بسم الله الرحمن الرحیم

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

خانم زهرا السادات هاشمی رشته بیوتکنولوژی پزشکی پایان‌نامه کارشناسی ارشد خود را با عنوان « بررسی مهار بیان ژن TGF-β در سلولهای بنیادی خون بندناف بر روی داربست سه بعدی MBA جهت افزایش خودتکثیری این سلولها» در تاریخ ۱۳۹۰/۱۱/۱۵ 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 مهدی فروزنده مقدم	(استاد راهنما)
دکتر مسعود سلیمانی	(استاد مشاور)
دکتر علی اکبر پورفتح اله	(استاد ناظر)
دکتر ناصر امیری زاده	(استاد ناظر)
دکتر حسین تهرانی	(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 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 **زهراالسادات هاشمی** دانشجوی رشته **بیوتکنولوژی پزشکی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۸** 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 ۹۰/۵/۲۷

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 **بیوتکنولوژی پزشکی** است که در سال **۱۳۹۰** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **جناب آقای دکتر فروزنده**، مشاوره **جناب آقای دکتر سلیمانی** 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 **زهراالسادات هاشمی** دانشجوی رشته **بیوتکنولوژی پزشکی** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی زهراالسادات هاشمی

تاریخ و امضا ۹۰/۵/۲۰

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه

دوره کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی پزشکی

عنوان

بررسی مهاربیان ژن TGF-β در سلولهای بنیادی خون بند ناف برروی داربست سه بعدی MBA جهت افزایش خودتکثیری این سلولها

نگارش

زهراالسادات هاشمی

استاد راهنما

دکتر مهدی فروزنده مقدم

استاد مشاور

دکتر مسعود سلیمانی

زمستان ۱۳۹۰

تقدیم به

- این پایان نامه نتیجه دو سال و نیم تحقیق می باشد و اگر قابل تقدیم باشد آن را به ساحت مقدس صاحب الزمان، امام عصر (عج) تقدیم می کنم. باشد که با ظهور خود عدالت را برقرار کند و جهان منتظر را از ظلمت و تنهایی نجات دهد و نور هستی بخش، ایمان، عشق و مساوات را حاکم گرداند. با امید به اینکه این برگ ناچیز را پذیرا باشند.

- تقدیم به مقدس ترین واژه هستی "خانواده": به پدر و مادر عزیزتر از جانم، به خواهرم زینب و برادرم مهدی که شوق آموختن و محبت ورزیدن را بمن آموختند.

تشکر و قدردانی

اینک که در سایه الطاف الهی توانسته ام این تحقیق را به پایان برسانم، از استاد عزیز و بزرگوارم **جناب آقای دکتر مهدی فروزنده مقدم** تشکر می کنم که همواره اینجانب را به مسیر درست هدایت کرده و مشعل علم را بمن نشان دادند که مانند ایشان بی دریغ به نشر آن بپردازم. و نیز با تشکر، سپاس و قدردانی فراوان از زحمات بی شایبه استاد گرانقدر **جناب آقای دکتر مسعود سلیمانی** که مرزهای مرسوم استاد و شاگردی را برای اولین بار برای این بنده شکستند و بمن نور امید را نشان دادند.

از دوستان عزیزم در گروه بیوتکنولوژی پزشکی بالاخص خانم **ناصری** و خانم ها **مهرداد، جعفری، فرخی منش** و نیز از آقای **کروندیان** که با رفتار خود صبر را بمن آموختند، کمال تشکر را دارم.

از دوستانم در گروه هماتولوژی: خانم دکتر **کوهکن**، دکتر **خمیسی پور** و آقای **مصاحبی** تشکر می کنم و امیدوارم همواره این عزیزان مورد لطف و عنایت پروردگار باشند و در سایر مسیرهای زندگی نیز موفق و پیروز باقی بمانند.

چکیده

برای غلبه بر مشکل محدودیت تعداد سلولهای+CD34 در پیوند آلوژنیک مغز استخوان بالغین، می بایست این سلولها مورد تزاید قرار گیرند. برای این منظور همزمان از کشت سه بعدی (روی داربست MBA) و دستورزی ژنتیکی (مهار مسیرTGF-β) سلولها استفاده شد. این مهار با کمک تکنیک siRNA علیه گیرنده نوع۲ در مسیر انتقال پیام انجام گشت. در بدن تماس و ارتباط بین سلول استرومال و SC، به دلیل وضعیت آشیانه سلولی، بصورت سه بعدی است و می توان از این مدل برای شبیه سازی سیستم تحویل RNAi در حالت *in vivo* استفاده کرد.

