دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد گرایش بافت شناسی و جنین شناسی

عنوان:

ارزیابی توانایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی و رده سلولی کبدی در بیان مینی ژن‌های فاکتور ۹ انسانی

نگارنده:

آزاده سادات آزادبخش

اساتید راهنما:

دکتر فرح فرخی

دکتر محمدرضا سام

استاد مشاور:

دکتر محمد علی شکرگزار

بهمن ماه ۱۳۹۱

حق چاپ و نشر برای دانشگاه ارومیه محفوظ می باشد

پایان نامه آقای / خانم : آزاده سادات آزادبخش به تاریخ: ۹۱/۱۱/۹ شماره ۲۳۹۳-۲

مورد پذیرش هیات محترم داوران با رتبه عالی و نمره ۲۰ (به حروف بیست)

قرار گرفت.

۱- استاد راهنما و رئیس هیئت داوران: دکتر فرح فرخی

۲- استاد راهنمای دوم: دکتر محمدرضا سام

۳- استاد مشاور :دکتر محمد علی شکر گزار

۴- داور خارجی: دکتر نوروز دلیرژ

۵- داور داخلی: دکتر وحید نجاتی

۶- نماینده تحصیلات تکمیلی: دکتر جلیل خارا

پناه بلندی و پستی توای

ندانم چه ای هرچه، هستی توای

به درگاه کبریا و عظمت پروردگار سپاس و ستایش می گذارم که ذات لایزالش ازلی است و ازلیت بی ابتدایش لایزال و جاویدان است.

دیده کوتاه بین ما یارای دیدارش ندارد و فکر کودک و کوچک ما از عهده تعریف و توصیفش برنیاید.

جهان را بقدرت بیمانندش بیافرید و مشیت عظمایش بنای خلقت فروگذاشت. ابتداع کرد، اختراع کرد و در این ابتداع و اختراع به شرکت و مشورت کس نیاز مند نبود.

حمد او گویم و ثنای او خوانم که

راه را بر من آسان ساخت.

تقدیم به

نگاره های مهر و محبت

پدر و مادر عزیزم

و به آنهایی که دوستشان دارم

خواهر و برادر نازنینم

و

فرشته کوچکم، امیرحسین

به نام خدایی که در این نزدیکی است.

در برابر پروردگار مهربانم سر تعظیم فرود می آورم، یکتایی که هرگز تنهایم نگذاشت.

از زحمات تمامی عزیزانی که مرا در اجرای هر چه بهتر این پایان نامه یاری نموده اند، از صمیم قلب تقدیر و تشکر می نمایم.

از **پدر و مادر بسیار عزیز و گرانقدرم** که دستم گرفتند و راهم بردند و نادانی هایم را با شکیبایی پذیرفتند تا بیاموزم و بپاخیزم.

از **برادر و خواهر عزیزم** که محبت های بیدریغشان همواره گرمی بخش زندگی ام بوده است.

از استاد راهنمای محترم و ارجمندم سرکار خانم **دکتر فرخی** که با حمایت هایشان همواره یاری رسانم بوده اند، کمال تقدیر و تشکر را دارم.

از استاد گرانقدر، جناب آقای **دکتر سام** که در مسیر این تحقیق همراهم بوده اند و هرگز در مسیر آموزشم خسته و دلسرد نشدند، کمال تشکر را دارم.

از اساتید محترمی که زحمت داوری پایان نامه اینجانب را به عهده گرفتند جناب آقای **دکتر دلیرژ** و جناب آقای **دکتر نجاتی** و همچنین نماینده تحصیلات تکمیلی جناب آقای دکتر خارا، سپاسگزارم.

از **خانم رضازاده** که در کنارش بسیار آموختم صمیمانه سپاسگزارم.

همچنین از ریاست، اعضاء هیئت علمی و تمامی کارشناسان و کارکنان پژوهشکده زیست فناوری برای تمامی امکاناتی که در اختیار من قرار دادند، سپاسگزارم. از دوستانم در پژوهشکده زیست فناوری، تمامی همکلاسی های عزیزم و دوستان و هم خوابگاهی های مهربانم که در این مدت یاری ام کرده اند کمال تشکر را دارم و از خداوند منان توفیق روز افزون و موفقیت در همه مراحل زندگی شان را خواستارم.

