایز یاخته‌های مزانشیمی به رده یاخته‌های استخوانی ۵۲

شکل (۳-۴) تمایز یاخته‌های مزانشیمی به رده یاخته‌های چربی ۵۲

شکل (۳-۵) تغییرات ریخت شناسی بن‌یاخته‌های مزانشیمی در طی تمایز به یاخته‌های هپاتوسیتی ۵۳

شکل (۳-۶) ریخت شناسی سلول‌های تمایز یافته شبه هپاتوسیتی در روز ۲۱ تمایز ۵۳

شکل (۳-۷) بیان ژن های آلفا فیتوپروتئین (AFP)، آلبومین (Alb)، سیتوکروم 3A4 (CYP3A4) در سطح mRNA ۵۴

شکل (۳-۸) بیان ژن آلفا فیتوپروتئین (AFP) در سطح mRNA در خلال تمایز هپاتوژنیک از سلول‌های بنیادی مزانشیمی خون بند ناف انسان ۵۵

شکل (۳-۹) بیان ژن آلبومین و CYP3A4 وآالفافیتوپروتئین در سطح mRNA در خلال تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون بند ناف به سلول‌های شبه هپاتوسیتی ۵۵

شکل (۳-۱۰) اندازه گیری میزان آلبومین ترشح شده در محیط کشت توسط سلول‌های هپاتوسیتی تمایز یافته از سلول‌های بنیادی مشتق از خون بند ناف انسان. ۵۶

شکل (۳-۱۱) بیان COX-2 در سطح mRNA در طی تمایز هپاتوژنیک از سلول های بنیادی مزانشیمی خون بند ناف. ۵۷

شکل (۳-۱۲) بیان P53 در سطح mRNA در طی تمایز هپاتوژنیک از سلول‌های بنیادی مزانشیمی خون بند ناف. ۵۹

شکل (۳-۱۳) بیان COX-2 در سطح پروتئین در طی تمایز هپاتوژنیک از سلول های بنیادی مزانشیمی خون بند ناف با روش ایمنوسیتوشیمی. ۶۲

شکل (۳-۱۴) بیان P53 در سطح پروتئین در طی تمایز هپاتوژنیک از سلول های بنیادی مزانشیمی خون بند ناف با روش ایمنوسیتوشیمی. ۶۳

شکل (۳-۱۵) سنجش TBARS در طی تمایز هپاتوژنیک از بن یاخته‌های مزانشیمی خون بند ناف. ۶۴

شکل (۳-۱۶) سنجش گروههای کربونیل در طی تمایز هپاتوژنیک از بن یاخته‌های مزانشیمی خون بند ناف ۶۵

شکل (۴-۱) نقش COX-2 و محصول اصلی آن پروستاگلندین E2 را در دو فرایند مهم بدن یعنی سرطان و تکامل نشان می‌دهد. ۷۹

شکل (۴-۲) عمل COX-2 در فرآیندهای سلولی. ۸۰

شکل (۴-۳) عمل P53 در فرآیندهای سلولی. ۸۰

فصل اول:

مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱- تاریخچه کشف سلول‌های بنیادی

در اواسط قرن ۱۸ محققان دریافتند که برخی از یاخته‌ها قادرند سایر یاخته‌های بدن را بوجود آوردند. در سال ۱۹۵۴ استیونز[۱] و لیتل[۲] مشاهده کردند که در بیضه ۱٪ موشهای نژاد ۱۲۹، تراتوما به صورت خودبخود روی می‌دهد و در ادامه در سال ۱۹۶۴ استیونز نشان داد که با پیوند بخشی از جنین این نژاد و سایر نژادها به بیضه موش‌های بالغ می‌توان این نوع سرطان را در آنها القا کرد. تا مدت‌ها تصور بر این بود که این یاخته‌ها بن‌یاخته‌های توموری هستند. در سال ۱۹۶۴ کلین اسمیت[۳] و پیرس[۴] ویژگی بنیادی بودن این یاخته‌ها را اثبات کردند و در سال ۱۹۷۸ بن‌یاخته‌ها از خون بندناف انسان و در سال ۱۹۸۸ بن‌یاخته بن‌یاخته رویانی را از همستر و در سال ۱۹۹۵ بن‌یاخته‌های رویانی از میمون جداشدند. تامسون[۵] در سال ۱۹۹۸ بن‌یاخته رویانی انسان و در همان سال گرهارد[۶] بن‌یاخته‌های زایای انسان را جدا نمود [۱و۲]. در تعریف بن یاخته میتوان گفت، بن‌یاخته به یاخته‌ای گفته می‌شود که ظرفیت بازسازی[۷] داشته و توانایی تبدیل شدن به یک یا تعداد بیشتری از انواع زاده‌های تمایز یافته را دارند. پتانسیل بنیادی بودن سلول‌ها به توانایی بن‌یاخته‌ها در خودنوسازی و تمایز اطلاق می‌شود. عبارت بن‌یاخته به یاخته‌های پیش‌سازی اطلاق می‌شود که می‌توانند به انواعی از بافت‌ها تبدیل شوند[۳].