در ابتدا سلولهای پروژنیتور مزانشیمی یعنی سلولهای بنیادی سوماتیک غیرمحدودشده (USSC)، از خون بندناف جداشده و از نظر مورفولوژی و ایمونولوژیکی تایید شدند. سپس روی داربستMBA به عنوان لایه مغذی فیدر کوت شدند. سلولهای+CD34 با روشMACS ازجفت انسانی تخلیص و در سه حالت: دوبعدی ساده، دوبعدی به همراه فیدر و سه بعدی با siRNA تیمارشدند. پس از شمارش سلولی، RNAکل سلولی تخلیص، cDNA سنتز و Real Time PCR کمی انجام گشت. درنهایت آنالیز فلوسایتومتری برای مارکر سطحی CD34 انجام شد.

نتایج نشان داد که در هر سه حالت، گروه تیمار شده نسبت به کنترل: تعداد بیشتری سلول، بیان کمتری از ژن TGFbR2 و درصدبیشتری مارکر سطحی CD34 را دارند. ولی مقایسه کلی بین سه گروه تیمار شده در سه حالت کشت شده نشان داد که بیشترین میزان تزاید، بیشترین کاهش بیانTGFbR2 و بالاترین میزان بیان مارکرCD34 متعلق به گروه تیمار شده در کشت دوبعدی ساده است که نشان از تاثیر بیشترsiRNA روی تکثیر و کاهش تمایز SC داشته است. می توان گفت سیستم تحویلRNAi نیاز به آزادی سلول هدف در سه بعد دارد بنابراین سلولها در کشت سه بعدی با سلولهای فیدر درگیر و کمتر در دسترس siRNA هستند که منجر به کاهش کارایی ترانسفکشن در محیط *ex vivo* (شبیه سازی شده ی*in vivo*) است.