از دوستان عزیزم، خانم سودابه ایران پور و چیاکهنه پوشی و همچنین آقای بیک زاده که در طول این تحقیق حضور و یاریشان باعث دلگرمی ام بود از صمیم قلب سپاسگزارم.

آزاده سادات آزادبخش

۹/ بهمن/ ۱۳۹۱

چکیده

سلول‌های بنیادی مزانشیمی هدف مناسبی جهت سلول درمانی و ژن درمانی بیماران هموفیلی B محسوب می شوند. این سلول ها دارای ویژگی‌های بی نظیر از جمله تمایز به طیف وسیعی از سلول های مختلف و ایمنی زایی اندک در شرایط پیوند می‌باشند که آن‌ها را برای سلول درمانی و ژن درمانی مناسب کرده است. از مشکلات ژن درمانی، بیان اندک ترانسژن است. با شناسایی توالی های تنظیمی واستفاده از آن‌ها در موقعیت های مناسب در ناقلین می توان در جهت بهبود بیان ژن با هدف ژن درمانی اقدام نمود. اینترون‌ها و توالی کوزاک از جمله توالی‌های تنظیمی می باشند که می توانند با روش‌های متنوعی بر سطوح تنظیمی بیان ژن در مراحل مختلف موثر باشند. در این مطالعه، ۵ ناقل پلاسمیدی فاکتور۹ فاقد و واجد اینترون‌های ژن بتاگلوبین به درون سلول‌های مزانشیمی و رده سلولی کبدی (HepG2) ترانسفکت گردیدند. سپس توانایی این سلول‌ها در بیان فاکتور۹ مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور پس از جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از استخوان تیبیا و فمور موش رت، فنوتیپ این سلول‌ها با روش فلوسایتومتری تعیین شد. ناقلین پلاسمیدی فاکتور۹ با استفاده از عامل ترانسفکشن به درون سلول‌های مزانشیمی و HepG2 وارد شدند. ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن، توانایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی و HepG2 در بیان مینی ژن های مختلف فاکتور۹ از طریق انجام آزمون ساندویچ الایزا روی محیط کشت و آزمون RT-PCR ارزیابی و فعالیت زیستی فاکتور۹ ترشح شده به محیط کشت با آزمون APTT سنجیده شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی توانائی بیان فاکتور۹ و اسپلایسینگ اینترون ۱ ژن بتاگلوبین را همانند رده سلولی کبدی نشان دادند. بالاترین سطح بیان فاکتور۹ از سازه ژنی بدون اینترون و سازه ژنی دارای اینترون۱ ژن بتاگلوبین بدست آمد. توالی‌های اینترونی بتاگلوبین سطح بیان فاکتور۹ را کاهش دادند که این کاهش بیان را می توان با احتمال به اسپلایسینگ نادرست اینترون‌ها نسبت داد. بالاترین میزان فعالیت زیستی از فاکتور۹ ترشح شده به محیط کشت توسط سازه ژنی p.hFIX در سلول‌های HepG2 و سازه‌های ژنی p.hFIX-I,II در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بدست آمد. نتایج حاصل نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌توانند پروتئین کارآمد در مقادیر کمتر تولید کنند و در ژن درمانی مبتنی بر سلول درمانی به عنوان سلول هدف، انتخاب شوند.

واژه های کلیدی: سلول های بنیادی مزانشیمی، هموفیلیB، فاکتور۹، ناقل پلاسمیدی، اینترون های ژن بتاگلوبین، رده سلولی کبدی (HepG2)

عنوان **صفحه**

چکیده ..... ک

فصل اول: مقدمه و کلیات

بخش اول: مقدمه

۱-۱ مقدمه ۱

بخش دوم: کلیات

۱-۲ سلول‌های بنیادی ۴
۱-۲-۱ سلول بنیادی چیست؟ ۴
۱-۲-۲ ویژگی‌های سلول‌های بنیادی ۴
۱-۲-۳ انواع سلول‌های بنیادی ۶
۱-۲-۳-۱ سلول‌های بنیادی جنینی ۶
۱-۲-۳-۲ سلول‌های بنیادی بالغین ۸
۱-۲-۳-۳ سلول‌های بنیادی پرتوان القاء شده ۹
۱-۲-۴ خودنوزایی سلول‌های بنیادی ۹
۱-۲-۵ تمایز سلول‌های بنیادی ۱۰
۱-۳ سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۱۱
۱-۳-۱ کنام سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۱۳
۱-۳-۲ منابع سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۱۴
۱-۳-۲-۱ سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان ۱۴