1- Stevens
2- Little
3- Kleinsmith
4- Pierce
5- Thomson
6- Gerhard
7- Self renewal

۱-۲- انواع بن‌یاخته‌ها

۱-۲-۱- طبقه بندی بن‌یاخته‌ها براساس قابلیت تمایز

براساس قابلیت تمایز این یاخته‌ها به چند دسته طبقه‌بندی شده اند:

۱. یاخته‌های تک قابلیتی[1] که تنها به یک نوع یاخته تبدیل می‌شوند.

۲. یاخته‌های چند قابلیتی[2] که چند بافت ویژه را به وجود می‌آورند.

۳. . یاخته‌های همه قابلیتی[3] که قادرند به کلیه سلول‌های بدن موجود زنده تمایز یابند.

بن یاخته‌ها ممکن است طی روند تکاملی خود خاموش مانده و به‌راحتی وارد چرخه یاخته‌ها نشود. یا اینکه دچار آپوپتوز شده و مسیر تکامل بیشتر را طی نمی‌کند. تقسیم بن یاخته‌ها به دو صورت متقارن ونامتقارن انجام می‌شود. بن یاخته‌ها در طی تقسیم متقارن تکثیر می‌یابند و در طی تقسیم نامتقارن، نیمی از آنها وارد مسیر تمایز نهایی شده و رده‌های تمایز یافته را تولید کنند و نیمی دیگر هم ذخیره بن‌یاخته‌ها را ثابت نگه دارند. تعادل بین این اتفاق‌ها در اثر پیام‌های تحریکی و مهاری صورت می‌گیرد. فاکتورهای رشد، مولکول‌های چسبندگی و نروترنسمیترها از جمله عواملی هستند که تکثیر این یاخته‌ها را تنظیم می‌کنند[۴].

۱-۲-۲- انواع بن‌یاخته‌های انسانی براساس منشأ

- بن‌یاخته‌های رویانی
- بن‌یاخته‌های جنینی
- بن‌یاخته‌های بالغ

۱-۲-۲-۱- بن‌یاخته‌های رویانی انسان

جداسازی، کشت و تعیین ویژگی نسبی بن‌یاخته‌های رویان انسان، اولین بار در سال ۱۹۹۸ گزارش شد[۶]. این یاخته‌ها قادر به تمایز به تمامی یاخته‌های حاصل از لایه‌های زایا هستند. این یاخته‌ها را از توده درون بلاستوسیت به دست می‌آورند با استفاده از فاکتور مهاری لوسمی[4] (LIF)، و لایه‌ی تغذیه

1- Unipotent
2- Multipotent
3- Totipotent
4- Leukemia inhibitory factor

کننده فیبروبلاست به صورت تمایز نیافته حفظ می‌شوند و با حذف این دو فاکتور از محیط کشت به اجسام رویانی و به‌دنبال آن انواع رده‌های سلولی تمایز می‌یابند[۵]. از مهمترین ویژگی‌های یاخته‌های رویانی عبارتند از همانندسازی نامحدود دارند، معمولاً از نظر ژنتیکی طبیعی می‌باشند[۷،۶].

۱-۲-۲-۲- بن‌یاخته‌های جنینی انسان

در سال ۱۹۹۸ این یاخته‌ها را از جوانه‌های زایای جنین سقط شده انسان جدا کردند. ویژگی‌های این یاخته‌ها مشابه یاخته‌های رویانی است با این تفاوت که توانایی تمایز آنها در مقایسه با یاخته‌های رویانی محدودتر است[۸،۲].

۱-۲-۲-۳- بن‌یاخته‌های بالغ انسانی

بن‌یاخته‌هایی که در بافت‌های بالغ یافت می‌شوند فارغ از سن موجود همگی بن‌یاخته بالغ نامیده می‌شوند. این یاخته‌ها در اکثر بافت‌ها وجود دارند تخصصی و چند قابلیتی هستند. در مقایسه با دو دسته بن‌یاخته دیگر یعنی رویانی و جنینی، این دسته قدرت تمایز کمتری دارند [۳].

بن‌یاخته‌های بالغ تحت عنوان بن‌یاخته‌های بالغ چند استعدادی[۱] (MSCs) یا پیش‌آهنگ‌های بالغ چند استعدادی[۲] (MAPCs) نیز نامیده شده اند[۳]. این یاخته‌ها در بخش‌های خاصی از بافت تحت عنوان کنج زیستی[۳] قرار دارند این کنج زیستی توسط یاخته‌های استرومال و ریزمحیط خارج یاخته‌ای[۴] فراهم می‌شود. بن‌یاخته‌های بالغ توانایی تقسیم نامتقارن را دارند که حاصل آن یک بن‌یاخته دختر و یک یاخته پیش‌آهنگ متعهد به یک رده مشخص بدست می‌آید[۹].

بن‌یاخته‌های بالغ از بافت‌های مختلف مانند مغز استخوان[۵] [۱۰]، مغز[۶] [۱۱]، کبد[۷] [۱۲]، کلیه[۸] [۱۳]، بافت چربی[۹] [۱۴]، ماهیچه‌های اسکلتی[۱۰] [۱۵]، خون محیطی [۱۶]، خون بند ناف[۱۱] [۱۷]،

1- Multipotent stem cells
2- Multipotent adult progenitor cells
3- Niche
4- Extracellular microenvironment
5- Bone Marrow
6- Brain
7- Liver
8- Kidney
9- Adipose tissue
10- Skeletal muscle
11- Umbilical Cord Blood