بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست شناسی

گرایش تکوینی

بررسی اثر مورفین بر تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان به سلول عصبی

اساتید راهنما:

دکتر مهری آزاد بخت

دکتر علی امینی

نگارش:

سمیه یعقوبی

اسفند ماه ۱۳۸۸

دانشگاه رازی
دانشکده علوم
گروه بیولوژی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی گرایش تکوینی

سمیه یعقوبی

تحت عنوان :

بررسی اثر مورفین بر تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان به سلول عصبی

در تاریخ ۱۳۸۸/۱۲/۱ توسط هیات داوران زیر بررسی و با درجه به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای ۱	دکتر مهری آزادبخت	با مرتبه‌ی علمی استادیار	امضاء
۲- استاد راهنمای ۲	دکتر علی امینی	با مرتبه‌ی علمی دانشیار	امضاء
۳- استاد داور داخلی	دکتر علی بیدمشکی پور	با مرتبه‌ی علمی استادیار	امضاء
۴- استاد داور خارجی	دکتر رستم قربانی	با مرتبه‌ی علمی دانشیار	امضاء

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات ، ابتکارات
و نوع آوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه
متعلق به دانشگاه رازی است.

فصل اول

مقدمه

فصل دوم

مواد و روش‌ها

فصل سوم

نتایج

فصل چهارم

بحث و نتیجه گیری

منابع

ضمیمه

چکیده:

سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان (BMSCs) سلول‌های چندتوانی هستند که می‌توانند در شرایط *in vitro* به سرعت رشد کنند و توانایی تمایز به سمت انواع سلول‌ها از جمله سلول‌های عصبی را دارند. این مطالعه به بررسی اثر غلظت‌های پایین مورفین(M^{-12}۱۰و$^{-10}$۱۰ ،$^{-8}$۱۰ ،$^{-6}$۱۰ ، $^{-4}$۱۰) بر طویل شدن نوریت‌ها در سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان که هم‌زمان توسط استئوروسپورین به سمت سلول‌های عصبی تمایز یافته بودند،انجام شد.

در این بررسی BMSCs از استخوان فمور و تیبیای موش‌های نژاد NMRI جداسازی شدند و در انکوباتور با دمای $37^{o}C$ و $5\ CO_2$ درصد کشت داده شدند. پس از اولین پاساژ سلولی، سلول‌ها با استئوروسپورین(۲۱۴ نانومولار) که به عنوان القا کننده‌ی تمایز عصبی معرفی شده است همراه با غلظت‌های $^{-12}$۱۰ ،$^{-10}$۱۰ ،$^{-8}$۱۰،$^{-6}$ ۱۰و$^{-4}$۱۰ مولار مورفین تیمار شدند. میزان زنده ماندن و متوسط طول نوریت‌ها در غلظت‌های مختلف اندازه‌گیری شد. برای سنجش تفاوت‌های موجود بین گروه کنترل و گروه‌های تیمار از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد($p< 0.05$).

ارزیابی میزان زنده ماندن هر گروه فواصل زمانی(۶ ،۱۲ و ۲۴ ساعت) نشان داد که میزان زنده ماندن سلول-های تیمار شده در غلظت‌های $^{-4}$۱۰و $^{-6}$۱۰ مولار مورفین از سایر گروه‌ها بیشتر است($p< 0.05$). علاوه بر این در این بررسی، طول بلندترین نوریت‌ها از جسم سلولی تا مخروط رشد برای هر گروه اندازه‌گیری شد. سلول‌های تیپیک شبه عصبی دارای نوریت بعد از گذشت چهار ساعت کاملا قابل تشخیص بودند. سلول‌ها، ویژگی‌های مورفولوژیکی خاص سلول عصبی مانند جسم سلولی کروی و زواید منشعب طویل با ساختارهای انتهایی شبیه به مخروط رشد را نشان دادند.این ویژگی‌ها به طور چشمگیرتری در سلول‌های تیمار شده با مورفین مشاهده شدند. طول نوریت‌ها در گروه‌های تیمار شده با مورفین با غلظت‌های (M^{-12}۱۰و$^{-10}$۱۰ ،$^{-8}$۱۰ ،$^{-6}$۱۰ ، $^{-4}$۱۰) مورفین به ترتیب (۲۳۱±۶,۰۸ µm، ۲۴۶±۶,۶۸، ۲۴۸±۴,۹۳، ۲۵۵±۵,۳۹، ۲۷۹±۵,۶۹ و در گروه کنترل ۲۳۳±۶,۵۷) بود. نتایج نشان داد که متوسط طول بلندترین نوریت‌ها ۲۷۹±۵,۶۹ میکرومتر و مربوط به غلظت ۴-۱۰ میکرومولار مورفین بود.