۱-۳-۲-۲ سلول‌های مزانشیمی مشتق از بافت چربی ۱۵
۱-۳-۲-۳ سلول‌های مزانشیمی مشتق از بافت‌های پیوندی ۱۶
۱-۳-۲-۴ سلول‌های مزانشیمی مشتق از سینوویال ۱۶
۱-۳-۲-۵ سلول‌های مزانشیمی مشتق از خون بند ناف و ژل وارتون ۱۷
۱-۳-۲-۶ سلول‌های مزانشیمی مشتق از جریان خون ۱۷
۱-۳-۲-۷ سلول‌های مزانشیمی مشتق از آندومتریوم ۱۸
۱-۳-۲-۸ سلول‌های مزانشیمی مشتق از لوله‌های فالوپ ۱۸
۱-۳-۳ جداسازی و تعیین هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۱۹
۱-۳-۴ زیست شناسی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۲۱
۱-۳-۴-۱ تشکیل کلونی‌های فیبروبلاستی شکل ۲۱
۱-۳-۴-۲ پدیده پیر شدگی ۲۲
۱-۳-۴-۳ خودنوزایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۲۳
۱-۳-۴-۴ نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۲۴
۱-۳-۴-۵ لانه گزینی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۲۵
۱-۳-۵ پتانسیل تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۲۶
۱-۳-۵-۱ تمایز مزودرمی ۲۷
۱-۳-۵-۲ تمایز اکتودرمی ۲۹
۱-۳-۵-۳ تمایز آندودرمی ۲۹
۱-۳-۶ ویژگی‌های ایمونولوژیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۳۰
۱-۳-۷ کاربردهای درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۳۱

۱-۳-۷-۱ مکانیسم‌های درمانی ۳۱
۱-۳-۷-۲ کاربرد سلول‌های بنیادی مزانشیمی در سلول درمانی و ژن درمانی ۳۳
۱-۴ ژن درمانی و انتقال ژن به سلول‌های پستانداران ۳۴
۱-۴-۱ همسانه سازی حامل‌های انتقال ژن ۳۴
۱-۴-۲ حامل‌های انتقال ژن ۳۵
۱-۴-۲-۱ حامل‌های ویروسی ۳۵
۱-۴-۲-۲ حامل‌های غیر ویروسی ۳۷
۱-۴-۳ روش‌های انتقال حامل‌های غیر ویروسی ۳۷
۱-۴-۳-۱ روش‌های شیمیایی ۳۸
۱-۴-۳-۲ روش‌های فیزیکی یا مکانیکی ۴۰
۱-۵ بیماری هموفیلی نوع B ۴۲
۱-۵-۱ ساختار ژن و پروتئین فاکتور۹ انعقادی در انسان ۴۲
۱-۵-۲ طبقه بندی بیماران هموفیلی B ۴۳
۱-۵-۳ مکانیسم‌های انعقاد طبیعی ۴۴
۱-۵-۳-۱ مسیر داخلی انعقاد ۴۴
۱-۵-۳-۲ مسیر خارجی انعقاد ۴۴
۱-۵-۳-۳ مسیر مشترک ۴۵
۱-۵-۴ روش‌های درمانی بیماران هموفیلی B ۴۶
۱-۶ اهمیت و ضرورت انجام تحقیق در زمینه سلول درمانی ۴۶
۱-۷ اهداف تحقیق ۴۷

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱ مراحل انجام پژوهش ۴۹

۲-۲ حامل‌های نوترکیب فاکتور۹ ..... ۵۱

۲-۳ مواد و روش‌های بخش همسانه سازی حامل‌ها ۵۲

۲-۳-۱ طرز تهیه محیط کشت باکتریایی ۵۲

۲-۳-۱-۱ کشت باکتری بر روی محیط کشت جامد (پلیت) و مایع ۵۴

۲-۳-۲ تهیه سلول‌های باکتریایی مستعد (Competent cells) ۵۴

۲-۳-۳ ترانسفورم کردن باکتری‌ها ۵۵

۲-۳-۴ کلونی PCR ۵۶

۲-۳-۵ تهیه ژل آگارز و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید جهت ژل الکتروفورز ۵۸

