بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

خانم معصومه قادری رشته بیوشیمی بالینی رساله دکتری خود را با عنوان: بررسی پاسخ هپاتوسیت های تمایز یافته از سلولهای بنیادی مزانشیمی و سلولهای بنیادی $CD34^+$ حاصل از خون بندناف به آسیب DNA ناشی از افلاتوکسین B1 در تاریخ ۸۹/۹/۳۰ ارائه کردند. اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده است 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 مسعود سلیمانی	
استاد مشاور	دکتر مهدی فروزنده مقدم	
استاد ناظر	دکتر مهرداد نوروزی نیا	
استاد ناظر	دکتر عباس صاحبقدم لطفی	
استاد ناظر	دکتر جلال پور احمد	
استاد ناظر	دکتر محمد شعبانی	
نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر محمد تقی خانی	

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 معصومه قادری در رشته‌بیوشیمی بالینی است که در سال در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی دکتر عبدالامیر علامه ، مشاوره دکتر مصعود سلیمانی و دکتر مهدی فروزنده مقدم 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 **معصومه قادری** دانشجوی رشته **بیوشیمی بالینی** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی معصومه قادری

تاریخ و امضا ۹۶/۳۰

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 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 **معصومه قادری** دانشجوی رشته **بیوشیمی بالینی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۳** مقطع **دکتری** 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 ۸۹/۶/۳۰

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

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

عنوان

بررسی پاسخ هپاتوسیت‌های تمایز یافته از سلول‌های بنیادی مزانشیمی و سلولهای بنیادی $CD34^+$ حاصل از خون بندناف به آسیب DNA ناشی از افلاتوکسین B1

نگارش

معصومه قادری

استاد راهنما

دکتر عبدالامیر علامه

استاد مشاور

دکتر مسعود سلیمانی

دکتر مهدی فروزنده مقدم

پاییز ۱۳۸۹

تقدیم به:

پدر و مادرم که هیچ چیز جبران زحمات بی‌دریغ آنان را نمی‌کند

تشکر و قدردانی

هر آنکه شکر خالق نکند از مخلوق نیز تشکر نتواند.

سپاس خدا را که هر آن و لحظه زندگی‌ام از اوست و هر آنچه را که امروز دارم لطف بیکران اوست.

از اولین معلم‌های زندگی‌ام، پدر مهربان و مادر دلسوزم سپاسگذارم که نخستین الفباها را در محضر آنان آموختم.

از همه آموزگاران و استادانی که طی این سال‌ها افتخار شاگردیشان را داشته‌ام متشکرم.

