بسم الله الرحمن الرحیم

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان‌نامه کارشناسی ارشد

خانم هما زمانی رشته خون شناسی آزمایشگاهی و بانک خون پایان‌نامه کارشناسی ارشد خود را با عنوان « بررسی وضعیت متیلاسیون در پروموتور ژن miR-886 در سلولهای بنیادی مزانشیمی انسان قبل و پس از تیمار با isoproterenol » در تاریخ ۱۳۹۲/۱۱/۱۲ ارائه کردند.

بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنند.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

دکتر سعید کاویانی جبلی (استاد راهنما)

دکتر امیر آتشی (استاد مشاور)

دکتر سعید آبرون (استاد ناظر)

دکتر محمدرضا رضوانی (استاد ناظر)

دکتر مسعود سلیمانی (نماینده تحصیلات تکمیلی)

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 طرح های 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 **هما زمانی** دانشجوی رشته **خونشناسی آزمایشگاهی و بانک خون** ورودی سال تحصیلی **۹۰** مقطع **کارشناسی ارشد** 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 ۱۳۹۳/۱/۲۷

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 پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده در رشته خونشناسی آزمایشگاهی و بانک خون است که در سال ۹۲ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی آقای دکتر سعید کاویانی ، مشاوره آقای دکتر امیر آتشی 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 هما زمانی دانشجوی رشته خون شناسی آزمایشگاهی و بانک خون مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضا

۱۳۹۳/۱/۲۷

پایان‌نامه

کارشناسی ارشد رشته خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون

عنوان

بررسی وضعیت متیلاسیون در پروموتور ژن miR-886 درسلول های بنیادی مزانشیمی انسان قبل و پس از تیمار با isoproterenol

نگارش

هما زمانی

استاد راهنما

دکترسعید کاویانی جبلی

استاد مشاور

دکتر امیر آتشی

زمستان۱۳۹۲

تقدیم به :

خانواده عزیزم

تشکر و قدردانی

*اینک که با کوشش مستمر و استعانت از الطاف الهی به مرحله دفاع از پایان نامه رسیدم بر خود لازم می دانم که از استاد راهنمای بسیار خوبم **جناب آقای دکتر سعید کاویانی** به پاس زحمات و حمایت های بی دریغ و بدون چشم داشتشان تشکر کنم و برایشان از خدواند مهربان سلامتی و موفقیت روز افزون را خواستارم.*

*از استاد مشاور خوبم **جناب آقایدکتر امیر آتشی** بسیار سپاس گزارم که در تمامی مراحل پایاننامه بنده را یاری فرموده و همواره از مشاوره های دلسوزانه ایشان بهره برده ام. برای اساتید محترم گروه هماتولوژی تربیت مدرس**جناب آقایدکتر سعید آبرون** و **جناب آقای دکترمسعود سلیمانی** که به بنده قلمی رسا و اندیشه ای ژرف آموختند ناب ترین مراتب سپاس و احترام را تقدیم می کنم.*

*از دوستان خوبم **خانم ها فاطمه پرهیزکار، منصوره و منیره عجمی وآقای فخرالدین صبا** تشکر و تقدیر می کنم؛امید است با استعانت از درگاه الهی به موفقیت های روزافزون دست یابند.*

در نهایت از **همه پرسنل و دانشجویان گروه هماتولوژی** که در انجام کار پایان نامه بنده را همراهی کردند تشکر می کنم.