کلمات کلیدی: سلولهای +CD34، داربست MBA، سلولهای USSC، مسیر TGF-β، siRNA

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱. مهندسی بافت ۲

۱-۱-۱. مقدمه ۲

۱-۱-۲. تاریخچه داربستهای مهندسی بافت ۳

۱-۱-۳. ویژگی های عملکردی داربست ۵

۱-۱-۴. کاربردهای داربست ۵

۱-۱-۵. مزایای داربست ۷

۱-۱-۶. محدودیت های داربست ۸

۱-۱-۷. بهینه سازی استفاده از داربست ها ۹

۱-۱-۸. معایب داربست های مهندسی بافت ۱۰

۱-۲. سلول های بنیادی ۱۰

۱-۲-۱. انواع سلول های بنیادی ۱۱

۱-۲-۱-۱. سلول های بنیادی جنینی ۱۱

۱-۲-۱-۲. سلول های بنیادی بالغ ۱۲

۱-۲-۱-۳. سلول های بنیادی همه ظرفیتی ۱۲

۱-۲-۱-۴. سلول های بنیادی پر ظرفیتی ۱۳

۱-۲-۱-۵. سلول های بنیادی چند ظرفیتی ۱۳

۱-۲-۱-۶. سلول های بنیادی تک ظرفیتی ۱۳

۱-۲-۲. سلول های بنیادی خونساز ۱۴

۱-۲-۳. خون بند ناف منبعی از سلول های بنیادی ۱۴

۱-۲-۴. سلول های بنیادی سوماتیک غیر محدود شده ۱۶

۱-۲-۵. ازدیاد سلول های بنیادی خون بند ناف ۱۷
۱-۲-۶. کشت سه بعدی سلول های بنیادی ۲۰
۱-۲-۷. ساختار میکرومحیط سلول های بنیادی ۲۱
۱-۲-۸. داربست MBA ۲۳
۱-۳. مسیر سیگنالدهی TGF-β ۲۵
۱-۴. روش RNA تداخلی ۲۷
۱-۴-۱. انواع روش های RNAi ۲۸
۱-۴-۲. سیستم RNAi در پستانداران ۳۰
۱-۴-۳. طراحی الیگونوکلئوتیدهای siRNA ۳۱
۱-۴-۴. کاربردهای درمانی و تحقیقاتی RNAi ۳۲
۱-۵. هدف از این تحقیق ۳۴
فصل دوم: مواد و روش‌ها ۳۶
۲-۱. وسایل ۳۷
۲-۲. دستگاه ها ۳۷
۲-۳. مواد ۳۸
۲-۳-۱. مواد بخش سلولی ۳۸
۲-۳-۱-۱. مواد مورد نیاز برای سلول های USSC ۳۸
۲-۳-۱-۱-۱. محیط کشت برای جداسازی سلول های USSC ۳۸
۲-۳-۱-۱-۲. محیط کشت برای نگهداری سلول های USSC ۳۹
۲-۳-۱-۱-۳. مواد مورد نیاز برای پاساژ سلول های USSC ۴۰
۲-۳-۱-۱-۴. محیط فریزینگ برای نگهداری طولانی مدت USSC ۴۱
۲-۳-۱-۱-۵. مواد مورد نیاز برای تست های تشخیصی USSC ۴۱

۲-۳-۱-۱-۶. مواد مورد نیاز برای کاشت سلول های USSC روی داربست MBA ۴۳
۲-۳-۱-۱-۷. مواد مورد نیاز برای آماده سازی نمونه جهت عکسبرداری میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ ۴۴
۲-۳-۱-۱-۸. سایر مواد ۴۴
۲-۳-۱-۲. مواد مورد نیاز برای سلول های +CD34 ..... ۴۵
۲-۳-۱-۲-۱. مواد مورد نیاز برای جداسازی سلول های +CD34 ..... ۴۵
۲-۳-۱-۲-۲. محیط کشت برای نگهداری سلول های +CD34 ..... ۴۵
۲-۳-۱-۲-۳. مواد مورد نیاز برای سنجش کلنی (colony assay) ۴۶
۲-۳-۱-۲-۴. مواد مورد نیاز برای کاریوتایپ ۴۶
۲-۳-۲. مواد بخش مولکولی ۴۷
۲-۳-۲-۱. مواد مورد نیاز برای ترانسفکشن ۴۷
۲-۳-۲-۲. مواد مورد نیاز برای تخلیص RNA ۴۹
۲-۳-۲-۳. مواد مورد نیاز برای تیمار DNase ۴۹
۲-۳-۲-۴. مواد مورد نیاز برای سنتز cDNA ۵۰
۲-۳-۲-۵. مواد مورد نیاز برای واکنش RT-PCR ۵۱
۲-۳-۲-۶. مواد مورد نیاز برای واکنش real time PCR ۵۲
۲-۳-۲-۷. مواد مورد نیاز برای الکتروفورز ۵۲
۲-۴. روش ها ۵۴
۲-۴-۱. پروتوکل های بخش سلولی ۵۴
۲-۴-۱-۱. جداسازی سلول های بنیادی UCB-USSC ۵۴
۲-۴-۱-۲. کشت سلولی ۵۵
۲-۴-۱-۳. فریز کردن سلول های USSC ۵۵