چکیده

بن‌یاخته‌های $CD34^+$ و 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 روش‌های ایمونوسیتوشیمی و RT-PCR انجام شد. به منظور مقایسه حیات و آسیب DNA، یاخته‌های شبه هپاتوسیتی، بن‌یاخته‌های مزانشیمی و $CD34^+$ در معرض افلاتوکسین B1 (AFB1) قرار گرفتند. تیمار با AFB1 در روز ۱۵ تمایز اثراتی وابسته به دوز و زمان بر حیات یاخته‌ها و آسیب DNA نشان داد. مقدار IC_{50} افلاتوکسین B1 در هپاتوسیت‌های تمایز یافته از $CD34^+$ و MSCs به ترتیب برابر با ۴۶/۸ و ۴۴/۷ میکرومولار بود. در یاخته‌های شبه هپاتوسیتی مزانشیمی درصد DNA اندازه‌گیری شده در دنباله‌ها ۱ تا ۲ برابر بیشتر از یاخته‌های غیرتمایزی مزانشیمی بود. درصد DNA اندازه‌گیری شده در دنباله‌های هپاتوسیت‌های مزانشیمی تیمار شده با افلاتوکسین B1 (۰، ۲/۵، ۱۰، ۲۰ میکرومولار) به مدت ۲۴ ساعت تقریباً برتبر با ۱۵، ۵۵، ۶۵ و ۷۰ درصد بود. تحت شرایط مورد مطالعه هپاتوسیت‌های حاصل از $CD34^+$ها در مقایسه با همتای مزانشیمی خود مقاومتر بودند. از روش PCR کمّی (QPCR) برای اندازه‌گیری آسیب‌های DNA در ژن‌های هسته‌ای خاص استفاده شد (Hprt، P53 و β-globin). نتایج به دست آمده نشان داد که ژن P53 در مقایسه به سایر ژن‌ها نسبت به آسیب DNA ناشی از AFB1 حساستر می باشد. بیشترین مقدار آسیب (۰/۰۳±۰/۸۴ آسیب به ازای ۱۰ کیلوباز) در ژن P53 هپاتوسیت‌های مزانشیمی اندازه‌گیری شد. ترتیب حساسیت این یاخته‌ها به آسیب DNA ناشی از AFB1 به این قرار می‌باشد: هپاتوسیت های مزانشیمی > بن‌یاخته‌های $CD34^+$ > بن‌یاخته‌های مزانشیمی > هپاتوسیت‌های $CD34^+$ و ترتیب حساسیت ژن‌های مورد مطالعه نیز به این صورت می‌باشد: P53> Hprt> β-globin. با توجه داده‌های به دست آمده پیشنهاد می‌شود که هپاتوسیت‌های تمایز یافته براساس منبع و منشأ در حساسیت یا مقاومت نسبت به ترکیبات آسیب رسان به DNA با هم فرق می‌کنند. نتایج حاصله نشان می‌دهد که ژن‌های مختلف در یاخته‌های مختلف پاسخ‌های متنوعی را به آسیب ناشی از AFB1 نشان می‌دهند که این تنوع رفتاری می‌تواند به ساختار کروماتین و نیز میزان دردسترس بودن آنها برای متابولیت فعال AFB1 مرتبط باشد.

کلمات کلیدی: افلاتوکسین B1، سیتوتوکسیسیتی، هپاتوسیت‌ها، تمایز، آزمون کامت، بن‌یاخته، QPCR، آسیب

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱ تاریخچه مطالعات بر روی بن‌یاخته‌ها ۲
۱-۲ انواع بن‌یاخته‌ها ۳
۱-۲-۱ انواع بن‌یاخته‌ها براساس قابلیت تمایز ۳
۱-۲-۲ انواع بن‌یاخته‌های انسانی براساس منشأ ۵
۱-۲-۲-۱ بن‌یاخته‌های رویانی انسان ۵
۱-۲-۲-۲ بن‌یاخته‌های زایای انسان ۷
۱-۲-۲-۳ بن‌یاخته‌های بالغ انسانی ۷
۱-۳ منابع بن‌یاخته‌های بالغ انسان ۸
۱-۳-۱ بند ناف ۹
۱-۳-۲ بن‌یاخته‌های خون بند ناف (UCB) ۱۰
۱-۳-۲-۱ بن‌یاخته‌های خون‌ساز (HSCs) ۱۳
۱-۳-۲-۱-۱ شناسایی بن‌یاخته‌های خون‌ساز ۱۴
۱-۳-۲-۱-۱-۱ شناسایی HSCها براساس مارکرهای سطحی ۱۴
۱-۳-۲-۱-۱-۲ شناسایی HSCها براساس رنگ‌آمیزی فلورسانت ۱۵
۱-۳-۲-۱-۱-۳ آزمون جمعیت جنبی ۱۶
۱-۳-۲-۲ بن‌یاخته‌های مزانشیمی (MSCs) ۱۶
۱-۳-۲-۲-۱ جداسازی و شناسایی بن‌یاخته‌های مزانشیمی ۱۹
۱-۳-۲-۲-۲ جداسازی بن‌یاخته‌های مزانشیمی ۲۰
۱-۳-۲-۲-۳ شناسایی بن‌یاخته‌های مزانشیمی ۲۲
۱-۴ کاربردهای بن‌یاخته‌ها ۲۵
۱-۴-۱ استفاده از بن‌یاخته‌ها و یاخته‌های تمایزی در داروشناسی و سم شناسی ۲۵
۱-۴-۲ کاربرد بن‌یاخته‌ها در موارد بالینی ۲۸
۱-۴-۲-۱ بن‌یاخته‌ها و بافت کبد ۲۹

