بسم الله الرحمن الرحيم
الحمد لله رب العالمين الرحمن الرحيم مالك يوم الدين
اهدنا الصراط المستقيم صراط الذين
انعمت عليهم غير المغضوب عليهم
ولا الضالين

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

پایان نامه کارشناسی ارشد
رشته زیست شناسی سلولی و مولکولی

بررسی تمایز عصبی سلول‌های بنیادی بافت چربی پس از هم کشتی با سلول‌های بنیادی جنینی

نگارش
لیلا بهمنی

استاد راهنما
دکتر آرش جاوری

استاد مشاور
دکتر معصومه فخرطه

شهریور ۱۳۹۱

"حق استفاده از مفاد پایان نامه برای پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری محفوظ است."

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

رساله جهت دریافت کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی

موضوع پایان نامه

بررسی تمایز عصبی سلول های بنیادی بافت چربی پس از هم کشتی با سلول های بنیادی جنینی

نگارش

لیلا بهمنی

این پایان نامه در تاریخ ۱۳۹۱/۶/۲۹ توسط کمیته داوری مورد تایید قرار گرفته و با درجه ...عالی... ارزیابی گردید.

استاد راهنما: آیت‌الله [illegible]

استاد مشاور: معصومه [illegible]

داور داخلی: دکتر [illegible]

داور خارجی:

مدیر اداره تحصیلات تکمیلی:

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه زیست فناوری پزشکی

پیشگفتار

پیشگفتار

سیستم عصبی بر خلاف بافت‌های دیگر ظرفیت محدودی برای خود ترمیمی دارد، زیرا سلول‌های عصبی بالغ فاقد توانایی تکثیر مجدد[1] می‌باشند. سلول‌های بنیادی عصبی نیز علی‌رغم این که در مغز بالغ وجود دارند، از توانایی محدودی جهت تولید نورون‌های عملکردی جدید در پاسخ به ضایعات عصبی برخوردارند. به همین دلیل، بررسی امکان ترمیم سیستم عصبی توسط پیوند سلول‌هایی با توانایی جایگزین نمودن بافت آسیب دیده از اهمیت بسزایی برخوردار است. تا کنون پیوند بافت‌های جنینی برای ترمیم و بهبود عملکردی بافت‌های عصبی بیمار یا آسیب دیده به کار رفته است. به‌ویژه، یک سری از بیماران پارکینسونی توسط سلول‌های مزانسفالی بدست آمده از جنین‌های سقط شده ۶ الی ۹ هفته‌ای درمان شده‌اند (Defer et al., 1996). در هر حال، به دست آوردن بافت جنینی با موانع اخلاقی و منطقی زیادی مواجه است (Turner and Kearney, 1993). لذا، محققین استفاده از سلول‌های بنیادی را به عنوان یک منبع سلولی جایگزین مطرح نموده‌اند.

تحقیقات اخیر در زمینه سلول‌های بنیادی، احتمال استفاده از سلول‌های بنیادی بالغ، نظیر سلول-های بنیادی مزانشیمی را مطرح نموده است. مغز استخوان یک منبع رایج سلول‌های بنیادی مزانشیمی است که قادرند به انواع مختلف سلول‌های مغزی تمایز یابند. این سلول‌ها در محیط کشت به سلول-های عصبی نیز تمایز می‌یابند (Deng et al., 2001, Sanchez-Ramos et al., 2000, Woodbury et al., 2000). با این وجود، استفاده کلینیکی از این سلول‌ها و سلول‌های بنیادی خون‌ساز با مشکلاتی نظیر درد، مرگ و میر و تعداد کم سلول‌ها در طی استخراج سلول مواجه است (Yamada et al., 2006). لازم به ذکر است که سلول‌های بنیادی مغز استخوان که فقط ۰/۰۰۱ تا ۰/۰۱ سلول‌های مغز استخوان را شامل می‌گردند (Campagnoli et al., 2001)، قدرت خودنوسازی و تکثیر محدودی دارند و فراهم نمودن آن‌ها برای پیوند اتولوگ، پرزحمت و وقت‌گیر می‌باشد (Gulbins et al., 2002).

