بسم الله الرحمن الرحيم

## تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

خانم زهره مظاهری رشته علوم تشریح رساله دکتری خود را با عنوان: « توانایی تمایز سلولهای $Stra\ 8^{+}$ مشتق شده از سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش به سلولهای زایا در حضور هم کشتی و افزودن $BMP_4$ » در تاریخ ۱۳۹۰/۱۲/۱ ارائه کردند.

اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

| اعضای هیات داوران | نام و نام خانوادگی | امضاء |
|---|---|---|
| استاد راهنمای اصلی | دکتر منصوره موحدین | |
| استاد راهنمای دوم | دکتر فاطمه رهبری زاده | |
| استاد مشاور | دکترسعید امانپور | |
| استاد ناظر | دکتر مجتبی رضازاده | |
| استاد ناظر | دکتر تقی طریحی | |
| استاد ناظر | دکتر فرید ابوالحسنی | |
| استاد ناظر | دکتر مسعود هوشمند | |
| نماینده تحصیلات تکمیلی | دکتر مژده صالح نیا | |

## 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 **زهره مظاهری** دانشجوی رشته **علوم تشریحی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۶** 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 ۱۳۹۰/۱۲/۱

## 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 در رشته **علوم تشریحی** است که در سال **۱۳۹۰** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **خانم دکتر منصوره موحدین و دکتر فاطمه رهبری زاده** ، مشاوره **آقای دکتر سعید امانپور** 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 **زهره مظاهری** دانشجوی رشته **علوم تشریحی** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضا

۱۳۹۰/۱۲/۱

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

**رساله**

**دوره دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته علوم تشریحی**

**عنوان**

# توانائی تمایز سلول های $Stra\text{-}8^{+}$ مشتق شده از سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش به سلول های زایا در حضور هم کشتی و افزودن BMP-4

**نگارش**
زهره مظاهری

**اساتید راهنما**
دکتر منصوره موحدین
دکتر فاطمه رهبری زاده

**استاد مشاور**
دکتر سعید امانپور

**زمستان ۱۳۹۰**

تقدیم به :

## پدر و مادر عزیزم

که لحظات ناب بودن، لذت و غرور دانستن، جسارت خواستن، عظمت رسیدن و تمام تجربه های یکتا و زیبای زندگیم، مدیون حضور سبز آنهاست.

## خواهران و برادران بزرگوارم

که وجودشان در همه لحظات زندگیم، شادی بخش و صفایشان مایه آرامشم بوده است.

و به آنهایی که آفتاب مهرشان در آستانه قلبم، همچنان پابرجاست و هرگز غروب نخواهد کرد

# تشکر و قدردانی


پروردگارا

داده ات نعمت است و نداده ات حکمت و گرفته ات امتحان...

و من تو را شاکرم همیشه و همه حال به داده و نداده ات و امتحانت...

آنقدرم ده که محتاج نباشم و امتحانی گیر که شرمنده نباشم.

به مصداق «من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق » بسی شایسته است از استاد راهنمای فرهیخته و فرزانه سرکار **خانم دکتر موحدین** که گلشن سرای علم و دانش را با راهنمایی های کار ساز و سازنده بارور ساختند; تقدیر و تشکر نمایم.

از استاد راهنمای عزیزم سرکار **خانم دکتر رهبری زاده** که با دقت نظر در رفع مشکلات و هموار نمودن راه تحقیق مرا یاری نمودند قدردانی می نمایم.

از استاد مشاورارجمندم جناب **آقای دکتر امانپور** که همواره مرا مورد عنایت و لطف شان قرار می دادند سپاسگزارم.

مراتب سپاس بی پایان خود را به کلیه اساتید محترم گروه علوم تشریحی دانشگاه تربیت مدرس سرکار خانم **دکتر صالح نیا**، جناب آقای **دکتر رضازاده** و جناب آقای **دکتر تقی طریحی** که در طول دوران تحصیل خوشه چین علم و معرفت شان بوده ام، ابراز می دارم.

از دوستان، دانشجویان و کارشناسان محترم گروه علوم تشریحی جناب آقای بیرانوند، آقای عربگری و سرکار خانم ابراهیمی که از تجربیات شان بهره مند شدم، صمیمانه سپاس گزارم.

از تمامی دوستانم که در بیمارستان امام خمینی (ره) افتخار آشنایی با آنها را داشتم سرکار خانم حقیقی، خانم دکتر زندیه، خانم حدادی و جناب آقای دکتر احد محمد نژاد و دکتر صمد محمد نژاد سپاسگزارم.

بر خود لازم می دانم از لطف بی دریغ جناب آقای لنگرودی، به خاطر تمامی زحماتشان در مراحل نگارش پایان نامه قدردانی نمایم.

و در پایان از همکلاسی های محترمم جناب آقای دکتر عبدانی پور و آقای دکتر مسلم کمال تشکر را دارم.