۲-۴-۱-۴. دیفریز کردن سلول های USSC ۵۶
۲-۴-۱-۵. شمارش سلولی ۵۶
۲-۴-۱-۶. تعیین درصد زنده بودن سلول ها (viability test) ۵۷
۲-۴-۱-۷. ایمونوفنوتایپ تاییدی با روش فلوسایتومتری ۵۷
۲-۴-۱-۸. تمایز با استفاده از فاکتورهای القایی – رشدی ۵۸
۲-۴-۱-۹. پروتوکل رنگ آمیزی اختصاصی Alizarin Red ۵۸
۲-۴-۱-۱۰. پروتوکل رنگ آمیزی اختصاصی Oil Red ۵۹
۲-۴-۱-۱۱. کاشت سلول های USSC روی داربست MBA ۵۹
۲-۴-۱-۱۲. عکسبرداری SEM ۶۰
۲-۴-۱-۱۳. کشت سلول های USSC در پلیت ۶۰
۲-۴-۱-۱۴. غیر فعال سازی لایه فیدر USSC با میتومایسین C ۶۰
۲-۴-۱-۱۵. جداسازی سلول های بنیادی خونساز CD34+ ۶۱
۲-۴-۱-۱۶. روش سنجش کلنی (colony-forming assays) ۶۳
۲-۴-۱-۱۷. بررسی سیتوژنتیک (کاریوتایپ) ۶۳
۲-۴-۲. پروتوکل های بخش مولکولی ۶۴
۲-۴-۲-۱. ترانسفکت نمودن سلول ها با Lipofectamine^{TM} RNAi MAX ۶۴
۲-۴-۲-۲. بررسی موثر بودن ترانسفکشن ۶۸
۲-۴-۲-۳. پروتوکل تخلیص RNA ۶۹
۲-۴-۲-۴. الکتروفورز RNA ۷۰
۲-۴-۲-۵. اندازه گیری RNA کل (توتال) ۷۰
۲-۴-۲-۶. پروتوکل تیمار DNase ۷۰
۲-۴-۲-۷. پروتوکل سنتز cDNA ۷۱
۲-۴-۲-۸. انجام RT-PCR ۷۲

۲-۴-۲-۹. انجام real time PCR ۷۳

فصل سوم: نتایج و یافته‌ها ۷۷

۳-۱. نتایج مربوط به سلول های USSC ۷۸

۳-۲. نتایج حاصل از تست های تشخیصی سلول های USSC ۷۹

۳-۲-۱. پاساژ های پی در پی ۷۹

۳-۲-۲. ایمونوفنوتایپ تأییدی با روش فلوسایتومتری ۸۰

۳-۲-۳. بررسی توانایی تمایزی سلول های USSC به سلول های استخوانی و چربی با کمک محیط های تمایزی. ۸۱

۳-۳. نتایج حاصل از عکسبرداری SEM از سطح داربست MBA ۸۲

۳-۴. غیر فعال سازی لایه فیدر ۸۴

۳-۵. سلول های بنیادی خون بند ناف ۸۴

۳-۶. ترانسفکشن سلول های بنیادی با استفاده از Lipofectamine RNAi MAX ۸۶

۳-۷. شمارش سلول های +CD34 ..... ۸۸

۳-۸. استخراج RNA و خالص سازی آن با DNase I ۹۲

۳-۹. cDNA سازی ۹۳

۳-۱۰. نتایج حاصل از بهینه سازی RT-PCR ۹۳

۳-۱۱. نتایج حاصل از Real Time PCR ۹۵

۳-۱۱-۱. منحنی استاندارد ۹۵

۳-۱۱-۲. نتایج حاصل از real time PCR مربوط به نمونه های مورد آزمایش ۹۸

۳-۱۲. نتایج حاصل از colony assay ۱۰۰

۳-۱۳. انجام فلوسایتومتری ۱۰۲

۳-۱۴. نتایج بررسی سیتوژنتیک (کاریوتایپ) ۱۰۵

فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۱۰۷

۴-۱. بحث ۱۰۸
۴-۲. نتیجه گیری ۱۱۳
۴-۳. پیشنهادها ۱۱۸
فهرست منابع ۱۲۰
چکیده انگلیسی ۱۲۷

فهرست جداول

جدول۲-۱. مواد مورد نیاز برای تهیه بافر PBS..... ۴۰

جدول۲- ۲. فاکتورهای تمایزی اختصاصی جهت تمایز چربی..... ۴۲

جدول۲- ۳. فاکتورهای تمایزی اختصاصی جهت تمایز استخوان..... ۴۲

جدول۲- ۴. فاکتورهای مورد نیاز برای کشت سلول بنیادی..... ۴۶

جدول۲- ۵. اطلاعات مربوط به اولیگونوکلئوتیدهای RNAiعلیهTGFβR2درسایتinvitrogen..... ۴۷