چکیده

زمینه و هدف: تا کنون در مطالعات مختلفی به بررسی موبیلیزاسیون سلول های بنیادی خونساز به منظور پیوند و اهمیت سیگنال های بتا آدرنرژیکی در القای این فرآیند، پرداخته شده است. با این وجود، اطلاعات کمی درباره نحوه اثر سیگنال های بتا آدرنرژیکی در موبیلیزاسیون سلول های بنیادی خونساز ، موجود است. SDF-1 در موبیلیزاسیون سلول های بنیادی خونساز، نقش کلیدی ایفا می کند. این کموکاین توسط سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان، بیان داشته و مشخص شده که miR-886-3p نیز در تنظیم بیان SDF-1 در سلول های مذکور، موثر است. در این تحقیق میزان بیان کمی SDF-1 و miR-886-3p و هم چنین وضعیت متیلاسیون پروموتور ژن miR-886-3p، به جهت شناخت مکانیسم های تنظیمی بیان این miR، در طی تیمار سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان با استفاده از داروی ایزوپروترنول (آگونیست بتا آدرنرژیکی)، مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه، سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان جداسازی و کشت شده و تحت تیمار با ۱۰۰میکرومول ایزوپروترنول قرار گرفتند. استخراج RNA تام و DNA، در ساعات ۲، ۱۲، ۳۶ و ۴۸ تیمار و هم چنین از سلول های بنیادی مزانشیمی تیمار نشده به عنوان کنترل، انجام گرفت. سپس cDNA ساخته شد و بیان کمی SDF-1 و miR-886-3p با روش quantitative Real Time PCRسنجیده شد.وضعیت متیلاسیون پروموتور ژنmiR-886-3p نیز، با روش MSP مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج و یافته ها: بیان ژن SDF-1 در ساعات ۱۲ تیمار افزایش و در ساعت ۴۸ کاهش داشت و این تغییرات در ساعت ۱۲ به لحاظ آماری معنی دار بود ($P<0.05$).بیان miR-886-3p در ساعات ۲، ۱۲، ۳۶ و ۴۸ تیمار افزایش داشت که در تمامی ساعات تیمار، این اختلاف به لحاظ آماری معنی دار بود ($P<0.05$). پروموتور ژنmiR-886-3p نیز پیش از تیمار، وضعیت متیله و پس از تیمار (در ساعات ۲، ۱۲، ۳۶ و ۴۸) وضعیت متیلاسیون نسبی و تغییر تدریجی از وضعیت متیله به غیر متیله را نشان داد.

نتیجه گیری: بیان miR-886-3Pدر سلول های بنیادی مزانشیمی انسان، به دنبال تیمار با ایزوپروترنول افزایش یافته و از متیلاسیون پروموتور ژن آن نیز به عنوان یک مکانیسم تنظیم بیان ژن، کاسته می شود و در ادامه miR-886-3P با هدف گیری SDF-1 و اثر مهاری بر آن، بیان این کموکاین را در سلول های مذکور کاهش داده و هماهنگ با مطالعات قبلی، می تواند به موبیلیزاسیون HSC ها به خون محیطی منجر شود.

واژه های کلیدی: سلول های بنیادی مزانشیمی، SDF-1، miR-886-3P، متیلاسیون، ایزوپروترنول

فهرست مطالب

فصل اول-مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱. سلول های بنیادی ۲