بافت چربی یک منبع سرشار و عملی از بافت دهنده را برای جایگزین کردن سلول‌های اتولوگ فراهم می‌آورد. بافت چربی مانند مغز استخوان از مزودرم رویانی مشتق می‌گردد و حاوی یک جمعیت سلولی استرومایی هتروژن است. در واقع، محققین از بافت چربی سلول‌هایی را جدا کرده‌اند که تقریبا همان پتانسیل تمایزی سلول‌های بنیادی مغز استخوان را داشته و در صورت تیمار با فاکتورهای مناسب، می‌توانند به رده‌های استئوژنیک، آدیپوژنیک، میوژنیک و کندروژنیک تمایز یابند (Park, Eglitis and Mouradian, 2001, Pereira et al., 1995). تا به حال مطالعات متعددی نشان داده‌اند که سلول‌های

1- Degeneration

استرومایی بافت چربی موش صحرایی (Gulbins et al., 2002, Ning et al., 2006, Tholpady, Katz and Ogle, 2003, Yang et al., 2004)، موش (Fujimura et al., 2005, Safford et al., 2002)، میمون رزوس (Kang et al., 2004) و انسان (Ashjian et al., 2003, Fujimura et al., 2005, Kang et al., 2003, Safford et al., 2002, Zuk et al., 2002) می‌توانند به مورفولوژی‌های نورون مانند تمایز یابند و نشانگرهای نوروگلیال را بیان کنند. علاوه بر این، تحقیات اثبات کرده است که سلول‌های استرومایی بافت چربی NGF، BDNF و VEGF را بیان می‌کنند که از فاکتورهای نوروتروفیک محسوب می‌گردند (Chaturvedi et al., 2006, Kang et al., 2003, Kavanagh et al., 2006, Levivier et al., 1995, McCoy et al., 2008, Rehman et al., 2004). به همین دلیل بسیاری از محققین معتقدند که سلول‌های استرومایی بافت چربی ممکن است در درمان طیف وسیعی از بیماری‌های نورولوژیک مفید واقع شوند.

مزیت مهم سلول‌های استرومایی بافت چربی این است که این سلول‌ها به آسانی و توسط یک روش ساده با حداقل تهاجم از بیمار به دست می‌آیند و به سادگی کشت داده می‌شوند. سلول‌های استرومایی بافت چربی در محیط کشت خیلی سریع‌تر از سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان تکثیر می-شوند و سلول‌هایی که به مدت طولانی کشت داده شده‌اند، پس از پاساژهای متوالی ویژگی پرتوانی مزانشیمی خود را حفظ می‌نمایند (Nakagami et al., 2006). این سلول‌ها می‌توانند برای چندین ماه با یک زمان دو برابر شدن منظم و سطوح ضعیفی از پیر شدن در محیط کشت حفظ شوند (Rehman et al., 2004). به علاوه، پیوند اتولوگ سلول‌های استرومایی بافت چربی فاقد مشکلات اخلاقی و ایمونولوژیک مطرح شده در مورد استفاده از بافت‌ها و سلول‌های بنیادی جنینی است. این خصوصیات نشان می‌دهد که سلول‌های استرومایی بافت چربی می‌توانند کاندید خوبی به عنوان یک منبع جدید سلولی برای تحقیقات پایه و نیز سلول درمانی در بیماری‌های سیستم عصبی باشند.

