دانشگاه پیام نور

دانشکده علوم پایه دانشگاه پیام نور

گروه زیست شناسی

پایان نامه
جهت اخذ درجه کارشناسي ارشد
رشته زیست شناسي-علوم جانوري

عنوان:

بررسی تولید نیتریک اکساید و تاثیر L-NAME بر آن در خلال تمایز سلولهای بنیادی مغز استخوان موش صحرایی به سلولهای استخوان ساز

اساتید راهنما:

دکتر ایرج امیری

دکتر سیما نصری

نگارش:

سیده الهام ارفعی

خرداد ۱۳۸۹

تقديم به:

روح پدربزرگوارم

دكتر سيد ابوالقاسم ارفعي

افسوس كه بين ما نيست.

و

مادر دلسوز و مهربانم

دريايي بيكران از

عشق و محبت

صبروازخودگذشتگي

بر دستان مهربانش بوسه مي زنم.

تقدیم به:

همسر عزیزم

مهندس جامچی

که با صبر و بردباری مرا در پیمودن این راه یاری کرد و همواره تکیه گاهی محکم و استوار برایم بوده و خواهد بود.

و

دختر عزیزم:

الناز

که زیباترین هدیه خداوندی است.

تقدیم به برادر عزیزم:

مهندس علي ارفعی

و همسر مهربانش

تقدیم به برادر عزیزم:

دکتر مهدي ارفعی

تشکر و قدردانی از اساتید محترم:

جناب آقای دکتر امیری

و

سرکار خانم دکتر نصری

سپاس و قدردانی:

از دوست گرامی

سرکار خانم خرمرودی

که کمکها و راهنماییهای ایشان برایم بسیار ارزشمند بود.
آرزوی موفقیت برایشان دارم.

با تشکر از:

سرکار خانم قربانی ، سرکار خانم قیاسوند
آقای دکتر کریمی ، جناب آقای هادئی

پرسنل مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی

و کلیه عزیزانی که در این تحقیق مرا یاری نمودند.

چکیده

مقدمه:

بر اساس برخی یافته های جدید نیتریک اکساید یکی از عوامل مهم دخیل در استخوان سازی در بدن می باشد و بنظر می رسد که این مولکول در تمایز سلولهای بنیادی به سلولهای استخوانی در محیط کشت نیز نقش مهمی دارد.هدف از مطالعه حاضرالقای تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی به سلولهای استخوانی و بررسی تاثیر یک مهار کننده تولید نیتریک اکساید بنام L-NAME (L-nitro-l-arginine methyl ester) بر آن می باشد.

مواد وروشها:

این یک مطالعه تجربی می باشد که در آن سلولهای مغزاستخوان موشهای صحرایی در شرایط کا ملا استریل جدا شده ودر محیط کشت مناسب کشت داده شدند .پس از پاساژ سوم ، سلولهای فوق برای تمایز به استخوان تحت تاثیر فاکتورهای تمایزی قرارگرفتند . در برخی از پلیت های کشت در حین تمایز، L-NAME با غلظتهای (۲۵۰،۱۲۵و۵۰۰ میکرو مولار) ، به محیط تمایزی اضافه شد تا ت اثیر آن بر تمایز سلولها مورد بررسی قرار گیرد.در حین تمایز محیط تمایزی هر ۳ روز یکبار تعویض شد وعمل تمایز تا ۲۸ روز ادامه یافت. پس از پایان دوره تمایز، به منظور بررسی وقوع تمایز استخوانی،از روش رنگ آمیزی آلیزارین رد برای ماتریکس معدنی شده، استفاده گردید. همچنین میزان آلکالین فسفاتاز و کلسیم در سلولهای کشت داده شده ، اندازه گیری شد. ودر نهایت میزان نیتریک اکساید تولید شده در حین تمایز در محیطهای مختلف ، اندازه گیری شد.

نتایج:

نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان داد که در هنگام تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی به سلولهای استخوانی ، تولید نیتریک اکساید افزایش یافت و ارتباط معنی داری بین میزان تولید ماتریکس مینرالیزه و میزان تولید نیتریک اکساید وجود دارد.همچنین نتایج این مطالعه نشان د اد که در حضور L-NAME، تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی به سلولهای استخوانی مختل شده و از میزان تولید ماتریکس معدنی شده بطور معنی داری در یک روند وابسته به دوز کاسته می شود.