جدول۲- ۶ . توالی ۳ نوع siRNA بکار رفته..... ۴۸

جدول۲- ۷. ویژگی های پرایمر ژن House Keeping..... ۵۱

جدول۲- ۸. ویژگی های پرایمر ژن هدف..... ۵۲

جدول۲- ۹. جدول پیشنهادی شرکت invitrogen برای انجام ترانسفکشن..... ۶۵

جدول۲- ۱۰. میزان مواد مورد نیاز برای واکنش ترموسایکلر ژن House Keeping..... ۷۳

جدول۲- ۱۱. میزان مواد مورد نیاز برای واکنش ترموسایکلر ژن مورد هدف..... ۷۳

جدول۲- ۱۲. میزان مواد مورد نیاز برای واکنش real time PCR ژن House Keeping..... ۷۴

جدول۲- ۱۳. میزان مواد مورد نیاز برای واکنش real time PCR ژن هدف..... ۷۴

جدول۳- ۱. شمارش سلولهای +CD34 در حالات و زمانهای مختلف..... ۹۰

جدول۳- ۲. بیان نسبی و درصد کاهش بیان ژن TGFbR2 در حالات مختلف..... ۹۹

جدول۳- ۳. درصد بیان مارکرCD34 با آنالیز فلوسایتومتری..... ۱۰۲

فهرست نمودارها

نمودار۳- ۱. نمودار دوبرابرشدن جمعیت سلولهایUSSC..... ۷۹

نمودار۳- ۲. ایمونوفنوتیپ سلول های USSC..... ۸۰

نمودار۳- ۳. نمودار فلوسایتومتری HSCs از نظر میزان بیان مارکرCD34 در سطح سلولها در روز جداسازی..... ۸۵

نمودار۳- ۴. میزان تزاید سلول های +CD34 در حالات مختلف..... ۹۱

نمودار۳- ۵. نسبت تزاید گروه تست به کنترل در حالات مختلف..... ۹۲

نمودار۳- ۶. نمودار تکثیر منحنی استاندارد ژن β-actin..... ۹۵

نمودار۳- ۷. بررسی منحنی melt ژن β-actin..... ۹۶

نمودار۳- ۸. رسم منحنی استاندارد برای ژن β-actin..... ۹۶

نمودار۳- ۹. نمودار تکثیر منحنی استاندارد ژن TGFβR2..... ۹۷

نمودار۳- ۱۰. رسم منحنی استاندارد برای ژن TGFβR2..... ۹۷

نمودار۳- ۱۱. بررسی منحنی melt ژن TGFβR2..... ۹۷

نمودار۳- ۱۲. بیان نسبی ژن TGFbR2 در حالات مختلف..... ۹۹

نمودار۳- ۱۳. درصد کاهش بیان ژن TGFbR2 در حالات مختلف..... ۱۰۰

نمودار۳- ۱۴. درصد بیان مارکرCD34 با آنالیز فلوسایتومتری..... ۱۰۲

نمودار۳- ۱۵. میزان افزایش مارکر سطحیCD34 در گروه تست نسبت به کنترل درحالات مختلف. ۱۰۳

نمودار۳- ۱۶. نمودار فلوسایتومتری HSCs از نظر میزان بیان مارکرCD34 در سطح سلولها..... ۱۰۴