چکیده فارسی

چکیده فارسی

هدف از مطالعه اخیر، ارزیابی تمایز عصبی از سلول‌های بنیادی بافت چربی، پس از هم کشتی با سلول‌های بنیادی جنینی بود. به این منظور، سلول‌های بنیادی از بافت چربی ناحیه اینگوینال موش استخراج گردید و در مرحله پاساژ سوم، توسط محیط DMEM حاوی KoSR تمایز داده شد. در بخش اول این مطالعه، تمایز عصبی سلول‌های بنیادی بافت چربی توسط رتینوئیک اسید القا گردید و بیان نشانگرهای عصبی توسط RT-RCR، Real-time PCR و ایمونوسیتوشیمی بررسی شد. در بخش دوم مطالعه، سلول‌های بنیادی بافت چربی به مدت ۲ روز تحت هم کشتی با سلول‌های بنیادی جنینی قرار گرفتند و پس از آن تمایز داده شدند. پس از ۱۴ روز، تمایز عصبی این سلول‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. در این قسمت از پروژه، اثر هم کشتی بر فنوتیپ مولکولی و تکثیر سلول‌های بنیادی بافت چربی نیز بررسی شد. در انتها نیز، اثر استفاده همزمان از KoSR و یک درصد FBS در طی هفته دوم تمایز، بر تمایز عصبی سلول‌های بنیادی بافت چربی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که سلول‌های تمایزیافته در همه گروه‌ها نشانگرهای سلول‌های عصبی PAX6، Nestin، NSE، NeuN، NEFL، TH، Synaptophysin و GAD-2 را در سطح mRNA و beta tubulin III ، MAP-2 و NEFL را در سطح پروتئین بیان کردند. نتایج حاصل از Real-time PCR مبین افزایش بیان ژن‌های عصبی در گروه‌های تیمار شده با رتینوئیک اسید، به خصوص با غلظت $۱۰^{-۸}$ مولار بود. بیان ژن‌های عصبی در گروه‌های هم کشتی داده شده نیز نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. به علاوه، هم کشتی باعث افزایش بیان ژن PCNA و ژن‌های پرتوانی در سلول‌های بنیادی بافت چربی گردید. افزودن یک درصد FBS به محیط کشت سلول ها در طی هفته دوم تمایز نیز بهبود تمایز عصبی را به دنبال داشت. با توجه به این یافته‌ها می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌های بنیادی بافت چربی قابلیت بسیار خوبی برای تمایز به رده عصبی دارند و تکوین نورون‌ها تحت تاثیر رتینوئیک اسید، هم کشتی و استفاده همزمان از KoSR و غلظت های خیلی پایین FBS تقویت می‌شود.

فهرست عناوین

فصل اول: مقدمه

۱-۱. سلول‌های بنیادی..... ۲
۱-۱-۱. شناسایی سلول‌های بنیادی..... ۳
۱-۱-۲. انواع سلول‌های بنیادی..... ۳
۱-۱-۲-۱. سلول‌های بنیادی جنینی..... ۳
۱-۱-۲-۲. سلول‌های بنیادی بالغ..... ۴
۱-۲. سلول‌های بنیادی بافت چربی..... ۵
۱-۲-۱. جداسازی سلول‌های بنیادی بافت چربی..... ۶
۱-۲-۲. شناسایی سلول‌های بنیادی بافت چربی..... ۷
۱-۲-۳. اسامی مختلف سلول‌های بنیادی بافت چربی..... ۹
۱-۲-۴. تکثیر و کشت سلول‌های بنیادی بافت چربی..... ۱۰
۱-۲-۵. نحوه عملکرد سلول‌های بنیادی بافت چربی پس از پیوند به بافت آسیب دیده..... ۱۰
۱-۲-۶. ترشح پاراکرین سلول‌های بنیادی بافت چربی..... ۱۱
۱-۲-۷. ظرفیت تمایزی سلول‌های بنیادی بافت چربی..... ۱۳
۱-۳. سیستم عصبی..... ۱۳
۱-۳-۱. نورون‌ها..... ۱۴
۱-۳-۱-۱. انواع نورون‌ها بر اساس مسیر انتقال پیام..... ۱۴
۱-۳-۱-۲. انواع نورون‌ها بر اساس نوروترانسمیتر ترشحی..... ۱۴
۱-۳-۲. سلول‌های گلیال..... ۱۵
۱-۳-۳. تکامل سیستم عصبی..... ۱۶
۱-۳-۴. ژن‌های اختصاصی سیستم عصبی..... ۱۷
۱-۴. رتینوئیک اسید..... ۱۹
۱-۴-۱. نقش رتینوئیک اسید در تکامل جنین..... ۲۰
۱-۴-۲. اسامی مختلف رتینوئیک اسید..... ۲۰
۱-۴-۳. پروتئین‌های دخیل در متابولیسم رتینوئیک اسید..... ۲۰
۱-۴-۴. نقش رتینوئیک اسید در تکوین سیستم عصبی..... ۲۲
۱-۴-۵. مکانیسم تاثیر رتینوئیک اسید بر سیستم عصبی..... ۲۳