۱-۱-۱. سلول های بنیادی مزانشیمی ۴

۱-۱-۱-۱. جدا سازی وکشت سلول های بنیادی مزانشیمی ۵

۱-۱-۱-۲. مارکر های سطحی سلول های بنیادی مزانشیمی ۷

۱-۱-۱-۳. خصوصیات عملکردی وظرفیت های تمایزی سلول های بنیادی مزانشیمی ۹

۱-۱-۱-۴. کاربرد های درمانی سلول های بنیادی مزانشیمی ۹

۱-۱-۲. سلول های بنیادی خونساز ۱۱

۱-۱-۲-۱. توصیف سلول های بنیادی خونساز ۱۱

۱-۱-۲-۲. پیوند سلول های بنیادی خونساز ۱۲

۱-۲. موبیلیزاسیون ۱۴

۱-۲-۱. عوامل دخیل در موبیلیزاسیون ۱۷

۱-۲-۱-۱. سایتوکاین‌ها ۱۸

۱-۲-۱-۲. محور SDF-1/CXCR4 ..... ۱۹

۱-۲-۱-۳. مولکول‌های چسبندگی ۲۳

۱-۲-۱-۴. فعالیت پروتئولیتیکی ۲۵

۱-۲-۱-۵. تخریب و بازسازی استخوان ۲۶

۱-۲-۱-۶. مانع اندوتلیال ۲۷

۱-۲-۱-۷. سیستم عصبی ۲۸

۱-۲-۲. عوامل القاکننده موبیلیزاسیون ۲۹

۱-۲-۲-۱.G-CSF ۲۹
۱-۲-۲-۲. سیکلوفسفامید ۲۹
۱-۲-۲-۳. آنتاگونیست های CXCR4 ..... ۳۰
۱-۲-۲-۴. آنتی بادی های آلفا ۴ اینتگرین (CD49d) ۳۰
۱-۲-۳. سیستم عصبی و موبیلیزاسیون ۳۰
۱-۲-۳-۱. گیرنده های آدرنرژیکی ۳۰
۱-۲-۳-۲. نقش فیبرهای عصبی بتا آدرنرژیک ۳۱
۱-۲-۳-۳. نقش سیستم عصبی در محورSDF-1/CXCR4 ..... ۳۲
۱-۳. مروری بر MicroRNA ها ۳۴
۱-۳-۱.RNAهای غیرکدکننده ۳۴
۱-۳-۲. بیوژنز miRNA ۳۶
۱-۳-۳. عملکرد miRNA ۳۹
۱-۳-۴. miRNA های موثر بر SDF-1 ..... ۴۰
۱-۳-۴-۱.miR-27b ۴۰
۱-۳-۴-۲. miR-1 ..... ۴۱
۱-۳-۴-۳.miR-126 ..... ۴۱
۱-۳-۴-۴. miR-23a ۴۲
۱-۳-۴-۵. miR-430 ..... ۴۲
۱-۳-۴-۶. کلاستر miR 302-367 ..... ۴۲
۱-۳-۴-۷.miR-886-3p ۴۳
۱-۴. اپی ژنتیک و مکانیسم های آن ۴۵
۱-۴-۱. نقش توارث در اپی ژنتیک ۴۷
۱-۴-۲. اثرات محیط در اپی ژنتیک ۴۷

۱-۴-۳. ارتباط اپی ژنتیک با بیماری ها ۴۸
۱-۴-۴. متیلاسیون DNA و بیان ژن ۵۰
۱-۴-۴-۱. مکانیسم های متیلاسیون ۵۳
۱-۴-۴-۲. کنترل متیلاسیون DNA ۵۵
۱-۴-۵. اپی ژنتیک و miRNA ها ۵۶
۱-۵. هدف ۵۷

فصل دوم-مواد و روش ها

۲-۱. مواد، تجهیزات و کیت های مورد استفاده ۶۰
۲-۱-۱. تجهیزات مورد استفاده ۶۰
۲-۱-۲. مواد مصرفی ۶۲
۲-۱-۳. کیت های مورد استفاده ۶۳
۲-۲. بافرها، محیط های کشت و محلول ها ۶۳
۲-۲-۱. تهیه PBS بدون یون های کلسیم و منیزیم ۶۳
۲-۲-۲. آماده سازی PBS حاوی EDTA ۶۴
۲-۲-۳. بافر TAE50X مورداستفاده در الکتروفورز ۶۴
۲-۲-۴. محیط DMEM ۶۵
۲-۲-۵. L-گلوتامین 100X ۶۵
۲-۳. جداسازی،کشت و تیمار سلول های بنیادی مزانشیمی ۶۶
۲-۳-۱. جداسازی سلول های بنیادی مزانشیمی از نمونه مغز استخوان ۶۶
۲-۳-۲. تعیین مارکرهای سطحی سلول های بنیادی مزانشیمی ۶۶
۲-۳-۳. کشت مجدد و تکثیر سلول های بنیادی مزانشیمی ۶۷
۲-۳-۴. فریز سلول های بنیادی مزانشیمی ۶۷
۲-۳-۵. دفریز سلول ها ۶۸

۲-۳-۶. مشاهده، شمارش و تعیین درصد زنده بودن سلول های بنیادی مزانشیمی ۶۸
۲-۳-۷. تیمار سلول ها با ایزوپروترنول ۶۹
۲-۴. استخراج RNA ۶۹
۲-۴-۱. آماده سازی سلول ها جهت استخراج RNA ۷۰
۲-۴-۲. مراحل کار استخراج RNA با RNXTM(plus) ۷۰
۲-۴-۳. کنترل کیفی RNA استخراج شده ۷۱
۲-۵. واکنش رونویسی معکوس ۷۱
۲-۵-۱. سنتز cDNA mRNA با کیت GenDEPOT ۷۲
۲-۵-۲. سنتز cDNA miRNA باکیت ۷۳
۲-۶. واکنش زنجیره ای پلیمراز ۷۶
۲-۷. الکتروفورز ژل ۷۷
۲-۸. Real Time PCR ۷۸
۲-۸-۱. انجام Real Time PCR SDF-1 با استفاده از کیت Ampilicon ۷۹
۲-۸-۲. انجام Real Time PCR miR-886-3p با استفاده از کیت Stratagene ۸۰
۲-۹. استخراج DNA ۸۲
۲-۹-۱. آماده سازی سلول ها جهت استخراج DNA ۸۲
۲-۹-۳. بررسی کیفیت DNA ۸۴
۲-۱۰. اصول PCR ویژه متیلاسیون(MSP) ۸۴
۲-۱۰-۱. پردازش DNA به منظور MSP ۸۵
۲-۱۰-۲. تیمار بی سولفیتی DNA با استفاده از کیت EPIGENTEK ۸۵
۲-۱۰-۳. انجام MSP بااستفاده از 2X MSP Master Mix Qiagen ۸۷