نمودار۳- ۱۷. بررسی میزان ازدیاد فنوتیپی سلولهای بنیادی خونساز +CD34..... ۱۰۵

فهرست شکل‌ها

شکل ۱- ۱. تمایز سلول های بنیادی خونی و استرومایی. ۱۵

شکل ۱- ۲. آناتومی و ساختمان آشیانه سلولی سلول های بنیادی خونی. ۲۱

شکل ۱- ۳. تصویری از داربست MBA ۲۳

شکل ۱- ۴. مسیر سیگنالدهی TGFβ ۲۶

شکل ۱- ۵. جفت شدن miRNA به mRNA هدف. ۲۹

شکل ۲- ۱. انجام همردیفی بین mRNAدوواریانت ژن TGFbR2باکمک نرم افزارMEGA4 ..... ۴۸

شکل ۲- ۲. تصویری شماتیک از محل اثر ۳ نوعsiRNA. ۴۹

شکل ۲- ۳. تصویری از باندهای Ladder روی ژل آگارز. ۵۴

شکل ۲- ۴. تصویری از ستون های جداسازی متعلق به شرکت Miltenyi Biotech ۶۳

شکل ۲- ۵. تصویر شماتیک از روزهای انجام آزمایش. ۶۷

شکل ۲- ۶. تصویر شماتیک از پلیت ۴۸ خانه که مورد آزمایش قرار گرفت. ۶۷

شکل ۳- ۱. کلنی های اولیه USSC پس از دو هفته کشت در محیط اختصاصی.. ..... ۷۸

شکل ۳- ۲. رنگ آمیزی اختصاصی سلول های USSC پس از تمایز. ۸۲

شکل ۳- ۳. عکسبرداری SEM از سطح داربست MBA. ۸۳

شکل ۳- ۴. تصویر لایه فیدر از سلول های USSC با تراکم ۸۰٪. ۸۴

شکل ۳- ۵. تصویر سلول های +CD34 در محیط اختصاصی. ۸۵

شکل ۳- ۶. تصویر سلول های +CD34 ترانسفکت شده در زیر میکروسکوپ فلورسنت.....۸۷

شکل ۳- ۷. تصویری ازهم کشتی ۳۰ هزارسلول +CD34 روی فیدری ازسلول های USSC. ۸۹

شکل ۳- ۸. تصویری از پلیت هم کشتی +CD34 وUSSC در۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن.....۸۹

شکل ۳- ۹. RNA تخلیص شده روی ژل آگارز. ۹۳

شکل ۳- ۱۰. تصویری از بهینه سازی شرایط PCR برای ژن TGFβR2.....۹۴

شکل ۳- ۱۱. تصویری از محصول RT-PCR روی ژل آگارز.....۹۴

شکل ۳- ۱۲. کلنی های حاصل از تمایز سلولهای +CD34. .....۱۰۱

شکل ۳- ۱۳. کاریوتایپ تهیه شده از سلولهای در حال تکثیر خون بندناف در شرایط هم کشتی با سلولهای استرومایی USSC.....۱۰۶

شکل۴-۱. تصویر شماتیک از یک چاهک پلیت ۴۸ خانه که حاوی داربست MBA است.....۱۱۲

شکل۴-۲. تصویر شماتیک از حفره ای در داربست MBA. ۱۱۳

شکل۴-۳. تصویر واقعی از سلولهای +CD34 در بین سلولهای فیدر USSC. ۱۱۴

فصل اول

مقدمه و

مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱. مهندسی بافت

۱-۱-۱. مقدمه

مهندسی بافت حیطه ای چند رشته ای از اصول و کاربرد روش های مهندسی و علوم زیستی، به منظور شناخت بنیادی رابطه بین ساختار و عملکرد در بافت های طبیعی و بیمار است. این حیطه، ترکیبی از سلول ها، مهندسی، مواد و فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی مناسب می باشد که هدف آن حفظ حالت پایدار بافت و یا بهتر کردن عملکرد بافت هدف و یا جایگزین کردن عملکرد زیستی بافت است[۱-۲]. بدین جهت دربحث طب ترمیمی و مهندسی بافت استفاده از سلول های بنیادی را شاهد هستیم. اصطلاح مهندسی بافت به شکل امروزی اولین بار در ۱۹۸۵ توسط فونگ[1] مطرح گشت و از سال ۱۹۸۷ یعنی پس از جلسه ی بنیاد ملی علوم[2] سرمایه گذاری ها بر روی مهندسی بافت آغاز گردید. پیشرفت های اخیر در زمینه مهندسی بافت به منظور غلبه بر محدودیت های روش های مرسوم پیوند عضو و پیوند مواد می باشد[۳]. در این زمینه توانایی بالقوه برای ساخت عضو و بافت های مصنوعی وجود دارد بطوری که بافت و عضو پیوند زده شده پس از پیوند، همراه با فرد گیرنده رشد کند. با این روش راه حل دائمی برای درمان بافت های آسیب دیده وجود دارد، بطوری که نیازی به درمان های مکمل نبوده و در نتیجه هزینه درمان بسیار کاهش می یابد[۴]. تاکنون مهندسی بافت برای ترمیم بسیاری از بافت ها مانند استخوان، غضروف، رگ خونی و پوست بکار رفته است. بنابراین یک بافت برای انجام عمل خود یکسری ویژگی های ساختمانی و مکانیکی دارد. بدین منظور برای

[1] Y.C. Fung
[2] National Science Foundation (NSF)