۱-۵. نقش هم کشتی در تمایز سلول‌های بنیادی.....۲۴

فصل دوم: مروری بر منابع

۲-۱. استفاده از سلول‌های بنیادی بافت چربی در تمایز عصبی.....۲۷
۲-۲. نقش رتینوئیک اسید در تمایز عصبی.....۲۹
۲-۳. نقش هم کشتی در تمایز.....۲۹
۲-۴. پیشینه طرح حاضر.....۳۱

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱. طرح کلی پروژه.....۳۳
۳-۲. استخراج و کشت غیر تمایزی سلول‌های بنیادی بافت چربی.....۳۳
۳-۲-۱. طرز تهیه کلاژناز ۰/۲ درصد.....۳۵
۳-۳. پاساژ سلول‌های بنیادی بافت چربی.....۳۵
۳-۳-۱. طرز تهیه PBS فاقد کلسیم و منیزیوم.....۳۵

بخش اول: بررسی تاثیر رتینوئیک اسید بر تمایز سلول‌های بنیادی بافت چربی.....۳۵
۳-۴. کشت تمایزی سلول‌های بنیادی بافت چربی.....۳۵
۳-۵. بررسی تاثیر رتینوئیک اسید بر تمایز بر تمایز عصبی.....۳۶
۳-۵-۱. نحوه آماده سازی رتینوئیک اسید.....۳۶

بخش دوم. بررسی تمایز سلول‌های بنیادی بافت چربی به عصب تحت تاثیر هم کشتی با سلول‌های بنیادی بافت چربی ۳۶
۳-۶. کشت سلول‌های بنیادی جنینی.....۳۶
۳-۷. نحوه تهیه لایه تغذیه کننده فیبروبلاست جنینی موش و تیمار آن با مایتومایسین C.....۳۷
۳-۷-۱. طرز تهیه بافر مایتومایسین C.....۳۸
۳-۸. محیط کشت مورد استفاده جهت کشت غیر تمایزی سلول‌های بنیادی جنینی.....۳۸
۳-۸-۱. طرز تهیه بتا- مرکاپتواتانول ۱۰۰۰X ۳۹
۳-۸-۲. طرز تهیه L- گلوتامین ۱۰۰X.....۳۹
۳-۹. نحوه جداسازی سلول‌های بنیادی جنینی از سلول‌های تغذیه کننده ۳۹

۳-۱۰. هم کشتی سلول‌های بنیادی بافت چربی و سلول‌های بنیادی جنینی.....۳۹

بخش سوم: بررسی فنوتیپ مولکولی و تکثیر سلول‌های بنیادی بافت چربی پس از هم کشتی با سلول-های بنیادی جنینی.....۴۱
۳-۱۱. بررسی فنوتیپ مولکولی و تکثیر سلول‌های بنیادی بافت چربی پس از هم کشتی با سلول‌های بنیادی جنینی.....۴۱

بخش چهارم: بررسی اثر هم‌زمان KoSR و FBS بر تمایز عصبی از سلول‌های بنیادی بافت چربی..۴۱
۳-۱۲. کشت سلول‌های بنیادی بافت چربی جهت بررسی اثر هم‌زمان KoSR و FBS.....۴۱
۳-۱۳. بررسی ایمونوسیتوشیمی سلول‌های عصبی مشتق از سلول‌های بنیادی بافت چربی.....۴۱
۳-۱۲-۱. نحوه رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی.....۴۲
۳-۱۲-۲. طرز تهیه PBS 1X برای ایمونوسیتوشیمی.....۴۳
۳-۱۴. بررسی بیان ژن‌های عصبی به روش RT- PCR.....۴۳
۳-۱۴-۱. استخراج RNA کل از سلول‌های بنیادی بافت چربی تمایز یافته ۴۴
۳-۱۴-۲. بررسی RNA کل.....۴۴
۳-۱۴-۳. ساخت cDNA از RNA استخراج شده.....۴۵
۳-۱۴-۴. تهیه پرایمرها.....۴۶
۳-۱۴-۵. واکنش PCR.....۴۷
۳-۱۴-۶. الکتروفورز محصولات PCR.....۴۹
۳-۱۵. بررسی بیان ژن‌های عصبی به روش Real- time PCR ۴۹