نتایج ما پیشنهاد می‌کند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان می‌توانند به سلول‌هایی با فنوتیپ‌های سلول‌های عصبی تمایز یابند و این امکان وجود دارد که از سلول‌های بنیادی مغز استخوان پس از تیمار بتوان به عنوان ذخیره‌ی سلولی در درمان بیماری‌های مخرب دستگاه عصبی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، مورفین، تمایز عصبی.

فهرست مطالب

عنوان.....صفحه
چکیده فارسی.....ا
فهرست مطالب.....ب
فهرست اشکال.....ه
فهرست جداول و نمودارها.....و
اختصارات.....ز

فصل اول - مقدمه :
۱-۱- سلول بنیادی چیست و چرا اهمیت دارد؟.....۲
۱-۲- ویژگی‌های سلول‌های بنیادی.....۲
۱-۲-۱- انواع پوتنسی.....۳
۱-۳- انواع سلول‌های بنیادی.....۵
۱-۳-۱- سلول‌های بنیادی جنینی.....۵
۱-۳-۱-۱- ویژگی‌های سلول‌های بنیادی جنینی.....۶
۱-۳-۱-۲- منابع سلول‌های بنیادی جنینی.....۸
۱-۳-۱-۳- برخی دشواری‌های مرتبط با سلول‌های بنیادی جنینی.....۱۰
۱-۳-۲- سلول‌های بنیادی بالغ.....۱۰
۱-۳-۲-۱- ویژگی‌های سلول‌های بنیادی بالغ.....۱۰
۱-۳-۲-۲- شواهدی بر وجود سلول‌های بنیادی بالغ.....۱۱
۱-۳-۲-۳- پلاستیسیتی در سلول‌های بنیادی بالغ.....۱۲
۱-۳-۲-۴- شواهد آزمایشگاهی از سلول‌های بنیادی بالغ وپلاستیسیتی.....۱۲
۱-۴- سلول‌های بنیادی درمغز استخوان و خون.....۱۳
۱-۴-۱-سلول‌های بنیادی هماتوپوییتیک.....۱۴
۱-۴-۲- سلول‌های بنیادی مزانشیمی.....۱۶

۱-۴-۲-۱- شواهدی بر وجود سلول‌های بنبادی مزانشیمی ۱۷
۱-۴-۲-۲- نیچ سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۱۸
۱-۴-۲-۳- هدف یابی و بهبود زخم ۲۱
۱-۴-۲-۴- نیچ سلول بنیادی مزانشیمی در مغز استخوان ۲۲
۱-۴-۲-۵- مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۲۳
۱-۵- خود تجدیدی ۲۶
۱-۶- پتانسیل تمایز چند دودمانی ۲۷
۱-۷- تنظیم تمایز ۲۸
۱-۸- جداسازی و کشت سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان ۳۰
۱-۹- تمایز نورونی سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان ۳۱
۱-۱۰- مورفین‌های آندوژن مرکزی و محیطی ۳۳
۱-۱۰-۱- مورفین اگزوژن ۳۴
۱-۱۰-۲- رسپتورهای اپیوئیدی μ میو ۳۴
۱-۱۰-۳- مکانیسم انتقال سیگنال توسط رسپتور μ ۳۵
۱-۱۰-۴- مورفین آندوژن ۳۶
۱-۱۰-۵- سنتز مورفین اندوژن ۳۷
۱-۱۰-۶- تاثیر مورفین بر تمایز سلول‌های عصبی در محیط کشت ۳۸
۱-۱۱- فرضیات تحقیق ۳۹

فصل دوم : مواد و روش‌ها

۲- ۱- تقسیم بندی مراحل تحقیق ۴۱
۲- ۲- مواد و محلول‌های آزمایش ۴۱
۲- ۲- ۱- محیط کشت پایه(DMEM) ۴۱
۲- ۲- ۲- سرم FBS ۴۲
۲- ۲- ۳- روش تهیه‌ی محیط کشت DMEM همراه با ۱۰ درصد FBS ۴۲
۲-۲-۴- محلول 0.25% Trypsin /EDTA ۴۲