فصل سوم-نتایج و یافته ها

۳-۱. نتایج کنترل کیفی RNA استخراج شده ۹۱

۳-۲. نتایج RT-PCR ژن SDF-1 درسلول های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی ایزوپروترنول ۹۲
۳-۳. نتایج quantitative Real Time PCR ژن SDF-1 در سلول های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی ایزوپروترنول ۹۳
۳-۴. نتایج quantitative Real Time PCR miR-886-3p در سلول های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی ایزوپروترنول ۹۶
۳-۵. نتایج کنترل کیفی DNA استخراج شده ۹۹
۳-۶. نتایج MSP ژن miR-886-3p در سلول های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی ایزوپروترنول ۱۰۰

فصل چهارم-بحث، نتیجه گیری و پیشنهاد ها

۴-۱. بحث و نتیجه گیری ۱۰۳
۴-۲. پیشنهاد ها: ۱۱۴
فهرست منابع ۱۱۶
ضمائم ۱۳۲
چکیده انگلیسی ۱۳۵

فهرست جداول

جدول ۲-۱.مواد و مقادیر مورد نیاز برای آماده سازی PBS ۶۴

جدول ۲-۲.مواد و مقادیر مورد نیاز جهت تهیه بافر 50 xTAE ۶۵

جدول۲-۳.مواد و مقادیر لازم برای Reverse Transcription Mix ۷۲

جدول ۲-۴.برنامه دمایی ساخت cDNA mRNA ۷۳

جدول۲-۵.مواد و مقادیر واکنش پلی آدنیلاسیون ساخت cDNA miRNA ۷۳

جدول۲-۶.مقادیر RNA و آب به ازای هر واکنش ۷۴

جدول ۲-۷.برنامه دمایی واکنش پلی آدنیلاسیون ساخت cDNA miRNA ۷۴

جدول ۲-۸.مواد و مقادیر ساخت cDNA miRNA ۷۵

جدول ۲-۹.برنامه دمایی ساخت cDNA miRNA ۷۵

جدول۲-۱۰.توالی پرایمرهای مورد استفاده برای ژن های SDF-1 و بتا اکتین ۷۶

جدول۲-۱۱.موادومقادیر مورد استفاده واکنش PCR ۷۶

جدول۲-۱۲.برنامه دمایی واکنش PCR ۷۷

جدول۲-۱۳.مواد و مقادیرلازم جهت واکنش Real Time PCR SDF-1 ..... ۷۹

جدول۲-۱۴.برنامه دمایی Real Time PCR SDF-1 ..... ۷۹

جدول۲-۱۵.توالی پرایمر B2M ۸۰

جدول۲-۱۶.مواد و مقادیر لازم جهت واکنش Real Time PCR miR-886-3p ۸۰

جدول۲-۱۷.برنامه دمایی Real Time PCR miR-886-3p ۸۱

جدول۲-۱۸. توالی پرایمر های مورد استفاده برای miR-886-3p و U6 ..... ۸۱

جدول ۲-۱۹.برنامه دمایی جایگزین برای تیمار DNA غنی از GC ۸۵

جدول۲-۲۰.توالی پرایمرهای مورد استفاده واکنش MSP miR-886-3p و COL2A1-U ۸۷

جدول۲-۲۱.مواد و مقادیر مورد نیاز واکنش MSP ۸۷

جدول۲-۲۲.برنامه دمایی واکنش MSP ۸۸

جدول ۳-۱.غلظت RNA استخراج شده و خلوص آن در (OD260/280) و (OD260/230) ۹۰

جدول ۳-۲.Ct ژن های B2M و SDF-1 در سه آزمایش جداگانه ۹۳

جدول ۳-۳.Ct U6 و miR-886-3p در سه آزمایش جداگانه ۹۶

جدول ۳-۴. غلظت DNA استخراج شده و خلوص آن در (OD260/280) و (OD260/230) ۹۸

فهرست شکل ها

شکل ۱-۱.مدلی برای موبیلیزاسیون سلول بنیادی بواسطه G-CSF ۱۶

شکل ۱-۲.مدلی برای تنظیم شبانه روزی حرکات HSC ها به واسطه سیستم عصبی ۳۲

شکل۱-۳. مسیر بیوژنز miRNA در جانوران ۳۹

شکل۱-۴.تصویر شماتیک جزایر CpG نواحی پروموتوری ژن ها و اثر متیلاسیون این نواحی در مهار رونویسی از ژن ها ۵۲