فصل چهارم: نتایج

۴-۱. جداسازی سلول‌های استرومایی بافت چربی.....۵۲
۴-۲. بررسی اثر رتینوئیک اسید بر تمایز عصبی از سلول‌های بنیادی بافت چربی.....۵۳
۴-۲-۱. تمایز سلول‌های استرومایی بافت چربی به نورون.....۵۳
۴-۲-۲. بررسی بیان ژن‌های عصبی در سلول‌های تمایزیافته.....۵۵
۴-۲-۳. بررسی کمی بیان ژن‌های عصبی به طریق Real-time PCR.....۵۶
۴-۲-۴. بررسی بیان پروتئین‌های عصبی در سلول‌های تمایز یافته، به روش ایمونوسیتوشیمی.....۵۸
۴-۳. بررسی نقش هم کشتی در تمایز عصبی.....۵۹

۴-۳-۱. هم کشتی سلول‌های بنیادی بافت چربی با سلول‌های بنیادی جنینی.....۵۹
۴-۳-۲. تمایز سلول‌های بنیادی بافت چربی به نورون پس از هم کشتی با سلول‌های بنیادی جنینی.....۶۰
۴-۳-۳. بررسی بیان ژن‌های عصبی در سلول‌های بنیادی بافت چربی تمایزیافته پس از هم کشتی با سلول‌های بنیادی جنینی.....۶۳
۴-۳-۴. بررسی کمی بیان ژن‌های عصبی، به روش Real-time PCR ۶۵
۴-۳-۵. بررسی بیان پروتئین‌های عصبی در سلول‌های تمایزیافته، با روش ایمونوسیتوشیمی.....۶۹
۴-۴. بررسی فنوتیپ مولکولی و تکثیر در سلول‌های بنیادی بافت چربی پس از هم کشتی با سلول‌های بنیادی جنینی ۷۲
۴-۴-۱. بررسی بیان ژن PCNA و ژن‌های مزانشیمی و پرتوانی در سلول‌های بنیادی بافت چربی پس از هم کشتی با سلول‌های بنیادی جنینی.....۷۳
۴-۴-۲. بررسی کمی بیان ژن‌های مزانشیمی و پرتوانی و ژن PCNA، به روش Real-time PCR..۷۴
۴-۵. بررسی تاثیر استفاده هم‌زمان از ۱۵ درصد KoSR و ۱ درصد FBS بر تمایز عصبی از سلول‌های بنیادی بافت چربی ۷۴
۴-۵-۱. بررسی بیان ژن‌های عصبی به روش RT-PCR ۷۴
۴-۵-۲. بررسی کمی بیان ژن‌های عصبی به روش Real-time PCR ۷۶

فصل پنجم: بحث و نتیجه‌گیری

۵-۱. هدف از تحقیق حاضر ۸۵
۵-۲. استفاده از سلول‌های بنیادی بافت چربی برای تمایز عصبی ۸۶
۵-۳. علت استفاده از محیط تمایزی حاوی KoSR جهت القای تمایز عصبی ۸۷
۵-۴. تاثیر رتینوئیک اسید بر تمایز عصبی از سلول‌های بنیادی بافت چربی ۸۹
۵-۵. هم کشتی سلول‌های بنیادی بافت چربی با سلول‌های بنیادی جنینی ۹۰
۵-۵-۱. بررسی تمایز عصبی از سلول‌های بنیادی بافت چربی پس از هم کشتی با سلول‌های بنیادی جنینی ۹۰
۵-۶. بررسی اثر هم‌زمان KoSR و FBS بر تمایز عصبی از سلول‌های بنیادی بافت چربی.....۹۳
۵-۷. نتیجه گیری ۹۴