بحث و نتیجه گیری :

این مطالعه نشان می دهد که نیتریک اکساید نقش مهمی در تمایز سلولهای بنیادی مغز استخوان موش صحرایی به سلولهای استخوانی دارد بطوریکه استفاده از L-NAME در محیط تمایزی موجب مهار تمایز سلولهای فوق به سلولهای استخوانی می گردد.

واژه های کلیدی: سلولهای بنیادی مزانشیمی،نیتریک کساید، استخوان سازی،L-NAME .

فهرست مطالب ..... الف
فهرست جداول ..... و
فهرست نمودارها ..... ز
فهرست اشکال ..... ح

فصل اول – مقدمه

۱-۱. سلولهای بنیادی:(Stem cells) ۱
۱-۱-۱. تعریف سلولهای بنیادی ۲
۱-۱-۲. طبقه بندی سلولهای بنیادی ۲
۱-۱-۳. ویژگی های مشترک همه سلول های بنیادی چیست؟ ۴
۱-۱-۴. انواع سلول های بنیادی ۵
۱-۱-۴-۱. سلول های بنیادی جنینی(ES) ۵
۱-۱-۴-۲. سلول های بنیادی بالغ ۸
۱-۱-۵. تشابهات و تفاوت های بین سلول های بنیادی بالغ و جنینی ۸
۱-۱-۶. سلول های بنیادی مغز استخوان ۱۱
۱-۱-۷. سلولهای بنیادی مزانشیمی ۱۳
۱-۱-۷-۱. سلولهای بنیادی مزانشیمی در in vivo ۱۳
۱-۱-۷-۲. سلولهای بنیادی مزانشیمی در in vitro ۱۳
۱-۱-۷-۳. ویژگی های سلول های بنیادی مزانشیمی ۱۴
۱-۱-۷-۴. منشأ سلول های بنیادی مزانشیمی ۱۸
۱-۱-۸. سیستم سلول استرومایی ۲۰
۱-۱-۸-۱. تشکیلات استروما..... ۲۱

۱-۱-۸-۲. ناهمگنی جمعیت سلول های استرومای مغز استخوان(BMSC ها)..... ۲۲
۱-۱-۸-۳. فاکتورهای تولید شده بوسیله کشت های استرومای مزانشیمی مغز استخوان ۲۲
۱-۱-۹. پتانسیل تمایزی سلول بنیادی مزانشیمی ۲۳
۱-۱-۹-۱. هتروژن بودن کشت سلول بنیادی مزانشیمی ۲۳
۱-۱-۹-۲. پتانسیل تمایز سلول بنیادی مزانشیمی به چندین رده سلولی ۲۴
۱-۱-۱۰. Plasticity (انعطاف پذیری) ۲۴
۱-۱-۱۰-۱. سلول های بنیادی بالغ و انعطاف پذیری ۲۵
۱-۱-۱۰-۲. ویژگی های تعیین و تعریف کننده انعطاف پذیری سلول بنیادی..... ۲۷
۱-۱-۱۰-۳ . مکانیسم های انعطاف پذیری سلول بنیادی ۲۸
۱-۱-۱۱. روش های جداسازی سلول های بنیادی مزانشیمی و کشت آنها ۳۰
۱-۱-۱۲. مسیرهای تمایز طبیعی سلول های بنیادی بالغ ۳۱
۱-۱-۱۳. پتانسیل تمایز به استخوان سلول بنیادی مزانشیمی ۳۳
۱-۱-۱۳-۱. اهمیت تمایز به استخوان ۳۳
۱-۱-۱۳-۲. شرایط آزمایشگاهی لازم برای تمایز به استخوان سلول های بنیادی مزانشیمی ۳۴
۱-۱-۱۳-۳. تنظیم مولکولی تمایز به استخوان سلولهای بنیادی مزانشیمی ۳۴
۱-۱-۱۳-۴. مسیرهای signaling تمایز به استخوان سلولهای بنیادی مزانشیمی ۳۵
۱-۱-۱۳-۵. ژن های در گیر در تمایز به استخوان سلولهای بنیادی مزانشیمی ۳۷
۱-۱-۱۳-۶. تقسیم غیر قرینه:اولین حادثه در جهت تعهد برای تمایز ۳۷
۱-۱-۱۴. مارکرهای سطحی سلول های بنیادی مزانشیمی ۳۸
۱-۲. نیتریک اکساید(NO) ۳۹
۱-۲-۱. خواص شیمیایی ۳۹
۱-۲-۲.نقش فیزیولوژیک نیتریک اکساید ۴۰
۱-۲-۳. سنتز NO ۴۰