شکل ۳-۱.نتایج RT-PCR ژن های بتا اکتین و SDF-1 در سلول های بنیادی مزانشیمی تیمار نشده و تیمار شده با ایزوپروترنول ۹۱

شکل ۳-۲.منحنی B2M melting ۹۲

شکل ۳-۳. منحنی SDF-1 melting در طول تیمار با ایزوپروترنول ۹۴

شکل ۳-۴.منحنی U6 melting ۹۵

شکل ۳-۵.منحنیmiR-886-3p melting درطول تیمار با ایزوپروترنول ۹۷

شکل ۳-۶.نتایج MSP ژن miR-886-3p درسلول های بنیادی مزانشیمی تیمار نشده وسلول های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با ایزوپروترنول ۹۹

فصل اول

مقدمه و

مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱. سلول های بنیادی

سلول های بنیادی‌یاخته‌های اولیه‌ای هستند که توانایی تبدیل و تمایز بـه انـواع مختلـف سـلول های دیگر را دارند و از آنها می‌توان در تولید سلول ها و نهایتاً بافت‌های مختلف دیگـر اسـتفاده کـرد. این سلول ها دارای دو ویژگی مهم چندقوه ای و خودنوسازی می باشند؛ یعنی هم قـدرت تبـدیل بـه انواع سلول ها را دارند و هم می توانند به سلولی تمایز نیافته مشـابه خودشـان تبـدیل شـوند.امـروزه استفاده از این سلول ها جهت ترمیم بافت‌های آسیب دیده در حال گسترش است. قابلیت تبدیل ایـن سلول ها به بافت‌های مختلف، محور اصلی توجه به سلول های بنیادی است[۱].

سلول های بنیادی می توانند بـر اسـاس قـدرت تمـایزی و یـا منبـع استحصـال تقسـیم بنـدی شوند[۱].بر اساس توانایی تمایز، سلول های بنیادی به چهار دسته تقسیم می شوند .این تقسیم بندی نشان دهنده قدرت تمایز سلول بنیادی به انواع مختلف سلول ها می باشد. این چهار دسته عبارتند از: سلول بنیادی همه توان[۱] : این نوع سلول بنیادی می تواند به انواع مختلف سلول ها در بـدن از جملـه همه انواع سلول های جنینی و جفتی تبدیل شود. تنها سلول بنیادیهمه توان، سلول تخم لقـاح یافتـه می باشد. گروه دوم سلول بنیادی پرتوان[۲] : این نوع سلول از سلول بنیادیهمه توان حاصل می شـود و توانایی تبدیل شدن به انواع مختلف سلول ها در بدن را دارا می باشد. بهتـرین مثـال بـرای ایـن نـوع سلول، سلول بنیادی جنینی می باشد. دسته سوم سلول بنیادی چندقوه[۳]: این نوع سلول هم از سـلول بنیادیپرتوان حاصل شده و تواناییتبدیل به اکثر سلول های مرتبط به هم را دارد ولـی نمـی توانـد بـه

[1]Totipotent
[2]Pluripotent
[3]Multipotent

همه سلول های موجود در بدن تبدیل شوند. بهترین نمونه برای این نوع سلول، سلول بنیادی خونساز می باشد که توانایی تبدیل شدن به همه سلول های تشکیل دهنده خون را دارا می باشند. گروه آخر سلول های تک قوه ای[1] هستند. این سلول ها فقط می توانند به یک رده سلولی تمایز پیدا کنند و معمولا به سلول بافتی تبدیل می شوند که از آن بافت مشتق شده باشند. برای مثال از سلول های تک قوه ای می توان سلول های بنیادی اپیتلیال را نام برد که توانایی تمایز به سلول پوست را دارند[۲].