# چکیده

پتانسیل استفاده از سلول های بنیادی جهت تمایز به سلول های زایا در آزمایشگاه تا به امروز همچنان بحث انگیز مانده است. در مطالعه حاضر، ما یک روش گام به گام متشکل از افزودن فاکتورهای رشد به صورت متوالی جهت تمایز و غنی سازی سلول های زایا ارائه کردیم که این روش با خالص سازی سلول های تمایز یافته و با استفاده از هم کشتی سلول ها مشابه وقایع داخل بدن جهت رسیدن به کارامدترین سلول های بنیادی شبه اسپرماتوگونیا همراه بوده است. به این ترتیب سلول های استرومائی مغز استخوان موشی توسط BMP (Bone morphogenic protein)-4 و ترکیب القا کننده Retinoic acid (RA)+ Leukemia inhibitory factor (LIF)+ Basic fibroblast growth factor (bFgF) به ترتیب به سلول های زایای بدوی و سلول های بنیادی اسپرماتوگونیا تمایز داده شدند. سیستم هم کشتی با سلول های STO به عنوان یک رده از سلول های فیبروبلاست موشی و سرتولی به ترتیب جهت غنی سازی سلول های تمایز یافته PGC-like cells و SSC-like cells به کار برده شد. با استفاده از سازه Stra8-CD4HAglo سلول های زایای بدوی تمایز یافته خالص سازی شدند. بیان ژن های پرتوانی(*Pou5F1, Nanog, c-Myc*) و ژن های اختصاصی سلول های زایا (*Mvh, Piwil2, Stra-8*) در هر مرحله بررسی شدند. مطالعه پروتئین های Pou5F1، Mvh و Stra-8 نیز در کلیه مراحل تمایز و غنی سازی انجام گرفت. به منظور بررسی کارائی و تومورزا بودن سلول های تمایز یافته، سلول ها در سه گروه مغز استخوان پاساژ ۴، جمعیت سلول های تمایز یافته هتروژن وهموژن به ترتیب به موش مدل آزواسپرمی و با نقص سیستم ایمنی پیوند زده شد. نتایج qPCR در مورد بیان ژن های پرتوانی افزایش معنی داری ($P\leq0.05$) را در ابتدای فرایند تمایز سلول ها نشان داد. بیان ژن *Nanog* و *Piwil2* در طی مراحل غنی سازی افزایش نشان داد. بیان ژن های Stra-8 و Mvh پس از افزودن فاکتور رشد اسید رتینوئیک و BMP-4 به ترتیب افزایش معنی داری ($P\leq0.05$) را نشان داد. همچنین بیان ژن *c-Myc* به عنوان یک ژن انکوژنیک کاهش معنی داری ($P\leq0.05$) را در انتهای مراحل آزمایش نسبت به مرحله شروع تمایز سلولی نشان داد. سول های در دو گروه هموژن وهتروژن پس از پیوند به بیضه موش مدل آزواسپرمی توانستند در فرایند اسپرماتوژنز شرکت کنند ولی سلول های BMSCs پاساژ چهار نتوانستند در قاعده لوله های منی زا قرار بگیرند. به علاوه سلول های BMSC باوجود ایجاد تومور ظاهری، قادر به ایجاد تراتوما نبودند. علاوه بر BMSC ها، جمعیت هتروژن در محل پیوند زیرجلدی سلول ها به موش بدون تیموس، سلول های با پیش آگهی بدخیم مشاهده گردید ولی در گروه هموژن این سلول ها مشاهده نشد. نتایج ما بیان می کند که تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول های شبه زایا با استفاده از BMP-4 و اسید رتینوئیک و پس از هم کشتی مطابق با وقایع داخل بدن در داخل آزمایشگاه امکان پذیر می باشد. از طرفی خالص سازی سلول های شبه زایای بدوی تمایز یافته، می تواند در پیشگیری از بروز تومور ناشی از حضور سلول های بنیادی نامتمایز جهت استفاده در سلول درمانی موثر واقع گردد.