۱-۴-۲-۱-۱ عوامل مؤثر در تمایز و تکثیر هپاتوسیت‌ها ۳۰
۱-۴-۲-۱-۱-۱ فاکتور رشد کبدی (HGF) ۳۳
۱-۴-۲-۱-۱-۲ انکواستاتین M (OSM) ۳۳
۱-۴-۲-۱-۱-۳ دگزامتازون (Dex) ۳۵
۱-۴-۲-۱-۲ معیارهای لازم در تعریف هپاتوسیت‌های حاصل از بن‌یاخته‌ها ۳۵
۱-۴-۲-۱-۳ بن‌یاخته‌های خون بند ناف و هپاتوسیت‌ها ۳۸
۱-۵ کبد و افلاتوکسین B1 ..... ۳۹
۱-۶ اهداف ۴۳

فصل دوم: مواد روش‌ها

۲-۱ کشت و تمایز یاخته‌ها و تعیین ویژگی ۴۵
۲-۱-۱ جدا سازی بن‌یاخته‌های مزانشیمی و $CD34^+$ از خون بند ناف ۴۵
۲-۱-۱-۱ آماده سازی خون بند ناف ۴۵
۲-۱-۱-۲ نحوه جمع‌آوری خون بند ناف ۴۶
۲-۱-۱-۳ جداسازی یاخته‌های تک هسته‌ای (MNCs) برپایه دانسیته ۴۶
۲-۱-۱-۳-۱ مراحل انجام جداسازی یاخته‌های تک هسته‌ای (MNCs) خون بند ناف ۴۶
۲-۱-۱-۳-۲ جدا کردن بن‌یاخته‌های مزانشیمی از یاخته‌های تک هسته‌ای خون بند ناف ۴۸
۲-۱-۱-۳-۲-۱ مراحل انجام جداسازی بن‌یاخته‌های مزانشیمی ۴۹
۲-۱-۱-۳-۳ جداسازی یاخته‌های $CD34^+$ از یاخته‌های تک هسته‌ای خون بند ناف ۴۹
۲-۱-۱-۳-۳-۱ مراحل انجام جداسازی بن‌یاخته‌های $CD34^+$ ۵۱
۲-۱-۲ تعیین درصد زنده بودن یاخته‌ها ۵۳
۲-۱-۲-۱ محاسبه میزان زنده بودن یاخته‌ها ۵۳
۲-۱-۳ تهیه محلول‌ها و مواد مورد استفاده برای کشت یاخته‌ها ۵۴
۲-۱-۳-۱ محیط کشت DMEM-Low Glucose (DMEM-LG) ۵۴
۲-۱-۳-۲ سرم جنین گاو (FBS) ۵۵
۲-۱-۳-۳ بافر PBS حاوی EDTA ۵۵