۲-۳-۵-۱ تهیه بافر TAE جهت الکتروفورز ۵۹

۲-۳-۵-۲ تهیه ژل آگارز و انجام الکتروفورز ۶۰

۲-۳-۶ استخراج پلاسمید ۶۱

۲-۳-۶-۱ تهیه DNA پلاسمیدی به روش لیز قلیایی در مقیاس کم (Mini prep) ۶۱

۲-۳-۶-۲ تهیه DNA پلاسمیدی به روش لیز قلیایی در مقیاس وسیع (Maxi prep) ۶۲

۲-۳-۶-۳ تهیه بافر TE ۶۴

۲-۴ مواد و روش‌های بخش سلولی ۶۵

۲-۴-۱ استحصال سلول‌های مزانشیمی موش رت نژاد ویستار ۶۵

۲-۴-۲ کشت سلول‌های استحصال شده مزانشیمی در محیط DMEM ۶۶

۲-۴-۳ فلوسایتومتری سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۶۸

۲-۴-۳-۱ تهیه فسفات بافر سالین PBS ۶۹
۲-۴-۴ کشت رده سلولی کبدی $HepG_2$ ۷۰
۲-۴-۴-۱ دفریز کردن سلول‌ها و کشت سلولی ۷۰
۲-۴-۴-۲ فریز کردن سلول‌ها ۷۱
۲-۴-۵ شمارش سلولی ۷۲
۲-۴-۶ محاسبه درصد سلول‌های زنده در سوسپانسیون سلولی (Viability) ۷۳
۲-۴-۷ پاساژ دادن سلول‌های تک لایه (Trypsinization) ۷۴
۲-۴-۸ ترانسفکت کردن سلول‌ها ۷۵
۲-۴-۹ استخراج پروتئین از سلول‌های ترانسفکت شده ۷۶
۲-۴-۹-۱ تهیه بافر لیز کننده برای استخراج پروتئین ۷۷
۲-۴-۱۰ استخراج RNA تام از سلول‌ها ۷۸
۲-۴-۱۱ واکنش RT-PCR ۷۹
۲-۴-۱۱-۱ ساخت cDNA ۷۹
۲-۴-۱۱-۲ واکنش PCR ۸۱
۲-۴-۱۲ اندازه‌گیری میزان کمی فاکتور۹ نوترکیب در محیط کشت و درون سلول‌ها با روش ساندویچ الایزا ۸۲
۲-۴-۱۳ اندازه‌گیری فعالیت فاکتور۹ انعقادی با روش APTT ۸۳
۲-۴-۱۴ آنالیز داده ها ۸۴

فصل سوم: نتایج

۳-۱ نتایج بخش مولکولی مربوط به DNA پلاسمیدی ۸۵
۳-۱-۱ نتایج کلونی PCR ۸۶

۳-۱-۲ نتایج تعیین غلظت (اسپکتروفتومتری) پلاسمیدهای استخراج شده ۸۷

۳-۲ نتایج بخش سلولی ۸۸

۳-۲-۱ نتایج کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۸۸

۳-۲-۲ نتایج فلوسایتومتری سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۸۹