۱-۲-۴.تاثیر NO بر تمایز سلولهای بنیادی مغز استخوان ۴۲
۱-۳. نتیجه گیری ، چالش ها و چشم اندازها ۴۴
۱-۴.اهداف کار ۴۵
۱-۴-۱.اهداف اصلی ۴۵
۱-۴-۲.اهداف فرعی ۴۵

فصل دوم : مواد و روش ها

۲ - ۱. تقسیم بندی مراحل تحقیق ۴۶
۲- ۲.وسایل آزمایشگاهی مورد نیاز ۴۶
۲-۳. مواد و محلول های لازم جهت کشت و تمایز سلول ۴۸
۲-۳-۱.محیط کشت (DMEM) ۴۸
۲-۳-۲. سرم FBS ۴۸
۲-۳-۳. محلول Trypsin-EDTA 0.25% ۴۸
۲ ۳ ۴. محلول Pen-Strep ۴۹
۲ ۳ ۵. محلول PBS ۴۹
۲ ۳ ۶. محلول Dimethyl sulfoxide (DMSO) ۴۹
۲ ۳ ۷. محیط انجماد ۵۰
۲ ۳ ۸. محلول اسید آسکوربیک ۵۰
۲ ۳ ۹. محلول دگزا متازون ۵۰
۲ ۳ ۱۰-.محلول β گلیسرول فسفات ۵۱
۲ ۳ ۱۱.پودر L-NAME ۵۱

۲-۴. مواد و محلول های لازم جهت تشخیص تمایز سلول ها ۵۱
۲-۴-۱. *تشخیص بر اساس روش های رنگ سنجی* ۵۱
۲ ۵. رنگ آمیزی ۵۲
۲-۵-۱. موادووسایل لازم جهت رنگ آمیزی آلیزارین رد ۵۲
۲-۵-۲. شستشوی وسایل مورد نیاز ۵۲
۲- ۶. روش کار ۵۳
۲- ۶- ۱. خصوصیات رت های مورد آزمایش و شرایط نگهداری آنها ۵۳
۲- ۶- ۲. نحوه تشریح رت ها و تهیه سلول های مغز استخوان ۵۳
۲- ۶-۳. کشت اولیه سلول های مغز استخوان (Primary Cell Culture) ۵۴
۲- ۶- ۴. پاساژ (subculture) ۵۴
۲-۶-۵. انجماد سلولی (Freezing ۵۵
۲-۶-۶. تمایز سلول های MSC به سلول های استخوانساز (Differentiation) ۵۵
۲-۶-۶-۱. بررسی تاثیر L-NAME بر روند تمایز ۵۶
۲-۶-۷. تستهای تشخیصی ۵۷
۲-۶-۷-۱. تشخیص مورفولوژیکی ۵۷
۲-۶-۷-۲. رنگ آمیزی Alizarin red ۵۷
۲-۶-۷-۳. آنالیز کمی رنگ آمیزی آلیزالین رد ۵۷
۲-۶-۷-۴. فعالیت آلکالین فسفاتاز(ALP) ۵۸
۲-۶-۷-۵. تست کلسیم ۵۸
۲-۶-۷-۶. اندازه گیری سطح نیتریک اکساید ۵۹

فصل سوم:نتایج

۳-۱. نتایج حاصل از مشاهدات مورفولوژیکی ۶۱

۳-۱-۱. مشاهدات مربوط به مورفولوژی سلول ها پس از جداسازی از مغزاستخوان موش صحرایی.....۶۱

۳-۱-۲. مشاهدات مربوط به مورفولوژی سلول ها در کشت های سلولهای مزانشیمی مغز

استخوان پاساژداده شده و بدون پاساژ ۶۱

۳-۱-۳. مشاهدات مربوط به مورفولوژی سلول های تمایز یافته در حضور

و عدم حضور L-NAME ۶۷

۳-۱-۴. مشاهدات مورفولوژیک پس ازرنگ آمیزی با Alizarin red ۶۷

۳-۲. نتایج حاصل ازتست های بیوشیمی ۷۵

۳-۲-۱. نتایج حاصل از اندازه گیری فعالیت آلکالین فسفاتاز ۷۵

۳-۲-۲. نتایج حاصل از اندازه گیری محتوای کلسیم داخل سلولی ۷۷ ۳-

۳-۲. نتایج حاصل از اندازه گیری میزان نیتریک اکساید ۸۰

۳-۲-۴. نتایج حاصل از اندازه گیری میزان ماتریکس مینرالیزه شده ۸۳

فصل چهارم: بحث . **۸۷**

پیشنهادات **۹۷**

منابع **۹۸**

فهرست جداول

جدول ۱-۱. بیان فاکتورهای رشد توسط سلول های استرومای مزانشیمی انسان در محیط کشت..... ۲۳