۲-۱-۳-۴ تریپسین-EDTA ٪۰/۰۵ ..... ۵۵
۲-۱-۴ شمارش یاخته‌ها ۵۵
۲-۱-۴-۱ نحوه‌ی شمارش یاخته‌ها ۵۵
۲-۱-۵ انجماد یاخته‌ها ۵۶
۲-۱-۶ احیا یاخته‌های منجمد (ذوب کردن یاخته‌ها) ۵۶
۲-۱-۷ تعیین ویژگی بن‌یاخته‌های UCB-MSCs و $UCB\text{-}CD34^{+}$ ۵۷
۲-۱-۷-۱ تعیین مارکرهای سطحی بن‌یاخته‌های UCB-MSCs و $UCB\text{-}CD34^{+}$ بروش فلوسایتومتری ۵۷
۲-۱-۷-۱-۱ نحوه ساخت محلول‌های مورد استفاده در فلوسایتومتری ۵۸
۲-۱-۷-۱-۲ روش انجام فلوسایتومتری ۵۸
۲-۱-۷-۲ تعیین ویژگی یاخته‌های مزانشیمی از طریق تمایز به رده استئوبلاست ۵۹
۲-۱-۷-۲-۱ مواد و ترکیبات لازم در القا تمایز بن‌یاخته‌های مزانشیمی به رده استئوبلاست ۶۰
۲-۱-۷-۲-۲ القا تمایز بن‌یاخته‌های مزانشیمی به رده استئوبلاست ۶۰
۲-۱-۷-۲-۳ رنگ‌آمیزی ته نشست‌های کلسیم در یاخته‌های تمایز داده شده با محلول آلیزارین رد-S ۶۰
۲-۱-۷-۲-۳-۱ نحوه رنگ‌آمیزی ته نشست‌های کلسیم ۶۱
۲-۱-۷-۳ تعیین ویژگی یاخته‌های مزانشیمی از طریق تمایز به رده آدیپوسیت ۶۱
۲-۱-۷-۳-۱ تمایز بن‌یاخته‌های مزانشیمی به رده‌های آدیپوسیت ۶۱
۲-۱-۷-۳-۲ مواد و ترکیبات لازم در القا تمایز بن یاخته های مزانشیمی به رده آدیپوسیت ۶۲
۲-۱-۷-۳-۳ القا تمایز بن‌یاخته‌های مزانشیمی به رده آدیپوسیت ۶۲
۲-۱-۷-۳-۴ رنگ‌آمیزی قطرات چربی در یاخته های مزانشیمی تمایز داده شده با محلول Oil Red O ۶۲
۲-۱-۷-۳-۴-۱ تهیه محلول آلیزارین Oil Red O ۶۳
۲-۱-۷-۳-۴-۲ نحوه رنگ‌آمیزی قطرات چربی ۶۳

۲-۱-۸ تمایز بن‌یاخته‌های مزانشیمی و $CD34^+$ به یاخته‌های شبه هپاتوسیتی..... ۶۳
۲-۱-۸-۱ مواد و ترکیبات لازم در القا تمایز بن‌یاخته‌های مزانشیمی و $CD34^+$ به رده یاخته‌های شبه هپاتوسیتی..... ۶۴
۲-۱-۸-۲ القا تمایز بن‌یاخته‌های مزانشیمی به یاخته‌های شبه هپاتوسیتی..... ۶۴
۲-۱-۸-۳ القا تمایز بن‌یاخته‌های $CD34^+$ به یاخته‌های شبه هپاتوسیتی..... ۶۵
۲-۱-۸-۴ تأیید تمایز بن‌یاخته‌های مزانشیمی و $CD34^+$ به یاخته‌های کبدی..... ۶۵
۲-۱-۸-۴-۱ ایمنوسیتوشیمی..... ۶۵
۲-۱-۸-۴-۲ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نسخه برداری معکوس (RT-PCR)..... ۶۷
۲-۱-۸-۴-۲-۱ استخراج RNA..... ۶۷
۲-۱-۸-۴-۲-۲ نحوه استخراج RNA و کنترل کیفی آن..... ۶۸
۲-۱-۸-۴-۲-۳ سنتز cDNA از RNA استخراج شده..... ۶۸
۲-۱-۸-۴-۲-۴ انتخاب پرایمر برای ژن‌های انتخاب شده برای RT-PCR..... ۶۸
۲-۱-۸-۴-۲-۵ آماده سازی پرایمرها برای واکنش PCR..... ۷۰
۲-۱-۸-۴-۲-۶ انجام واکنش PCR..... ۷۰
۲-۱-۸-۴-۲-۶ الکتروفورز محصولات PCR..... ۷۱
۲-۱-۸-۴-۲-۷ انجام الکتروفورز..... ۷۳
۲-۲ تیمار یاخته‌ها با افلاتوکسین B1 و بررسی سیتوتوکسیسیتی..... ۷۴
۲-۲-۱ انتخاب دوز و زمان مناسب تیمار با افلاتوکسین B1 (AFB1) براساس آزمون MTT.. ۷۴
۲-۲-۱-۲ تیمار بن یاخته‌های مزانشیمی و $CD34^+$ و هپاتوسیت‌های حاصل از آنها با افلاتوکسین B1..... ۷۴
۲-۲-۱-۳ نحوه انجام آزمون MTT..... ۷۵
۲-۲-۱-۴ آنالیز آماری..... ۷۵
۲-۳ بررسی آسیب DNA به روش کامت..... ۷۶
۲-۳-۱ بررسی آسیب DNA یاخته‌ها با آزمون کامت قلیایی..... ۷۶
۲-۳-۱-۱ مرحله آماده سازی لام‌ها..... ۷۹
۲-۳-۱-۲ قرار دادن یاخته‌ها بر روی لام‌ها..... ۷۹
۲-۳-۱-۳ لیز کردن یاخته‌ها..... ۸۰