**واژگان کلیدی:** سلول های استرومائی مزانشیمی، سلول های زایای بدوی، سلول های بنیادی اسپرماتوگونیا، تراتوما

# فهرست مطالب

**فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته** ۱
۱-۱. پیشگفتار ۲
۱-۲. مقدمه ۳
۱-۳. تشکیل و تمایز سلول های زایا در محیط بدن پستانداران ۴
۱-۵-۱. سلول های بنیادی با منشاء جنینی ۱۴
۱-۵-۲. سلول های بنیادی بالغین ۱۵
۱-۵-۲-۱. ویژگی سلول های بنیادی بالغین ۱۶
۱-۵-۲-۲. سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان ۱۸
۱-۵-۲-۲-۱. مارکرهای اختصاصی سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان ۱۹
۱-۶. ضرورت انجام این تحقیق ۲۶
۱-۷. سوالات اصلی این تحقیق ۲۶
۱-۸. اهداف اصلی این پژوهش ۲۷
۱-۹. فرضیات پژوهش ۲۷
**فصل دوم: مواد و روشها** ۲۸
۲-۱. جداسازی و کشت و تمایز سلول های بنیادی در محیط آزمایشگاه ۲۹
۲-۱-۱. جداسازی سلول های مزانشیمی مغز استخوان ۳۰
۲-۱-۲. کشت سلول های مزانشیمی مغز استخوان ۳۰
۲-۱-۲. پاساژ سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان ۳۱
۲-۲. تائید ماهیت مزانشیمی سلول ها ۳۱
۲-۲-۱. تائید ماهیت مزانشیمی سلول های کشت داده شده با استفاده از مارکرهای سطح سلولی ۳۱
۲-۲-۲. تائید ماهیت مزانشیمی سلول های کشت داده شده با تمایز سلول ها به رده استئوژنز و ادیپوژنز ۳۲
۲-۲-۲-۱. تمایز سلول ها به رده استئوژنز ۳۲
۲-۲-۲-۱-۱. رنگ آمیزی آلیزارین رد (Alizarin red-S) ۳۳
۲-۲-۲-۲. تمایز سلول ها به رده ادیپوژنز ۳۳
۲-۲-۲-۲-۱. رنگ آمیزی اویل رد (Oil red-O) ۳۳
۲-۳. تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول های بدوی زایای جنینی ۳۳
۲-۳-۱. بررسی میزان تکثیر و درصد بقاء سلولی ۳۴
۲-۳-۲. تهیه استوک BMP-4 ۳۴
۲-۴. غنی سازی سلول های زایای بدوی تمایز یافته ۳۴
۲-۴-۱. آماده سازی لایه تغذیه کننده سلولی STO ۳۴
۲-۴-۲. تهیه استوک اسید رتینوئیک ۳۵

۲-۴-۳. کشت سلول های تمایز یافته در حضور فاکتور رشد اسید رتینوئیک ۳۵
۲-۵. خالص سازی سلول های زایای بدوی تمایز یافته و غنی شده ۳۶
۲-۵-۱. آماده سازی سازه نوترکیب ۳۶
۲-۵-۲- ۱ تهیه باکتری مستعد شده (Competent) به منظور استفاده در روش الکتروپوریشن ۳۹
۲-۵-۲-۲ ترانسفورماسیون باکتری با سازه نوترکیب Stra8-CD4HAglo ۴۰
۲-۵-۲-۳- کشت باکتری و تعیین کلونی باکتریائی مثبت ۴۲
۲-۵-۲-۴. تخلیص پلاسمید از کلونی های باکتری مثبت ۴۲
۲-۵-۲-۵- تائید وجود قطعه bp ۴۰۰ در پلاسمیدهای تخلیص شده ۴۲
۲-۵-۲-۶. تهیه استوک از باکتری های تائید هضم آنزیمی شده ۴۳
۲-۵-۳- تعیین کارائی وکتور با استفاده از بررسی بیان مارکر سطحی CD4 ۴۳
۲-۵-۴. تعیین کارائی روش ترانسفکشن (Lipofectamin reagent) با استفاده از وکتور GFP ۴۵
۲-۵-۵. تعیین کارائی استفاده از دستگاه MACS در جداسازی سلول های CD4 ۴۵
۲-۵-۶. ترانسفکشن سلول های زایای بدوی غنی شده ۴۷
۲-۵-۷. خالص سازی سلول های زایای بدوی تمایز یافته غنی شده با MACS ۴۸
۲-۶. تمایز سلول های زایای بدوی به سلول های بنیادی اسپرماتوگونیا ۴۹
۲-۶-۱. آماده سازی لایه پشتیبان از سلول های سرتولی ۴۹
۲-۷. غنی سازی سلول های بنیادی اسپرماتوگونیای Stra-8 مثبت ۵۰
۲-۸. روش های ارزیابی مولکولی در سطح بیان ژن و پروتئین طی مراحل مختلف تمایز و غنی سازی سلول های بنیادی تمایز یافته در In vitro ۵۰
۲-۸-۱. بررسی مولکولی در سطح بیان ژن ۵۰
۲-۸-۱-۱. بررسی غلظت و درجه خلوص RNA استخراج شده با استفاده روش اسپکتروفوتومتری ۵۱
۲-۸-۱-۲. سنتز cDNA از روی RNA استخراج شده ۵۱
۲-۸-۱-۳. بررسی کمی بیان ژن با استفاده از واکنش Real Time PCR ۵۲
۲-۸-۳-۱. طراحی پرایمر ۵۲
۲-۹. مطالعات ایمونوسیتوشیمی جهت بررسی بیان پروتئین Pou5F1, Mvh و Stra-8 در پایان هر مرحله از مطالعه ۵۵
۲-۱۰. بررسی In vivo ۵۶
۲-۱۰-۱. بررسی کارائی سلول های تمایز یافته پس از پیوند به بیضه موش مدل آزواسپرمی ۵۶
۲-۱۰-۱-۱. آماده سازی موش گیرنده ۵۶
۲-۱۰-۱-۲. نشاندار کردن سلول ها با رنگ حیاتی DiI در محیط In vitro و ردیابی آن ها پس از پیوند ۵۷
۲-۱۰-۱-۳. مرحله پیوند ۵۸
۲-۱۰-۱-۴. نمونه برداری ۵۸
۲-۱۰-۱-۵. آنالیز بیضه گیرنده بعد از پیوند ۵۸