۳-۲-۳ نتایج کشت رده سلولی کبدی (HepG2) ۹۰

۳-۲-۴ نتایج بررسی بیان فاکتور۹ در سلول‌های ترانسفکت شده ۹۱

۳-۲-۴-۱ سنجش میزان کمی فاکتور۹ در محیط کشت با روش ساندویچ الایزا ۹۱

۳-۲-۴-۲ سنجش میزان کمی فاکتور۹ درون سلولی با روش ساندویچ الایزا ۹۳

۳-۲-۴-۳ نتایج مقایسه‌ای سنجش میزان کمی فاکتور۹ ..... ۹۶

۳-۲-۴-۴ نتایج بررسی فعالیت زیستی فاکتور۹ ..... ۹۷

۳-۲-۴-۵ نتایج آزمون نیمه کمی RT-PCR ۹۹

فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری

۴-۱ بحث ۱۰۲

۴-۲ نتیجه‌گیری ۱۰۷

۴-۳ پیشنهادات ۱۰۸

منابع ۱۰۹

چکیده انگلیسی ۱۲۱

فهرست تصاویر

تصویر(۱-۱): برداشت مغز استخوان از ناحیه ستیغ خاصره در انسان ۱۵

تصویر (۱-۲): استخوان های تیبیا و فمور ۱۵

تصویر (۱-۳): غضروف مفصلی، غشاء و مایع سینوویال ۱۶

تصویر (۱-۴): برش عرضی از بند ناف ۱۷

تصویر (۱-۵): مزنسفر (اسفروئید مزانشیمی) ۲۲

تصویر (۱-۶): پهن شدگی سلول های پیرشده مزانشیمی ۲۲

تصویر (۱-۷): تصویر شماتیک از فرآیند آندوسیتوز لیپوپلکس ۳۹

تصویر (۱-۸): مسیرهای انعقاد خون و فاکتورهای دخیل در آن ۴۵

تصویر (۲-۱): تصویر شماتیک ساختارهای بیانی فاکتور۹ که در وکتور بیانی $pcDNA_3$ کلون گردیده‌اند ۵۱

تصویر (۲-۲): پلاسمید بیانی $pcDNA_3$ حاوی ژن فاکتور۹ ..... ۵۱

تصویر (۲-۳): مارکر DNA، سینی ژل و ژل در زیر نور UV ۶۰

تصویر (۲-۴): جداسازی استخوان تیبیا و فمور از موش رت ۶۷

تصویر (۲-۵): جداسازی سر استخوان تیبیا و فمور ۶۸

تصویر (۲-۶): خارج سازی مغز استخوان ۶۸

تصویر (۲-۷): لام نئوبار ۷۲

تصویر (۲-۸): تصویر شماتیک از انتقال ژن به روش ترانسفکشن و با واسطه لیپوزوم ۷۵

تصویر (۲-۹): تصویر شماتیک از استخراج RNA تام با استفاده از فیلتر ۷۸

تصویر(۳-۱): تصویر شماتیک ساختارهای بیانی فاکتور۹ ..... ۸۵

تصویر (۳-۲): الگوی الکتروفورتیک کلونی PCR ۸۶

تصویر (۳-۳): تصاویر سلول‌های بنیادی مزانشیمی در روزهای مختلف کشت ۸۸

تصویر (۳-۴): پلات فلوسایتومتری ۹۰

تصویر(۳-۵): رده سلوی کبدی (HepG2) ۹۰

تصویر (۳-۶): الگوی الکتروفورتیک محصولات RT-PCR سلول های بنیادی مزانشیمی ۱۰۰

تصویر (۳-۷): الگوی الکتروفورتیک محصولات RT-PCR رده سلولی کبدی ($HepG_2$) ۱۰۱

فهرست جداول

جدول (۱-۱): نام‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۱۲

جدول (۱-۲): نشانگرهای سطح سلول‌های مزانشیمی ۲۴

جدول (۲-۱): لیست توالی‌های پرایمرهای مورد استفاده ۸۲

جدول (۳-۱): سایز مولکولی سازه های بیانی فاکتور۹ ..... ۸۷

جدول(۳-۲): غلظت حامل‌های بیانی فاکتور۹ ..... ۸۷

جدول (۳-۳): نتایج فلوسایتومتری ۸۹

جدول (۳-۴): مقایسه میزان بیان فاکتور ۹ از پلاسمیدهای نوترکیب در محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده مزانشیمی ۹۲

جدول (۳-۵): مقایسه میزان بیان فاکتور ۹ از پلاسمیدهای نوترکیب در محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده $HepG_2$ ۹۳

جدول (۳-۶): مقایسه میزان بیان فاکتور ۹ درون سلولی، در سلول‌های ترانسفکت شده مزانشیمی ۹۵

جدول (۳-۷): مقایسه میزان بیان فاکتور ۹ درون سلولی ،در سلول‌های ترانسفکت شده $HepG_2$ ۹۵

جدول (۳-۸): مقایسه سطح بیان فاکتور۹ در محیط کشت ودرون سلولی رده سلولی کبدی و سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۹۶

جدول (۳-۹): مقایسه فعالیت زیستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی و $HepG_2$ در ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن ... ۹۸

فهرست نمودارها

نمودار (۱-۱): کاربردهای درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۳۳