فصل ششم: پیشنهادات

پیشنهادات ۹۶

فصل هفتم: منابع و ماخذ ۹۷

چکیده لاتین ۱۰۴

فهرست جداول

جدول۱-۱. فهرست آنتی ژن‌های سطحی سلول‌های بنیادی بافت چربی.....۸
جدول۱-۲. نشانگرهای سلول‌های بنیادی بافت چربی و مغز استخوان موش و انسان در مقایسه با نشانگرهای سلول‌های فیبروبلاست و سلول‌های کسر استرومایی – عروقی.....۹
جدول ۱-۳. سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد ترشح شده توسط سلول‌های بنیادی بافت چربی.....۱۲
جدول ۱-۴. رده‌های سلولی تمایز یافته از سلول‌های بنیادی بافت چربی و فاکتورهای مناسب جهت القای این تمایزها.....۱۳
جدول۳-۱: عناوین آنتی بادی‌های اولیه و ثانویه، مشخصات و رقت مصرفی آن‌ها.....۴۳
جدول ۳-۲. توالی و مشخصات پرایمرهای به کار رفته در این مطالعه.....۴۷

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱. پروتئین‌های دخیل در متابولیسم رتینوئیک اسید..... ۲۲
شکل۱-۲. مکانیسم اثر رتینوئیک اسید بر تکوین سیستم عصبی..... ۲۵
شکل ۳-۱. مراحل استخراج سلول‌های بنیادی از بافت چربی اینگوینال موش..... ۳۴
شکل۳-۲. اینسرت‌های مورد استفاده در روش هم کشتی..... ۴۰
شکل۴-۱. اتصال سلول‌های استرومایی بافت چربی به کف ظرف کشت، ۶ ساعت پس از استخراج..... ۵۲
شکل ۴-۲. سلول‌های استرومایی بافت چربی در مرحله پاساژ سوم..... ۵۳
شکل۴-۳. تغییر مورفولوژی سلول‌های بنیادی بافت چربی، ۲۴ پس از آغاز تمایز ۵۴
شکل ۴-۴. سلول‌های بنیادی بافت چربی تمایزیافته در محیط حاوی غلظت نهایی 10^{-6}، 10^{-7} یا 10^{-8} مولار رتینوئیک اسید (RA)، ۳ روز پس از آغاز تمایز..... ۵۴
شکل ۴-۵. سلول‌های بنیادی بافت چربی تمایزیافته در محیط حاوی غلظت نهایی 10^{-6}، 10^{-7} یا 10^{-8} مولار رتینوئیک اسید (RA)، ۱۰ روز پس از آغاز تمایز..... ۵۵
شکل۴-۶. بیان ژن‌های عصبی در گروه‌های کنترل (KoSR) و تیمار شده با غلظت 10^{-6}،10^{-7} یا 10^{-8} مولار رتینوئیک اسید (RA)، ۲ هفته پس از آغاز تمایز..... ۵۶
شکل ۴-۷. بیان پروتئین β-tubulin III در سیتوپلاسم و زوائد سلولی نورون های مشتق از سلول‌های بنیادی بافت چربی..... ۵۸
شکل ۴-۸. بیان پروتئین‌های NEFL و Map-2 در سیتوپلاسم و زوائد نورون های مشتق از سلول-های بنیادی بافت چربی..... ۵۹
شکل ۴-۹. تشکیل کلونی سلول‌های بنیادی جنینی موش روی لایه تغذیه کننده MEF..... ۶۰
شکل ۴-۱۰. تشکیل کلونی‌های سلول‌های بنیادی جنینی موش روی اینسرت..... ۶۰
شکل۴-۱۱. مورفولوژی سلول‌های بنیادی بافت چربی، قبل از تمایز (سمت راست) و ۲۴ پس از آغاز تمایز (سمت چپ)..... ۶۱
شکل ۴-۱۲. سلول‌های بنیادی بافت چربی تمایزیافته در محیط‌های حاوی 10^{-7} و10^{-8} مولار رتینوئیک اسید (RA) و کنترل (KoSR) (ردیف بالا) و نمونه‌های هم کشتی داده شده این گروه‌ها (ردیف پایین)، ۳ روز پس از آغاز تمایز..... ۶۲