۲-۱۰-۱-۶. مطالعه مورفومتریک برشهای رنگ شده ۶۰
۲-۱۰-۲. بررسی تومورزائی سلول های تمایز یافته ۶۱
۲-۱۱. تجزیه و تحلیل داده ها ۶۱
**فصل سوم: نتایج** ۶۳
۳-۱. جداسازی و کشت سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان ۶۴
۳-۲. پاساژ سلول های بنیادی مزانشیمی موشی ۶۴
۳-۳. تائید ماهیت مزانشیمی سلول ها ۶۵
۳-۳-۱. تائید ماهیت مزانشیمی سلول های کشت داده شده با استفاده از مارکر های سطح سلولی ۶۵
۳-۳-۲. تائید ماهیت مزانشیمی سلول های کشت داده شده با تمایز سلول ها به رده استئوژنز و ادیپوژنز ۶۶
۳-۳-۳. بررسی کمی پروفایل بیان ژن های پرتوانی و اختصاصی سلول های زایا در سلول های مزانشیمی مغز استخوان تازه و پاساژ چهارم ۶۸
۳-۴. تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول های بدوی زایای جنینی ۷۳
۳-۴-۱. تاثیر غلظتهای مختلف BMP-4 بر تزاید سلولی سلولهای BMSC ۷۳
۳-۴-۲. تاثیر غلظت های مختلف BMP-4 بر میزان حفظ بقای سلولی در سلول های BMSC ۷۴
۳-۴-۳. بررسی کمی میزان بیان ژن Mvh (VASA) در غلظت های مختلف BMP-4 در محیط کشت ۷۵
۳-۵. بررسی بیان ژنها پس از ۴ روز کشت درسلول های تیمار شده با ۲۵ نانوگرم بر میلی لیتر BMP-4 و گروه کنترل ۷۷
۳-۶. غنی سازی سلول های زایای بدوی تمایز یافته ۷۹
۳-۶-۱. آماده سازی لایه تغذیه کننده سلولی STO ۷۹
۳-۶-۲. بررسی بیان ژنها پس از ۷ روز کشت درگروههای تیمار شده با اسید رتینوئیک و گروههای کنترل در حضورو عدم حضور لایه تغذیه کنندهSTO ۷۹
۳-۷. خالص سازی سلول های زایای بدوی تمایز یافته و غنی شده ۸۲
۳-۷-۱. ترانسفورماسیون باکتری با سازه نوترکیب Stra8-CD4HAglo ۸۲
۳-۷-۱-۱. کشت باکتری و تعیین کلونی باکتریائی مثبت ۸۲
۳-۷-۱-۲. تائید صحت سازه نوترکیب با استفاده از روش هضم آنزیمی ۸۳
۳-۸. تعیین کارائی وکتور با استفاده از بررسی بیان مارکر سطحی CD4 ۸۴
۳-۸-۱. بررسی کارائی استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ در ترانسفکشن سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان با استفاده از وکتور GFP ۸۴
۳-۸-۲. تعیین کارائی وکتور با استفاده از بررسی بیان مارکر سطحی CD4 ۸۵
۳-۸-۲-۱. خالص سازی سلول های زایای بدوی تمایز یافته غنی شده با MACS ۸۷
۳-۹. بررسی بیان ژنها پس از ۲ روز کشت درگروههای تیمار شده با اسید رتینوئیک، LIF و bFGF و گروههای کنترل در حضورو عدم حضور لایه تغذیه کننده سرتولی ۸۹