فهرست نمودارها

نمودار ۳-۱. نمودارفعالیت آلکالین فسفاتازی..... ۷۵

نمودار ۳ -۲ : نمودارفعالیت آلکالین فسفاتازی گروههای مختلف در دوره تمایز ۷۶

نمودار ۳- ۳ : نمودار محتوی کلسیم داخل سلولی در گروههای مختلف در دوره تمایز (P<0.001) ۷۸

نمودار ۳- ۴ : نمودار محتوی کلسیم داخل سلولی گروههای مختلف در دوره تمایز ۷۹

نمودار۳- ۵ : نمودار تولید نیتریک اکساید گروههای مختلف در دوره تمایز ۸۱

نمودار ۳ – ۶ : نمودار تولید نیتریک اکساید در گروههای مختلف در دوره تمایز (P<0.001) ۸۲

نمودار ۳- ۷ : . مقایسه میزان تولید ماتریکس مینرالیزه ۸۴

نمودار ۳ – ۸ : نمودار ارتباط بین میزان ماتریکس مینرالیزه با میزان نیتریک اکساید..... ۸۵

نمودار۳-۹ . نمودار ارتباط بین میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز با میزان نیتریک اکساید **۸۶**

فهرست اشکال

شکل ۱-۱. سلولهای بنیادی چند توان قادرند به سلولهای مشتق شده از هر سه

لایه جنینی تمایز یابند. ۳

شکل ۱-۲. سلولهای بنیادی پر توان که که قادرند به بعضی دودمانهای سلولی تمایز

یابند..... ۴

شکل ۱-۳. بلاستوسیست..... ۶

شکل ۱-۴. تصویر شما تیک از محل سلولهای بنیادی جنینی در بلاستوسیت اولیه..... ۷

شکل ۱-۵. توانایی تمایز سلولهای بنیادی بالغ وجنینی به انواع سلولها..... ۹

شکل ۱-۶. سلولهای بنیادی خونساز توانایی تمایز به انواع سلولهای را دارند..... ۱۲

شکل ۱-۷. استروم‌ای مغز استخوان منبع رایجی از سلول های چند توان و درنتیجه منبعی

از سلولهای بنیادی مزانشیمی. ۱۹

شکل ۱-۸. انعطاف پذیری سلول بنیادی بالغ..... ۲۷

شکل ۱-۹. تمایز سلول بنیادی خونساز و استرومایی..... ۳۲

شکل ۱-۱۰. طرح ساده مسیر سیگنالی Wnt..... ۳۶

شکل ۳-۱. سلولهای مغز استخوان رت ۲۴ ساعت پس از آسپیراسیون..... ۶۲

شکل ۳-۲. سلولهای مغز استخوان رت ۳۶ ساعت پس از آسپیراسیون..... ۶۳

شکل ۳-۳. سلولهای مغز استخوان رت ۷۲ ساعت پس از آسپیراسیون ۶۴

شکل ۳-۴. سلولهای مغز استخوان رت ۹۶ ساعت پس از آسپیراسیون..... ۶۵

شکل ۳-۵ . سلولهای بنیادی مزانشیمی در پاساژ سوم ۶۶

شکل ۳- ۶ . تشکیل ندولهای مینرالیزه در گروه کنترل ۱۸ روز پس از آغاز تمایز..... ۶۸

شکل ۳- ۷ . تشکیل ندولهای مینرالیزه در گروه کنترل ۲۱ روز پس از آغاز تمایز..... ۶۹

شکل ۳- ۸ . ندولهای شبه استخوانی در لایه سلولی ۲۱ روز پس از آغاز
تمایز.حضور سلولهای زنده ی ارگانیزه شده ۷۰

شکل ۳- ۹ . سلولهای مزانشیمال ۲۱ روز پس از کشت در گروه L-NAME 250 .....۷۱

شکل ۳ – ۱۰ . رنگ آمیزی آلیزارین رد در گروه کنترل ۲۸ روز پس از آغاز تمایز..... ۷۲

شکل ۳- ۱۱ . رنگ آمیزی آلیزارین رد در گروه کنترل
(میکروسکوپ معکوس بزرگ نمایی۲۰۰ برابر). ۷۳

شکل ۳ – ۱۲ . رنگ آمیزی آلیزارین رد در گروه کنترل
(میکروسکوپ معکوس بزرگ نمایی۴۰۰ برابر)..... ۷۴