۲-۳-۱-۴ مرحله تیمار قلیایی ۸۰
۲-۳-۱-۵ مرحله الکتروفورز ۸۱
۲-۳-۱-۶ مرحله خنثی سازی و تثبیت ۸۱
۲-۳-۱-۷ مرحله رنگ آمیزی ۸۱
۲-۳-۱-۸ بررسی میکروسکوپی و ارزیابی نتایج ۸۲
۲-۴ انجام QPCR به منظور کمی کردن آسیب‌های DNA ۸۵
۲-۴-۱ روشPCR کمّی (QPCR) ۸۵
۲-۴-۲ مواد و ترکیبات مورد استفاده در QPCR ۸۸
۲-۴-۲-۱ استخراج DNA نمونه‌ها ۸۸
۲-۴-۲-۲ مواد لازم جهت PCR ۸۸
۲-۴-۲-۲-۱ انتخاب پرایمر ۸۹
۲-۴-۲-۳ شرایط انجام QPCR ۹۰
۲-۴-۲-۴ آنالیز داده‌های QPCR ۹۱

فصل سوم: نتایج

۳-۱ درصد زنده بودن بن‌یاخته‌های مزانشیمی و $CD34^+$ جدا شده قبل از کشت ۹۴
۳-۲ بیان مارکرهای اختصاصی در سطح بن‌یاخته‌های مزانشیمی و $CD34^+$ ۹۴
۳-۳ خصوصیات ریخت شناسی بن‌یاخته‌های مزانشیمی و $CD34^+$ ۹۸
۳-۴ ارزیابی نتایج تأیید پتانسیل تمایزی بن‌یاخته‌های مزانشیمی به رده‌های استئوبلاست و آدیپوسیت ۹۹
۳-۵ ویژگی‌های ریخت شناسی یاخته‌های مشتق شده از بن‌یاخته‌های مزانشیمی و $CD34^+$ ۱۰۱
۳-۶ بیان آلبومین و آلفافیتوپروتئین در یاخته‌های شبه هپاتوسیتی حاصل از بن‌یاخته‌های مزانشیمی و $CD34^+$ ۱۰۲
۳-۷ بیان mRNA (RT-PCR) ژن‌های اختصاصی هپاتوسیت‌ها در یاخته‌های تمایز یافته ۱۰۷
۳-۸ ارزیابی آزمون MTT برای بدست آوردن زمان و دوزهای مناسب تیمار با افلاتوکسین B1 .....۱۱۰
۳-۹ آسیب DNA در بن‌یاخته‌های مزانشیمی و $CD34^+$ تیمار شده با افلاتوکسین B1 براساس آزمون کامت ۱۱۲
۳-۱۰ آسیب DNA ناشی از افلاتوکسین B1 در یاخته‌های هپاتوسیتی و یاخته‌های پروژنیتور آنها طی آزمون کامت ۱۱۵
۳-۱۱ مقایسه نتایج آزمون کامت در هپاتوسیت‌های تیمار شده با افلاتوکسین B1 .....۱۱۷
۳-۱۲ کمّی کردن آسیب DNA در بن‌یاخته‌های مزانشیمی و $CD34^+$ تیمار شده با افلاتوکسین B1 .....۱۱۸