۳-۱۰. غنی سازی سلول های بنیادی اسپرماتوگونیای Stra-8 مثبت پس از دو هفته هم کشتی در حضور لایه تغذیه کننده سرتولی و استفاده از فاکتور رشد اسید رتینوئیک ۹۲
۳-۱۱. بررسی نتایج واکنش های ایمونوسیتوشیمی ۹۷
۳-۱۱-۱. بررسی بیان پروتئین Pou5F1، Mvh و Stra-8 در سلولهای مغز استخوان ۴ ساعت و ۴ پاساژ بعد از کشت، بعد از تمایز به سلول های زایای بدوی، بعد از تمایز به سلول های بنیادی اسپرماتوگونیا، قبل و بعد از خالص سازی با MACS ۹۷
۳-۱۲. ارزیابی تومورزائی سلول های بنیادی شبه اسپرماتوگونیای تمایز یافته ۸ هفته پس از پیوند به موش با نقص سیستم ایمنی ۱۰۱
۳-۱۳. بررسی عملکرد سلول های بنیادی اسپرماتوگونیای Stra-8 مثبت تمایز یافته از سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، پس از پیوند به موش مدل آزواسپرمی ۱۰۳
۳-۱۳-۱. آماده سازی موش گیرنده ۱۰۳
۳-۱۳-۲. نشاندار کردن سلول های بنیادی اسپرماتوگونیای تمایز یافته Stra-8 مثبت ۱۰۴
۳-۱۳-۳. پیوند سلول های بنیادی نشاندار شده به موش مدل آزواسپرمی از طریق مجرای افرنت و رت تستیس ۱۰۵
۳-۱۳-۴. ارزیابی موفقیت پیوند سلول های بنیادی نشاندار شده به موش مدل آزواسپرمی پس از گذشت ۸ هفته ۱۰۶.
۳-۱۳-۵. بررسی و مقایسه وزن بیضه و تعداد اسپرم اپیدیدیم در گروه های پیوندی و کنترل پیوندی ۱۰۶
۳-۱۳-۶. بررسی بافت شناسی برشهای بیضه در گروه های پیوندی ۱۰۹
**فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها** ۱۱۱
۴-۱. بحث و نتیجه گیری ۱۱۲
۴-۲. جداسازی، کشت و بررسی میزان پرتوانی و امکان استفاده از سلول های مزانشیمی مغز استخوان به رده سلول های زایا ۱۱۴
۴-۳. بررسی قرابت و توانائی تمایز سلول های مزانشیمی مغز استخوان به رده سلول های زایا ۱۱۷
۴-۳-۱. بررسی قابلیت تومورزائی جمعیت هتروژن از سلول های مزانشیمی مغز استخوان ۱۱۹
۴-۴. بررسی تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول های شبه زایای بدوی ۱۲۲
۴-۵. بررسی غنی سازی سلول های شبه زایای بدوی ۱۲۳
۴-۶. بررسی تمایز و غنی سازی سلول های شبه زایای بدوی به سلول های بنیادی شبه اسپرماتوگونیا ۱۲۶
۴-۷. نتیجه گیری نهائی ۱۳۰
۴-۷-۱. نتیجه گیری نهایی قسمت In vitro ۱۳۱
**فهرست منابع** ۱۳۲
**چکیده انگلیسی** ۱۴۸

# فهرست جداول

جدول ۱-۱. مارکرهای مولکولی بیان شده در طی مراحل رشد و بلوغ سلول های زایا و گامت ها ..... ۸
جدول ۱-۲. ترشحات پاراکرین سلول های موجود در بافت بیضه و تاثیر ترشحات این سلول ها بر سایر سلول های این بافت ..... ۱۱
جدول ۲-۱. غلظت آنتی بیوتیک مورد استفاده در محیط کشت باکتری بر اساس نوع وکتور ..... ۴۱
جدول ۲-۲. تعیین غلظت لیپوفکتامین و DNA بر اساس شرکت سازنده Invitrogen ..... ۴۷
جدول ۲-۳. پرایمرهای طراحی شده جهت بررسی ژنی با دستگاه Real Time PCR ..... ۵۴
جدول ۳-۱. میانگین درصد بقاء و تکثیر سلولی سلول های مزانشیمی مغز استخوان پاساژ چهار، پس از قرار گیری در معرض دوزهای مختلف BMP-4 ..... ۷۵

# فهرست نمودارها

نمودار ۳-۱. منحنی Amplification، Melt و Standard به ترتیب از بالا به پائین در گروه کنترل مربوط به ژن Piwil2 ..... ۷۰
نمودار ۳-۲. منحنی Melt مربوط به کلیه ژن های پرتوانی و ژن های اختصاصی سلول های زایا ..... ۷۱
نمودار ۳-۳. الگوی بیان ژنهای پرتوانی و اختصاصی سلول های زایای تمایز یافته در سلول های مزانشیمی تازه و پاساژ چهارم ..... ۷۲
نمودار ۳-۴ الگوی بیان ژن Mvh پس از بکار بردن غلظت های متفاوت BMP-4 در محیط کشت ..... ۷۶
نمودار ۳-۵. الگوی بیان ژنهای پرتوانی و اختصاصی سلول های زایای تمایز یافته در سلول های زایای بدوی تمایز یافته پس از ۴ روز تیمار با ۲۵ نانوگرم بر میلی لیتر BMP-4 ..... ۷۸
نمودار ۳-۶. الگوی بیان ژنهای پرتوانی پس از غنی سازی سلولهای بنیادی تمایز در گروه های مختلف مورد مطالعه ۸۱
نمودار ۳-۷. الگوی بیان ژنهای اختصاصی سلول های زایا پس از غنی سازی سلولهای بنیادی تمایز در گروه های مختلف مورد مطالعه ..... ۸۱
نمودار ۳-۸. الگوی بیان ژنهای اختصاصی سلول های زایا (A) و پرتوانی (B) پس از تمایز سلول ها به سلول های بنیادی اسپرماتوگونیا در گروه های مورد مطالعه ..... ۹۱
نمودار ۳-۹. الگوی بیان ژنهای اختصاصی سلول های زایا در طی مرحله غنی سازی سلول های بنیادی شبه اسپرماتوگونیا ..... ۹۳
نمودار ۳-۱۰. الگوی بیان ژن های پرتوانی (A) و اختصاصی سلول های زایا (B) در طول کل مراحل تمایز در سلول های Stra-8 مثبت خالص سازی شده ..... ۹۴
نمودار ۳-۱۱. الگوی بیان ژن های پرتوانی (A) و اختصاصی سلول های زایا (B) در طول کل مراحل تمایز در سلول های تمایز یافته بدون خالص سازی ..... ۹۵
نمودار ۳-۱۲. الگوی بیان ژن های اختصاصی سلول های زایا (A) و پرتوانی (B) در طی مرحله شروع و پایان تمایز در سلول های تمایز یافته Stra-8 مثبت ..... ۹۶
نمودار ۳-۱۳. آزمون ایمنوسیتوشیمی پروتئین های Pou5F1 (A) ، Mvh (B) و Stra-8 (C) در طی مراحل تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلولهای بنیادی شبه زایا ..... ۱۰۰
نمودار ۳-۱۴. میانگین تعداد اسپرم شمارش شده ..... ۱۰۸
نمودار۳-A ۱۵. تعداد سلولهای اسپرماتوگونی در لوله های منی ساز گروههای مختلف آزمایشی و گروه های کنترل در واحد حجم ($mm^3$) ..... ۱۰۹
نمودار۳-۱۵. تعداد سلولهای اسپرماتوسیت (B) و اسپرماتید (C) در لوله های منیساز گروههای مختلف آزمایشی و گروه های کنترل در واحد حجم ($mm^3$) ..... ۱۱۰