فصل اول

مقدمه

۱ ـ۱. سلولهای بنیادی (Stem cells) :

سلول های بنیادی سلولهای بدوی موجود در بدن کلیه موجودات زنده هستند که دارای دو ویژگی اساسی یعنی توانایی تقسیم شدن و تکثیر سلولهای بنیادی با خواص یکسان و ایجاد انواع سلولهای تمایز یافته هستند.(passier.2003) در حال حاضر سلول های بنیادی یکی از بخش های بسیار جذاب بیولوژی است . اما همچون اکثر زمینه های علمی، تحقیق روی سلول های بنیادی علاوه بر اینکه کشفیات جدیدی را بدنبال دارد سؤال های علمی زیادی را نیز ایجاد می نماید.

دانشمندان معتقدند که سلول های بنیادی ممکن است در آینده پایه ای برای درمان بیماری هایی همچون پارکینسون، دیابت، بیماری های کبدی و بیماری ه ای قلبی باشند. دانشمندان دوست دارند که سلول های بنیادی را در آزمایشگاه مطالعه کرده و ویژگی های اساسی آنها را بدانند و اینکه چه عاملی آنها را از سایر سلول های تخصص یافته متفاوت می سازد را بشناسند . با این بررسی ها نه تنها استفاده ازاین سلول ها درسلول درمانی، بلکه در تهیه داروها و سموم جدید و درک حقایق مرگ نیز امکان پذیر می گردد . جهت انجام چنین روشهای درمانی، دانشمندان بطور پیش رونده ای ویژگی های سلول های بنیادی را که شامل موارد ذیل هستند ، بررسی می کنند:

- تعیین دقیق اینکه چگونه سلول های بنیادی برای چندین سال تخصص نیافته باقی مانده و خاصیت خودتجدیدی را حفظ می کنند.

- مشخص کردن سیگنال هایی که سلول های بنیادی را به سلول های تخصص یافته تبدیل می کنند.

۱-۱-۱.تعریف سلولهای بنیادی:

به طور کلی ۳ معیار عملی برای تعریف سلولهای بنیادی وجود دارد :

۱- سلولهای بنیادی قادرند تحت تقسیمات کاملا یکسان که شرط لازم برای پشتیبانی و نگهداری جمعیت سلولهای بنیادی است ، خود نوزایی[۱] کنند. (Suzuki, 2000)

[۱] Self renewal

۲ – سلولهای دختری،حاصل از تقسیم یک سلول بنیادی واحد،توانایی لازم برای متمایز شدن به انواع دودمانهای سلولهای بالغ را دارند.

به عنوان مثال سلولهای بنیادی خونساز (HSC) قادر است انواع سلولهای خونی را تولید کند .(Lavon, 2004; Lagasse, 2000). سلولهای بنیادی عصبی قادر به تولید سلولهای استروسیت و الیگودندریتی بوده (Hou, 2003; Ruhnke, 2003)و یا سلولهای بنیادی جنینی قادر است که یک اووسیت جدید تولید کند و یا سلولهای بنیادی بالغ مزانشیمی [۲] (MSCs) می توانند انواع سلولهای بافت مزانشیمی از جمله فیبروبلاست،استئوسیت،کندروسیت و آدیپوسیت را تولید کند (Benayahu, 1989).

۳ – معیار سوم برای سلولهای بنیادی این است که وقتی این سلولها به یک بافت آسیب دیده پیوند می شوند،قادرندبه طور عملی یک جمعیت سلولی ترمیمی را تشکیل دهند.

تذکر: معیار سوم مهمترین عمل سلولهای بنیادی در بافتهای بالغ محسوب می شود.

۱–۱–۲. طبقه بندی سلولهای بنیادی:

سلولهای بنیادی را براساس توانایی تمایز و خا صیت پلاستیسیته به ۵ دسته تقسیم می شوند:

۱ – Totipotent Stem Cell (سلولهای بنیادی همه توان): سلولهایی که از ترکیب سلول تخم و اسپرم بوجود می آیند و سلولهای مشتق شده،بعد از اولین تقسیم تخم لقاح یافته هستند و قادرند به انواع سلولهای خارج جنینی و جنینی تبدیل شوند. .

۲ – Pluripotent Stem Cell (سلولهای بنیادی پر توان) : سلولهای بنیادی هستند که از سلولهای Totipotent ضعیفتر بوده وقادرند به سلولهای مشتق شده از هر سه لایه جنینی تمایز یابند (شکل ۱–۱) (Quesenberry, 2005).

[۲] Mesenchymal stem cell