نمودار (۱-۲): روش‌های انتقال حامل‌های غیر ویروسی ۳۷

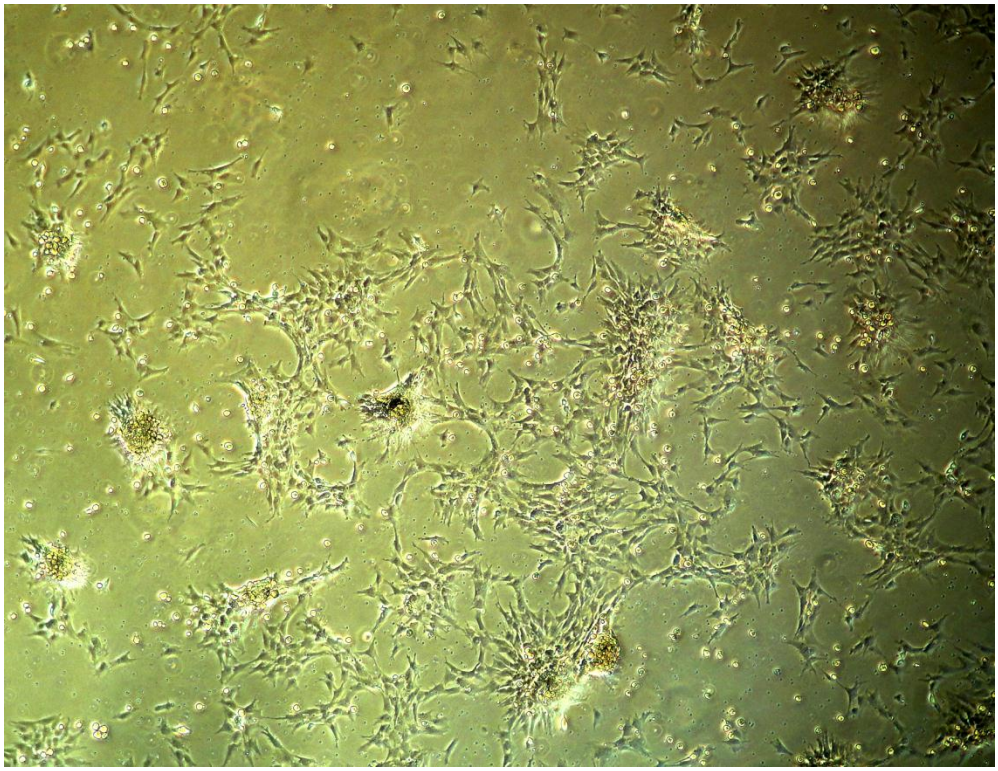
نمودار(۳-۱): میزان فاکتور۹ ترشح شده به محیط کشت ۹۲

نمودار(۳-۲): میزان فاکتور۹ درون سلولی ۹۴

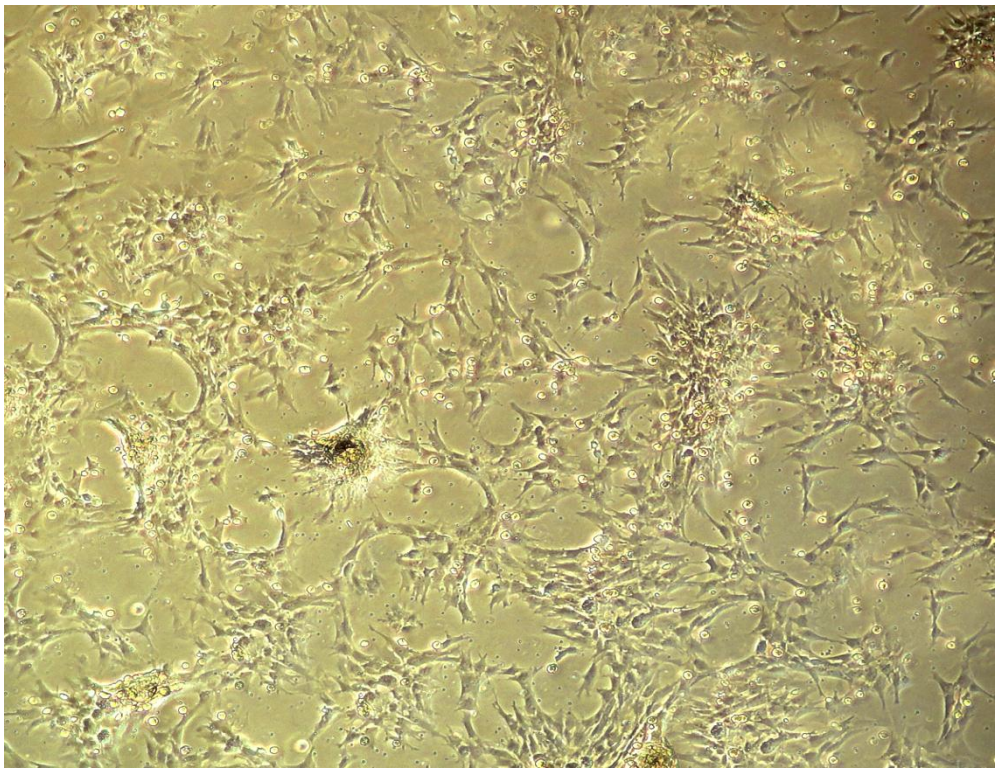
نمودار (۳-۳) : مقایسه فاکتور۹ ترشح شده به محیط کشت با تجمع فاکتور۹ درون سلولی ۹۷