# فهرست شکل ها

شکل ۲-۱. روش ساخت و نقشه شماتیک سازه نوترکیب Stra8-CD4 HAglo ..... ۳۷
شکل ۲-۲. نقشه وکتور حاوی سازه نوترکیب Stra8-CD4 HAglo ..... ۳۸
شکل ۲-۲. تصویر شماتیک از سانتریفیوژ بر اساس شیب غلظت در جداسازی لنفوسیت های خونی ..... ۴۵
شکل ۳-۱. کشت سلول های استرومائی مغز استخوان موشی، بعد از گذشت ۴ ساعت ..... ۶۴
شکل ۳-۲. کشت سلول های استرومائی مغز استخوان موشی، بعد از گذشت ۴ پاساژ ..... ۶۵
شکل ۳-۳ . تائید ماهیت سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بعد از پاساژ چهار ..... ۶۶
شکل ۳-۴. تمایز سلول های مزانشیمی مغز استخوان پاساژ چهار به رده استئوژنز و ادیپوژنز ..... ۶۷
شکل ۳-۵. ژل الکتروفورز بیان ژنهای Mvh، Piwil2، Stra-8، β-actin، B2m، Oct4، Nanog، c-Myc پس از RT-PCR در گروه کنترل ..... ۶۹
شکل ۳-۶. سلول های به دست امده از بافت بیضه موش نابالغ (A) کلونی های به دست امده از سلول های بنیادی جنین موشی رده CCE پس از گذشت دو روز کشت سلول ها بر روی ظروف ژلاتینه و در محیط کشت DMEM به همراه LIF (B) ..... ۷۲
شکل ۳-۷. کشت سلول های فیبروبلاست جنین موشی رده STO به عنوان لایه تغذیه کننده جهت غنی سازی سلول های بنیادی تمایز یافته با BMP4 ..... ۷۹
شکل ۳-۸. تعیین قطعات ایجاد شده پلاسمید حاوی قطعه bp ۴۰۰ قبل و بعد از هضم انزیمی ..... ۸۳
شکل ۳-۹. بررسی غلظت بهینه لیپوفکتامین ۲۰۰۰ جهت ترانسفکشن سلول های بنیادی مغز استخوان ..... ۸۴
شکل ۳-۱۰. بررسی کارائی روش لیپوفکتامین ۲۰۰۰ در ترانسفکت کردن سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان ..... ۸۵
شکل ۳-۱۱. بررسی فلوسیتومتری درصد بیان مارکر سطحی CD4 انسانی بر سطح سلول های مزانشیمی تمایز یافته و غنی سازی شده موشی بعد از ترانسفکشن با پلاسمید آماده سازی شده و قبل از خالص سازی سلول ها با ستون های MACS ..... ۸۶
شکل ۳-۱۲. بررسی ایمونوسیتوشیمی بیان مارکر سطحی CD4 انسانی بر سطح سلول های مزانشیمی تمایز یافته و غنی سازی شده موشی بعد از ترانسفکشن با پلاسمید آماده سازی شده و قبل از خالص سازی سلول ها با ستون های MACS ..... ۸۵
شکل ۳-۱۳. بررسی فلوسیتومتری درصد بیان مارکر سطحی CD4 انسانی بر سطح سلول های مزانشیمی تمایز یافته و غنی سازی شده موشی بعد از ترانسفکشن خالص سازی سلول ها با ستون های MACS با پلاسمید آماده سازی شده ..... ۸۷
شکل ۳-۱۴. بررسی ایمونوسیتوشیمی بیان مارکر سطحی CD4 انسانی بر سطح سلول های مزانشیمی تمایز یافته و غنی سازی شده موشی بعد از ترانسفکشن و خالص سازی سلول ها با ستون های MACS با پلاسمید آماده سازی شده ..... ۸۸