سلول های بنیادی بر اساس منبع به سه دسته سلول های بنیادی جنینی، سلول های بنیادی بالغین و سلول های بنیادی بند ناف تقسیم می شوند. دسته اول سلول های بنیادی جنینی از جنین‌های چهار یا پنج روزه که از تخم‌های آزمایشگاهی بارور می‌شوند به دست می‌آیند و در محیط آزمایشگاهی در محیط کشت‌های اختصاصی رشد داده می‌شوند[۳].دسته دوم سلول های بنیادی بالغین، سلول های نامتمایزی هستند که در بین سلول های تمایزیافته بافت‌ها و اندام‌های بدن یافت می‌شوند و توانایی نوسازی و تمایز به انواع سلول های اختصاصی اصلی بافت یا اندام را دارند. نقش‌های اولیه این سلول ها در یک ارگان زنده شامل حمایت کردن و تعمیر بافت‌هایی است که از آنها به دست می‌آیند. سلول های بنیادی بالغین شامل انواع مختلف سلول های بنیادی می باشد که عمده ترین آنها سلول بنیادی خونساز(HSC)[2] و سلول بنیادی مزانشیمی(MSC)[3] و سایر سلول های بنیادی اختصاصی بافت ها می باشد. HSC پیش ساز سلول های قرمز خون، لکوسیتها و پلاکتها بوده و قادر است در مواقع تخریب مغز استخوان جایگزین آن شده و سلول های بالغ خونی تولید کند. از دیگر سلول های بنیادی بالغین موجود در مغز استخوان، سلول بنیادی اندوتلیال(ESC)[4] و MSC می باشد[۳].ESC ها، سیستم عروقی را می سازند و MSCها به سلول های استئوبلاست، آدیپوسیت، کندروسیت و میوسیت تبدیل می شوند. سایر سلول های بنیادی بالغین در بافت های مختلف مثل مغز، خون، قرنیه، شبکیه، قلب و روده یافتمی شود[۳].دسته سوم، سلول های بنیادی خون بند ناف می باشند که از خون بند ناف جدا سازی می شوند. خون بند ناف خونی است که پس از تولد در بند

[1]Unipotent
[2]Hematopoietic Stem Cell
[3]Mesenchymal Stem Cell
[4]Endothelial Stem Cell

ناف و جفت باقی می ماند و همراه آن به دور انداخته می شود. این خون علاوه بر سلول های خونی منبعی غنی از HSCها است. HSCها می توانند با جایگزین شدن در مغز استخوان فرد بیمار، تامین کننده سلول های خونی جدید باشند. ویژگی مهم سلول های خونی بند ناف عدم تکامل سلول های خونی از جمله لنفوسیت های آن است که در نتیجه احتمال رد پیوندهای انجام شده با این سلول ها در مقایسه با پیوندهای مغز استخوان بسیار کمتر خواهد بود. مطالعات آزمایشگاهی نشان داده اند که HSCها توانایی تمایز به سایر سلول ها را نیز دارند که می توانند افق جدیدی را برای درمان بیماری ها در آینده ای نه چندان دور ترسیم کنند[۳].

۱-۱-۱. سلول های بنیادی مزانشیمی

همانطور که پیشتر گفته شد،مغز استخوان دو جمعیت مشخص از سلول های بنیادی را شامل می گردد:

۱-HSC ها که رده های مختلف خونی را ایجاد می کنند.

۲-سلول های بنیادی غیر خونساز استرومای مغز استخوان که حمایت کننده عملکردی و ساختمانی خونسازی بوده و این عمل را از طریق ترشح فاکتور های رشد و تماس سلول به سلول انجام می دهند.

این سلول های بنیادی غیر خونساز استرومای مغز استخوان که به رده های مختلف سلولی با منشا مزودرمی تمایز می یابند MSC نامیده می شوند.چنین سلول هایی مانند تمامی سلول های بنیادی دارای توانایی خودنوسازی و تمایز بوده و قادرند بافت های مختلف مزانشیمی هم چون استخوان،غضروف،چربی و ماهیچه را بوجود آورند [۴, ۵].

در ابتدا فرید انشتاین و همکاران[1] نشان دادند که مغز استخوان سلول های چسبنده دوکی شکلی (مورفولوژی شبه فیبروبلاستی) را شامل می شود که می توانند به صورت کلونی رشد کرده و به سلول های شبه استخوانی و غضروفی تمایز یابند.این کلونی های به هم چسبیده در آغاز واحد ایجاد کننده

[1]Friedenstein et al