شکل ۵-۱۳. سلول‌های بنیادی بافت چربی تمایزیافته در محیط حاوی 10^{-7} و 10^{-8} مولار رتینوئیک اسید (RA) و کنترل (KoSR) (ردیف بالا) و نمونه‌های هم کشتی داده شده این گروه‌ها (ردیف پایین)، ۱۰ روز پس از آغاز تمایز..... ۶۳
شکل۴-۱۴. بیان ژن‌های عصبی در گروه‌های کنترل (KoSR) و تیمار شده با غلظت‌های 10^{-7} و 10^{-8} مولار رتینوئیک اسید و نمونه‌های هم کشتی داده شده این گروه‌ها..... ۶۴
شکل۴-۱۵. بیان ژن‌های عصبی در سلول‌های مغزی موش (Brain) و سلول‌های بنیادی بافت چربی در مرحله پاساژ صفر ($ADSC\ P_0$) و سه ($ADSC\ P_3$) ۶۵
شکل ۴-۱۷. بیان پروتئین β-tubulin III در سیتوپلاسم و زوائد سلولی نورون های مشتق از سلول های بنیادی بافت چربی در گروه $KoSR+RA10^{-8}$ M هم کشتی داده شده (ردیف بالا) و رنگ‌آمیزی هسته این سلول‌ها توسط PI (ردیف پایین)، ۲ هفته پس از آغاز تمایز..... ۷۰
شکل ۴-۱۸. بیان پروتئین‌های NEFL و Map-2 در سیتوپلاسم و زوائد سلولی نورون های مشتق از سلول های بنیادی بافت چربی در گروه KoSR هم کشتی داده شده (ردیف بالا) و گروه $KoSR+RA10^{-8}$ M هم کشتی داده شده (ردیف پایین)، ۲ هفته پس از آغاز تمایز..... ۷۱
شکل ۴-۱۹. تفاوت رنگ ایجاد شده در محیط سلول‌های بنیادی بافت چربی هم کشتی داده شده با سلول‌های بنیادی جنینی (۴ عدد چاهک سمت چپ) نسبت به گروه کنترل (۲ عدد چاهک سمت راست)..... ۷۲
شکل ۵-۲۰. بیان ژن PCNA و ژن‌های مزانشیمی و پرتوانی در سلول‌های بنیادی بافت چربی در گروه هم کشتی داده شده (Co- ADSC) و کنترل (ADSC) ۷۳
شکل ۴-۲۱. بیان ژن‌های عصبی در سلول‌های بنیادی بافت چربی تمایز یافته در حضور یا عدم حضور ۱درصد FBS ۷۵
۴-۲۲. Melt Curve مربوط به ژن بتاتوبولین ۷۷
۴-۲۳. Melt Curve مربوط به ژن eEF2 ..... ۷۸
۴-۲۴. Melt Curve مربوط به ژن Nestin ۷۸
۴-۲۵. Melt Curve مربوط به ژن NSE ۷۹
۴-۲۶. Melt Curve مربوط به ژن NeuN ۷۹
۴-۲۷. Melt Curve مربوط به ژن NEFL ۸۰
۴-۲۸. Melt Curve مربوط به ژن TH ۸۰
۴-۲۹. Melt Curve مربوط به ژن PCNA ۸۱
۴-۳۰. Melt Curve مربوط به ژن Oct4 ..... ۸۱

۴-۳۱. Melt Curve مربوط به ژن CD105 ..... ۸۲
۴-۳۲. Melt Curve مربوط به ژن CD73 ..... ۸۲
۴-۳۳. Melt Curve مربوط به ژن Sox2 ..... ۸۲

فهرست نمودارها

نمودار ۴-۱. مقایسه بیان ژن عصبی NeuN در گروه‌های کنترل و تیمار شده با رتینوئیک اسید.....۵۷

نمودار ۵-۲. مقایسه بیان ژن عصبی NSE در گروه‌های کنترل و تیمار شده با رتینوئیک‌اسید.....۵۷