شکل ۳-۱۵. کشت سلول های سرتولی بیضه جنین موشی به عنوان لایه تغذیه کننده جهت تمایز سلول های بنیادی زایای تمایز یافته با استفاده از BMP-4 ..... ۸۹
شکل ۳-۱۶. آزمون ایمنوسیتوشیمی پروتئین های Pou5F1، Mvh و Stra-8 در سلولهای مغز استخوان ۴ ساعت و ۴ پاساژ ..... ۹۷
شکل ۳-۱۷. آزمون ایمنوسیتوشیمی پروتئین های Pou5F1، Mvh و Stra-8 در سلولهای بنیادی شبه زایای بدوی ۴ روز بعد از تیمار با ۲۵ نانوگرم بر میلی لیتر BMP-4 ..... ۹۸
شکل ۳-۱۸. آزمون ایمنوسیتوشیمی پروتئین های Pou5F1، Mvh و Stra-8 در سلولهای بنیادی شبه زایای بدوی ۷ روز بعد از تیمار با ۳ میکرومولار اسید رتینوئیک به همراه هم کشتی با سلول های فیبروبلاست موشی رده STO ۹۸
شکل ۳-۱۹. آزمون ایمنوسیتوشیمی پروتئین های Pou5F1، Mvh و Stra-8 در سلولهای بنیادی شبه اسپرماتوگونیا ۲ روز بعد از تیمار با ۳ میکرومولار اسید رتینوئیک+ ۱ نانوگرم بر میلی لیتر bFGF + ۱۰۰۰ واحد LIF به همراه هم کشتی با سلول های سرتولی موشی ..... ۹۹
شکل ۳-۲۰. آزمون ایمنوسیتوشیمی پروتئین های Pou5F1، Mvh و Stra-8 در سلولهای بنیادی شبه اسپرماتوگونیا ۱۴ روز بعد از تیمار با ۳ میکرومولار اسید رتینوئیک به همراه هم کشتی با سلول های سرتولی ..... ۹۹
شکل ۳-۲۱. بررسی توموزائی سلول های Stra-8 مثبت تمایز یافته در طی مراحل تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلولهای بنیادی شبه زایا ..... ۱۰۲
شکل ۳-۲۲. مقاطع عرضی از لوله های منی ساز در موش تیمار شده با بوسولفان ..... ۱۰۴
شکل ۳-۲۳. پیوند سلول های تمایز یافته Label شده ..... ۱۰۵
شکل ۳ -۲۴. ارزیابی موفقیت پیوند سلول های بنیادی تمایز یافته Stra-8 مثبت پس از گذشت ۴ هفته از پیوند. ۱۰۶
شکل ۳-۲۵. ردیابی سلول های تمایز یافته Label شده، ۸ هفته پس از پیوند. ..... ۱۰۷

# فصل اول

## مقدمه و

## مروری بر مطالعات گذشته

## ۱-۱. پیشگفتار

امروزه یکی از روش های درمانی برای درمان بسیاری از بیماری ها سلول درمانی است که با استفاده از انواع مختلف سلول های بنیادی انجام می شود. اخیراً محققین، سلول های بنیادی را به سلول های زایا جهت درمان ناباروری مردان تمایز داده اند. به دلیل مشکلات اخلاقی دراستفاده از سلول های بنیادی جنینی انسان و ماهیت تومورزایی آن ها، استفاده ازاین سلول ها که توانایی تکثیر و تمایز بالا دارند با محدودیت روبرو شده است. این محدودیت با استفاده از سلول های بنیادی سوماتیک نظیر سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان حل می گردد. آگاهی از روند تمایز سلول زایا در محیط طبیعی بدن می تواند در تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول های زایا در محیط آزمایشگاه کمک کننده باشد. اما فرایند تمایز سلول های زایا در بدن با پیچیدگی هایی همراه است. این پیچیدگی ها وابسته به اثرات القایی BMP-4 در زمان متعهد شدن سلول های اپی بلاست به سلول های زایای بدوی و پیشرفت سلول های گونوسیت در مسیر میوز تحت تاثیر اسید رتینوئیک از یک سو، بر هم کنش بین این سلول ها با سلول های فیبروبلاست در طول مهاجرت سلولی و سلول های سرتولی در زمان مقیم شدن سلول ها در گوناد تازه تشکیل شده و دیگر وقایع موجود می باشد. به این ترتیب در محیط آزمایشگاه به وجود آوردن سلول هایی با تعداد بالا و کارآمد در شرایطی شبیه بدن مشکل به نظر می رسد. به منظور درمان ناباروری مردان با استفاده از سلول های بنیادی، محققین به دنبال ایجاد محیط کشت مناسب برای تمایز سلول های زایا هستند. با توجه به مطالب فوق، در این تحقیق تاثیر فاکتور های القائی نظیر BMP-4 و دیگر مکمل های لازم در حضور هم کشتی با سلول های سرتولی و سلول های STO بر تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش نر بالغ به سلول های زایا بررسی خواهد شد.