۳-۱۳ مقایسه فراوانی آسیب DNA و میزان محصول PCR در هپاتوسیت‌های حاصل از بن یاخته‌های خون بندناف با بن‌یاخته‌های مربوط به آنها ۱۲۰
۳-۱۴ مقایسه مقدار آسیب‌های ژنوم هسته‌ای در هپاتوسیت‌های تمایز یافته از بن‌یاخته‌های خون بندناف ۱۲۳
۴-۱ تمایز بن‌یاخته‌های خون بندناف به سمت هپاتوسیت ۱۲۶
۴-۲ بررسی آسیب ناشی از افلاتوکسین B1 در یاخته‌های شبه هپاتوسیتی و بن‌یاخته‌های خون بندناف ۱۳۱
۴-۳پیشنهادها ۱۴۰
منابع: ۱۴۱
ضمائم ۱۷۰

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱. انواعی بافت‌هایی که MSCها را از آنها جدا نموده‌اند ۱۸
جدول ۱-۲. مهار کننده‌ها و تحریک کننده‌های رشد یاخته‌های کبدی ۳۱
جدول ۱-۳. معیارهای لازم در تعریف هپاتوسیت‌ها ۳۶
جدول ۲-۱. انواع ستون‌های MACS و جداکننده‌های مغناطیسی لازم برای جداسازی یاخته‌ها. ۵۰
جدول ۲-۲. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای PCR ژن‌های کبدی ۶۹
جدول ۲-۳. شرایط مورد استفاده برای PCR ژن‌های کبدی ۷۱
جدول ۲-۴. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های هسته‌ای در روش QPCR ۸۹
جدول ۲-۵. شرایط PCR ژن‌های هسته‌ای در QPCR ۹۱
جدول ۳-۱ فراوانی آسیب‌ها در بن‌یاخته‌ها و یاخته‌های هپاتوست ۱۱۸

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱. مسیرهای معمول خودنوسازی و تمایز در بن‌یاخته‌ها ۵
شکل۱-۲. گزارش سازمان جهانی اهدای مغز استخوان ۱۱
شکل ۱-۳. نمایی از ماتریکس خارج یاخته‌ای تعاملات عوامل آن با یکدیگر ۳۰
شکل ۱-۴. پیام‌های متعددی مورد نیاز برای بلوغ هپاتوسیت‌ها ۳۴
شکل ۱-۵. ساختار شیمیایی ۶ گونه مهم افلاتوکسین ۴۰
شکل ۱-۶. مسیرهای عمده متابولیسم افلاتوکسین B1 ۴۱
شکل ۲-۱. لایه‌های حاصل از سانتریفیوژ خون بند ناف ۴۸
شکل ۲-۲. ستون و جداکننده مغناطیسی (MidiMACS) ۵۱
شکل ۲-۳. شمایی از مراحل انجام آزمون کامت قلیایی ۷۷
شکل ۲-۴. نرم‌افزار کامت ۴ برای آنالیز کامت‌ها ۸۳
شکل ۲-۵. تقسیم‌بندی کامت یاخته‌ها در آزمون کامت. ۸۴
شکل ۲-۶. راهکار QPCR برای تشخیص آسیب DNA ۸۷
شکل ۳-۱. بررسی ایمونوتایپینگ بن یاخته‌های مزانشیمی خون بندناف انسان با فلوسایتومتری ۹۶
شکل ۳-۲. بررسی ایمونوتایپینگ بن یاخته‌های $CD34^+$ خون بندناف انسان با فلوسایتومتری ۹۷
شکل ۳-۳. مشخصات مورفولوژیکی بن‌یاخته‌های مزانشیمی. ۹۸
شکل ۳-۴. مشخصات مورفولوژیکی $CD34^+$ها ۹۹
شکل ۳-۵. تمایز یاخته‌های مزانشیمی به رده استخوان ۱۰۰
شکل ۳-۶. تمایز یاخته‌های مزانشیمی به رده چربی ۱۰۰
شکل ۳-۷. ویژگی‌های ریخت شناسی هپاتوسیت‌های مشتق شده از بن‌یاخته‌های مزانشیمی و $D34^+$ ۱۰۲
شکل ۳-۸. تولید پروتئین‌های آلبومین و آلفا فیتو پروتئین در یاخته‌های HepG2 ۱۰۴
شکل ۳-۹. رنگ‌آمیزی ایمونوفلوئورسنت پروتئین آلبومین و آلفا فیتوپروتئین در یاخته‌های شبه هپاتوسیتی و بن‌یاخته‌های مزانشیمی ۱۰۵
شکل ۳-۱۰. رنگ‌آمیزی ایمونوفلوئورسنت پروتئین آلبومین و آلفا فیتوپروتئین در یاخته‌های شبه هپاتوسیتی و $CD34^+$ها ۱۰۶