نمودار (۳-۴): فعالیت زیستی فاکتور۹ ترشح شده به محیط کشت ۹۸

روز هفتم



روز چهاردهم



فصل اول

مقدمه و کلیات

Introduction

&

Review of Literature

بخش اول: مقدمه

۱-۱ مقدمه:

بافت مغز استخوان پستانداران دارای دو نوع مهم از سلول‌های بنیادی است. سلول‌های بنیادی هماتوپویتیک[1] (HSC) و سلول‌های بنیادی غیر هماتوپویتیک که تحت عنوان سلول‌های بنیادی مزانشیمی[2] (MSC) یا سلول‌های استرومایی مزانشیمی نامیده می شوند. سلول‌های مزانشیمی در اصل به عنوان سلول‌های اولیه مزودرمی تعریف می شوند که منجر به شکل گیری سلول‌های عضلات اسکلتی، خون، سیستم عروقی، ادراری-تناسلی و بافت های پیوندی در درون بدن می شوند. در این خصوص MSC ها توانایی خود تجدید شوندگی[3] و تمایز را به همان نحو که سلول‌های هماتوپویتیک دارند از خود نشان می دهند. در نتیجه استفاده‌های بالینی از MSC ها در درمان‌های مبتنی بر سلول درمانی مورد توجه می باشد(Hara *et al.*, 2008). امروزه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مطالعات مهندسی بافت، ژن درمانی و سلول درمانی استفاده وسیعی می شود (باغبان اسلامی نژاد و همکاران، ۱۳۸۸). سلول‌های بنیادی مزانشیمی که از بافت‌هایی نظیر مغز استخوان، کبد، خون نوزادان، خون بند ناف و مایع آمنیوتیک قابل جداسازی هستند (بهاروند و همکاران، ۱۳۸۶)، دارای مجموعه‌ای از ویژگی‌های بی نظیر می باشند که آن‌ها را هم برای درمان‌های مبتنی بر ترمیم[4] و هم برای انتقال ژن مناسب کرده است. این ویژگی ها شامل:

۱)آسانی جداکردن ۲) توانایی در تمایز به طیف وسیعی از انواع سلول‌های مختلف از نوع مزانشیمی و غیر مزانشیمی ۳) توانایی تکثیر بالا در محیط کشت، بدون از دست دادن قدرت تمایز ۴) توانایی تولید ترکیبات مهارکننده پاسخ ایمنی در شرایط پیوند و ۵) توانایی در مهاجرت به بافت‌های آسیب دیده می‌باشند (Porada *et al.*, 2010). همچنین نشان داده شده است که بیان یک ترانسژن از سلول‌های بنیادی، تولرانس یا تحمل ایمونولوژیک به ترانسژن را به همراه دارد که می تواند مشکل ایجاد آنتی بادی‌های مهارکننده در پلاسمای خون بیماران را برطرف نماید (Sadelain *et al.*, 2006). بنابراین سلول‌های بنیادی، هدف بسیار مناسبی جهت سلول درمانی بیماری‌های ژنتیکی از جمله هموفیلی B می باشند.