## ۱-۲. مقدمه

ناباروری یکی از مشکلات عدیده پزشکی در دنیای امروز است. به طوری که میزان آن در جهان از سال ۱۹۵۵ تا کنون ۵۰٪ افزایش یافته است و هم اکنون ۱۰-۱۵٪ از زوج ها از این مشکل رنج می برند [۱]. ناباروری ممکن است هم معنی عقیمی باشد با این تفاوت که می تواند با وقوع پراکنده بارداری های احتمالی همراه باشد. تقریبا حدود ۳۵٪ از دلایل ناباروری مربوط به مشکلات سیستم تولید مثلی زن، ۳۵٪ مربوط به مشکلات سیستم تولید مثلی مردانه و ۲۰٪ به صورت توام و بقیه موارد با علل ناشناخته می باشد [۲]. در بین عوامل مردانه ۵-۱۰٪ از موارد ناباروری را سندرمی به نام SCO[1] یا Germ-Cell Aplasia به خود اختصاص داده است. چون این علت در مردان بسیار نادر است، تست های تشخیصی در این مورد تنها پس از چند نمونه برداشت بیوپسی از بیضه ها صورت می گیرد. یکی از راه های تشخیصی در این مورد، فقدان سلول های زایا در مایع منی می باشد که به وجود آوردنده اسپرم هستند. که به این حالت آزواسپرمی می گویند. دلایل آزواسپرمی متفاوت بوده به طوری که محققین به نقص گنادوتروپین ها، درمان های هورمونی، رادیو تراپی، عوامل محیطی نظیر مواد شیمیائی و سموم اشاره دارند. در اکثر موارد سندرم سرتولی تنها، باروری مردان، غیر ممکن می باشد. در بعضی از موارد، گرفتن نمونه از بافت بیوپسی بیضه می تواند منجر به دستیابی به مقادیر کمی از اسپرم می شود. با این حال در بعضی از موارد هیچگونه سلول اسپرمی در نمونه بیوپسی مشاهده نمی شود. در این موارد در صورت وجود، استفاده از روش سلول درمانی با استفاده از سلول های بدن فرد می تواند در درمان بیماری فوق کارساز باشد[۳].

[1] Sertoli-cell Only Syndrome

## ۱-۳. تشکیل و تمایز سلول های زایا در محیط بدن پستانداران

سلول های زایا مسئول انتقال اطلاعات ژنتیکی از یک نسل به نسل بعدی می باشند و از جمعیتی از سلول های مختلف مشتق شده از سلول های سوماتیکی تشکیل شده اند. در انسان و به طور کلی در پستانداران، سلول های زایا از یک جمعیت پرتوان از سلول های اختصاصی تحت عنوان سلول های زایای بدوی یا PGCs[1] مشتق شده اند. این سلول ها در مراحل اولیه ایجاد جنین، تمایز یافته و سلول های اجدادی رده زایا را تشکیل می دهند. در انسان اولین PGC های تشکیل شده در خارج از کیسه زرده و در هفته ۲-۳ رشد جنینی ظاهر می شود[ ۴ ]. در موش این جمعیت در قاعده آلانتوئیس و در روز ۷/۲۵ جنینی و در واکنش به فاکتورهای مترشحه از اکتودرم خارج جنینی از جمله BMP[2]-4 & 8 به وجود می آید [ ۵-۸ ]. این سلول های زایای بدوی شبیه به سلول های پرتوان اپی بلاست قادرند به سه رده زایای جنین یعنی رده مزودرمی، اکتودرمی و اندودرمی تمایز یابند. این سه رده، سایر سلول های بدن را می توانند به وجود آورند.

۱۲ ساعت بعد از تشکیل سلول های زایای بدوی، تقریبا ۶ دسته سلول که Fragile یا E-Cadherin را بیان می کنند در قسمت پشتی بخش پروگزیمال اپی بلاست پدیدار می شوند. این سلول ها وارد مسیر ایجاد سلول های ژرم شده و سرانجام پیش ساز های سلول های زایای بدوی در امتداد سلول های مزودرم خارج رویانی در قاعده آلانتوئیس حرکت کرده و در حدود روز ۱۳/۵ بعد از لقاح در داخل گنادها به اووگونیا یا اسپرماتوگونیا تمایز می یابند. به این ترتیب در طی مراحل رشد و تمایز سلول های PGC سه مرحله مشاهده می شود: مرحله اختصاصی شدن، مرحله مهاجرت و مرحله تکثیر [ ۹ ]. بعد از این مراحل سلول ها بر حسب مقدار اسید رتینوئیک موجود در گناد تقسیم میوز انجام می دهند. در جنس نر، گونوسیت ها در مرحله G0 توقف کرده و تقسیم میتوز متوقف شده خود را در زمان تولد از سر می گیرد [ ۱۰-۱۱]. در زمان تولد، سلول های غیر فعال تقسیم میتوز را از

[1] primordial germ cells
[2] bone morphogenetic protein