شکل ۳-۱۱. بیان ژن‌های مارکر کبدی دریاخته‌های هپاتوسیتی تمایز یافته از بن یاخته‌های مزانشیمی. ۱۰۸
شکل ۳-۱۲. بیان ژن‌های مارکر کبدی دریاخته‌های هپاتوسیتی تمایز یافته از بن یاخته‌های $CD34^+$ ۱۰۹
شکل ۳-۱۳. اثر سمیّت افلاتوکسین B1 قبل و بعد از تمایز هپاتوسیتی بن یاخته‌های خون بندناف ۱۱۱
شکل ۳-۱۴. کامت بن‌یاخته‌های $CD34^+$ و یاخته‌های شبه هپاتوسیتی..... ۱۱۳
شکل ۳-۱۵. کامت بن‌یاخته‌های مزانشیمی و یاخته‌های شبه هپاتوسیتی ۱۱۴
شکل ۳-۱۶. آسیب DNA ناشی از افلاتوکسین B1 در بن‌یاخته‌های خون بندناف ۱۱۵
شکل ۳-۱۷. آسیب DNA بواسطه افلاتوکسین B1 در یاخته‌های شبه هپاتوسیتی و یاخته‌های پروژنیتور آنها. ۱۱۶
شکل ۳-۱۸. آسیب DNA ناشی از افلاتوکسین B1 در یاخته‌های شبه هپاتوسیتی حاصل از بن‌یاخته‌های خون بندناف..... ۱۱۷
شکل ۳-۱۹. اثر افلاتوکسین B1 بر تکثیر DNA در QPCR بن‌یاخته‌های مزانشیمی و $CD34^+$ . . ۱۱۹
شکل ۳-۲۰. مقایسه اثر افلاتوکسین B1 بر تکثیر DNA در QPCR انجام شده روی هپاتوسیت‌های مزانشیمی و بن‌یاخته‌های مربوط به آنها..... ۱۲۱
شکل ۳-۲۱. مقایسه اثر افلاتوکسین B1 بر تکثیر DNA در QPCR انجام شده روی هپاتوسیت‌های حاصل از $CD34^+$ها و بن‌یاخته‌های مربوط به آنها..... ۱۲۲
شکل ۳-۲۲. مقایسه اثر افلاتوکسین B1 بر تکثیر DNA در QPCR انجام شده روی هپاتوسیت‌های حاصل از بن‌یاخته‌های خون بندناف..... ۱۲۴

فصل اول

مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱ تاریخچه مطالعات بر روی بن‌یاخته‌ها