[1] Hematopoetic stem cells (HSCs)
[2] Mesenchymal stem cells (MSCs)
[3] Self-renewal
[4] Regenerative medicine

بیماری هموفیلی B در اثر فقدان و یا نقص در عملکرد پروتئین فاکتور ۹ انعقادی ایجاد می‌گردد (Bowen, 2002) این بیماری، یکی از رایج‌ترین بیماری‌های ژنتیکی در مسیر انعقاد خون می‌باشد که بصورت مغلوب وابسته به X به ارث می رسد و فراوانی آن در جمعیت مردان ۱/۳۰۰۰۰ می‌باشد (VandenDriessche *et al*., 2001). زندگی این بیماران در اثر خونریزی‌های مکرر دائماً تهدید می‌شود و شایعترین علت مرگ در آنها، خونریزی‌های مغزی است. در ۳ دهه گذشته از پلاسمای تازه منجمد شده (Fresh frozen plasma) و کنسانتره های فاکتور ۹ جهت درمان و جلوگیری از عود خونریزی‌ها در این بیماران استفاده شده است (Saenko *et al*., 2003). با ظهور تکنولوژی DNA نوترکیب، استفاده از فاکتور۹ نوترکیب به عنوان جایگزین مناسب و سالم فاکتور۹ پلاسمایی مطرح گردید. با این وجود، هزینه بالای تولید فاکتور۹ نوترکیب، تشکیل آنتی‌بادی‌های مهارکننده، واکنش‌های آلرژیک و ترومبوز در بیماران، توجه به سایر روش‌های درمانی را باعث گردید. (Ragni, 2004). در این زمینه دانشمندان به دنبال درمان قطعی و دائمی بیماری‌های ژنتیکی از جمله بیماری هموفیلی B توسط روش‌های سلول درمانی و ژن درمانی می باشند. در مورد هموفیلی موفقیت هایی در انتقال ژن از طریق ناقلین ویروسی و غیر ویروسی در انواع مختلفی از سلول‌ها صورت گرفته است. انواع مختلفی از سلول ها که تاکنون به عنوان هدف های بالقوه بیان فاکتور ۹ از طریق ناقلین مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند از جمله فیبروبلاست های پوست (Axelrod *et al*., 1990)، کراتینوسیت‌ها (Fenjves *et al*., 1996)، سلول‌های آندوتلیال (Yao *et al*., 1991)، میوبلاست‌ها (Chao *et al*., 1999)، سلول‌های بنیادی هماتوپوئتیک (Rodriguez *et al*., 2002) سلول‌های اپیتلیال (Lozier *et al*., 1997)، سلول‌های کبدی (Armentao *et al*., 1999)، پلاکت‌ها (Shi *et a l*., 2010) و سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان (Kerbsbach *et al*., 2003) می باشند.

در مطالعه حاضر، از ناقلین پلاسمیدی جهت ترانسفکشن سلول‌های مزانشیمی ورده سلولی کبدی استفاده گردید که در درون هسته سلول‌های هدف به صورت اپیزومال قرار می گیرند و در مقایسه با ناقلین ویروسی که به صورت تصادفی در ژنوم سلول‌های هدف وارد می شوند از ایمنی بهتر و بالاتری برخوردارند. از مشکلات انتقال ژن، بیان اندک ترانسژن است. با شناسایی توالی‌های تنظیمی و استفاده از آن‌ها در موقعیت‌های مناسب در ناقلین می توان در جهت بهبود بیان ژن

با هدف ژن درمانی اقدام نمود. اینترون‌ها و توالی کوزاک از جمله توالی‌های تنظیمی می باشند که می توانند با روش‌های متنوعی بر سطوح تنظیمی بیان ژن در مراحل مختلف موثر باشند.

لذا در این پژوهش، ۵ ناقل پلاسمیدی فاکتور۹ که پیشتر در مطالعات قبلی گروه ساخته شده بودند و دارای توالی‌های تنظیمی سیس مختلف و نیز تلفیقی از این توالی‌ها بودند (Haddad *et al*., 2009; Sam *et al*., 2010) به سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان موش رت نژاد ویستار و رده سلولی کبدی ($HepG_2$) منتقل شدند و سپس مطالعه سیستماتیک و مقایسه‌ای بیان فاکتور۹ در سطح mRNA و پروتئین از سازه‌های ژنی مختلف در سلول‌های نوترکیب صورت گرفت.