نمودار ۴-۳. مقایسه بیان ژن‌های عصبی بین گروه کنترل تمایزیافته در محیط حاوی KoSR و نمونه هم کشتی داده شده این گروه (Co-Cultured KoSR).....۶۶

نمودار۴-۴. مقایسه بیان ژن‌های عصبی بین گروه کنترل تمایزیافته در محیط حاوی $KoSR+RA10^{-8}$ M و نمونه هم کشتی داده شده این گروه ۶۷

نمودار ۴-۵. مقایسه بیان ژن‌های عصبی بین گروه KoSR هم‌کشتی‌داده شده و $KoSR+RA10^{-8}$ M هم کشتی داده شده ۶۸

نمودار ۴-۶. مقایسه بیان ژن‌های عصبی بین گروه $KOSR+RA10^{-7}$ M و نمونه هم کشتی داده شده آن ۶۹

نمودار ۴-۷. مقایسه بیان ژن‌های PCNA، Sox2 ، Oct4، CD73 و CD105 بین سلول‌های بنیادی بافت چربی هم کشتی داده شده (Co-cultured ADSC) و کنترل (ADSC) ۷۴

نمودار ۴-۸. مقایسه بیان ژن‌های عصبی در سلول‌های بنیادی بافت چربی تمایز یافته، در حضور یا عدم حضور ۱ درصد FBS. ۷۶

نمودار ۴-۹. مقایسه بیان ژن‌های عصبی در سلول‌های بنیادی بافت چربی تمایز یافته، در حضور یا عدم حضور ۱ درصد FBS. ۷۷

فصل اول

مقدمه

مقدمه

۱-۱. سلول‌های بنیادی[1]

سلول‌های بنیادی گروهی از سلول‌های تمایز نیافته‌اند که در جانداران پرسلولی[2] یافت می‌شوند. این سلول‌ها دارای ظرفیت قابل توجهی برای تمایز به انواع مختلف سلول‌ها هستند. به علاوه، گروهی از این سلول‌ها که سلول‌های بنیادی بالغ نام دارند، در بسیاری از بافت‌ها یه عنوان سیستم بازچرخ و ترمیمی عمل می‌کنند (Hwang, Zhang and Hwang). سلول‌های بنیادی دارای دو ویژگی اساسی می‌باشند:

۱- خودنوسازی[3]: توانایی انجام تقسیم‌های متوالی با حفظ حالت تمایز نیافته (Tapp et al., 2009).

۲- ظرفیت تمایزی: توانایی تمایز به انواع سلول‌های تخصص یافته (Tapp et al., 2009).

هنگامی که یک سلول بنیادی تقسیم می‌شود، هر سلول جدید می‌تواند به صورت یک سلول بنیادی باقی بماند و یا به یک سلول تخصص یافته تبدیل شود، زیرا سلول‌های بنیادی دارای دو نوع تقسیم هستند: تقسیم متقارن که باعث بوجود آمدن دو سلول دختری یکسان می‌شود که دارای ویژگی‌های سلول بنیادی هستند و تقسیم نامتقارن که در طی آن، یک سلول بنیادی و یک سلول پیش ساز[4] ایجاد می‌شود (Beckmann et al., 2007). سلول‌های بنیادی از لحاظ توان تمایزی به گروه‌های زیر تقسیم می‌شوند:

۱- تمام توان[5]: این سلول‌ها توانایی تمایز به تمام سلول‌های بدن موجود زنده و پرده‌های جنینی را دارند، مانند سلول‌های زیگوت و بلاستومرهای اولیه‌ای که از تقسیم زیگوت حاصل می‌شوند (Mitalipov and Wolf, 2009).

۲- پرتوان[6]: این سلول‌ها توانایی تمایز به غالب سلول‌های بدن موجود زنده را دارند ولی قادر به ایجاد سلول‌های برون جنینی مانند جفت نیستند. سلول‌های بنیادی جنینی نمونه‌ای از سلول‌های بنیادی پرتوانند (Ulloa-Montoya, Verfaillie and Hu, 2005).

1- Stem Cells
2- Multi Cellular
3- Self renewal
4- Progenitor
5- Toti Patent
6- Pluripotent