یافته‌های ما در مورد زیست شناسی بن‌یاخته‌ها و کاربری آنها تقریباً به ۴۰ سال پیش برمی‌گردد. در سال‌های میانی ۱۸۰۰ یاخته به عنوان بنای اولیه ساختمانی موجود زنده معرفی شد و محققان دریافتند که برخی از یاخته‌ها قادرند سایر یاخته‌های بدن را بوجود آوردند. در اوایل سال‌های ۱۹۰۰ سعی بر این بود که تخمک پستانداران را در محیط in vitro بارور نمایند و در این حین دریافتند که برخی یاخته‌ها، خون و سایر یاخته‌های لازم برای تکامل جنین را ایجاد می‌کنند. در سال ۱۹۵۴ استیونز[1] و لیتل[2] دریافتند در تستیس ۱٪ موشهای نژاد ۱۲۹، تراتوماها بطور خودبخود اتفاق می‌افتد و در ادامه در سال ۱۹۶۴ استیونز نشان داد که با پیوند بخشی از جنین این نژاد و سایر نژادها به تستیس موش‌های بالغ می‌توان این نوع سرطان را در آنها القا کرد. در این بین برخی از تومورهای ایجاد شده بدخیم بوده و قابلیت پیوند مجدد را داشتند. در میان یاخته‌های تراتوکارسینوما برخی از آنها تمایزنیافته بودندکه به بعدها یاخته‌های کارسینومای جنینی معروف شدند. تا مدت‌های مدیدی تصور بر این بود که این یاخته‌ها بن‌یاخته‌های توموری هستند. در سال ۱۹۶۴ کلین اسمیت[3] و پیرس[4] ویژگی بنیادی بودن این یاخته‌ها را اثبات کردند و در سال ۱۹۷۱ بن‌یاخته‌های بنا فید[5] را از موش

[1] Stevens
[2] Little
[3] Kleinsmith
[4] Pierce
[5] Bona fide

جدا کردند. در سال ۱۹۷۸ بن‌یاخته‌ها را از خون بندناف انسان جدا کردند. در سال ۱۹۸۸ بن‌یاخته بن‌یاخته رویانی را از همستر بدست آوردند و در سال ۱۹۹۵ بن‌یاخته‌های رویانی را از میمون جداکردند. تامسون[۱] در سال ۱۹۹۸ بن‌یاخته رویانی انسان را جدا کرد و در همان سال گرهارد[۲] بن‌یاخته‌های زایای انسان را جدا نمود [۱-۳]. براساس آنچه که توسط روبی[۳] گفته شده است:" ما آموخته‌ایم که بن‌یاخته‌ها را بیشتر براساس آنچه می‌توانیم با آنها در آزمایشگاه انجام دهیم شناسایی کنیم نه لزوماً براساس آنچه که در بافت مربوطه انجام می‌دهند." در اغلب تعاریف پایه، بن‌یاخته‌ها ظرفیت نوسازی[۴] داشته و توانایی تبدیل شدن به یک یا تعداد بیشتری از انواع زاده‌های تمایز یافته را دارند [۴]. توانایی بن‌یاخته‌ها در نوسازی و تمایز به "بنیادی بودن"[۵] تعبیر می‌شود [۵]. عبارت بن‌یاخته به یاخته‌های پیش‌سازی اطلاق می‌شود که می‌توانند به انواعی از بافت‌ها تبدیل شوند. هر چند که سؤالات زیادی در رابطه با آنها وجود دارد از جمله اینکه؛ علت انعطاف این یاخته‌ها از نظر تکاملی چیست، چه تعداد مسیر تمایزی مختلف را می‌توانند طی کنند و کدام بخش از بافت‌ها را تشکیل می‌دهند.

۱-۲ انواع بن‌یاخته‌ها

۱-۲-۱ انواع بن‌یاخته‌ها براساس قابلیت تمایز

براساس قابلیت تمایز این یاخته‌ها را به چند دسته طبقه‌بندی می‌کنند:

۱. یاخته‌های همه قابلیتی[۶] که تمامی اجزا موجود زنده را پدید می‌آورند؛

[1] Thomson
[2] Gerhard
[3] Robey
[4] Self renewal
[5] Stemness
[6] Totipotent