۲- ۲- ۵- آنتی بیوتیک Pen / Strep ۴۲
۲-۲-۶- محلول(L-Glutanin 200mM(100x ۴۳
۲-۲-۷- محلول اسیدهای آمینه‌های غیر ضروری ۴۳
۲-۲-۸- بافر PBS (Ca2+, Mg2+ free) ۴۳
۲-۲-۹- استئوروسپورین ۴۳
۲-۲-۱۰- مورفین سولفات ۴۴
۲-۳- وسایل اولیه مورد نیاز ۴۴
۲-۴- تجهیزات بنیادی ۴۴
۲-۵- روش کار ۴۴
۲-۵- ۱- حیوان آزمایشگاهی ۴۴
۲- ۵- ۲- نحوه‌ی تشریح موش ها و جداسازی سلول‌های مغز استخوان ۴۵
۲- ۵-۳- کشت اولیه‌ی سلول‌های بنیادی مغز استخوان ۴۵
۲-۵-۴- مراقبت روزمره و تعویض محیط کشت ۴۵
۲-۵- ۵- پاساژ سلولی ۴۶
۲- ۵-۶- شمارش سلولی ۴۶
۲- ۵- ۷- رنگ آمیزی سلول‌ها با فوشین بازی ۴۷
۲-۵-۸- نحوه‌ی تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۴۷
۲-۵-۹- ارزیابی میزان زنده ماندن نورون‌ها ۴۸
۲-۵-۱۰- ارزیابی میزان نوریت‌زایی سلول‌ها ۴۸

فصل سوم: نتایج

۳-۱- جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش ۵۲
۳-۱-۱-کشت اولیه‌ی سلول‌های بنیادی مغز استخوان ۵۲
۳-۱-۲-سلول‌های بنیادی مغز استخوان پس از اولین پاساز ۵۳
۳-۲- نتایج مربوط به میزان بقای نورون‌ها ۵۴
۳-۳- نتایج مربوط به مورفولوژی سلول‌های تیمار یافته ۵۶

۳-۴- نتایج مربوط به تغییرات طول زواید نورونی ۵۷

فصل چهارم: بحث

۴-۱-مقدمه ۶۲
۴-۲- تمایز سلول‌های بنیادی بالغ به سلول عصبی ۶۴
۴-۳- نوروژنز القا شده به وسیله‌ی STS ۶۶
۴-۴- مورفین، نوروژنز و رشد سلول‌های عصبی ۶۷
منابع ۷۱
چکیده انگلیسی I

فهرست اشکال

شکل۱-۱- تمایز سلول‌های بنیادی ۳
شکل۱-۲- سلول‌های بنیادی همه‌توان جنینی ۴
شکل ۱-۳- جداسازی و تمایز سلول‌های بنیادی جنینی ۶
شکل۱-۴- فرآیند انتقال هسته‌ای ۹
شکل۱-۵- تمایز سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک ۱۵
شکل۱-۶- تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۱۶
شکل۱-۷- نیچ سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۲۰
شکل ۱-۸- مدلی از تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۲۸
شکل۱-۹- مدل فرضی از تمایز سلول‌های بنیادی بالغ ۳۰
شکل ۱-۱۰- واسطه‌های موجود در مسیر سنتز مورفین در پستانداران ۳۸
شکل۲-۱- نحوه شمارش سلول‌ها در لام نئوبار ۴۷
شکل ۲-۲- روش اندازه‌گیری طول نوریت‌ها ۴۹
شکل۳-۱- سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در کشت اولیه ۵۳
شکل ۳-۲- سلول‌های بنیادی مغز استخوان پس از پاساژ اول ۵۴
شکل ۳-۳- سلول‌های عصبی دو قطبی و چند قطبی و تشکیل شبکه‌های گسترده‌ی نورونی ۵۷

شکل ۳-۴- سلول‌های عصبی در غلظت‌های مختلف مورفین ۶۰

فهرست جداول

جدول ۱-۱- آنتی‌ژن‌های سطحی که طی جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی شناسایی شده‌اند..... ۲۴

جدول۳-۱- میزان بقای سلول‌ها در بازه‌ی زمانی ۱۲،۶و ۲۴ ساعت..... ۵۵

جدول۳-۲- .طول زواید نورونی در غلظت‌های مختلف مورفین ۵۸

فهرست نمودارها

نمودار ۳-۱- درصد بقای نورون‌ها در بازه‌ی زمانی مختلف..... ۵۶

نمودار ۳-۲- طول زواید نورونی در غلظت‌های مختلف مورفین ۵۹

۱-۱- سلول بنیادی چیست و چرا اهمیت دارد؟

سلول‌های بنیادی پتانسیل برجسته‌ای برای تکوین به سمت انواع مختلف سلول‌های بدن، در دوران اولیه‌ی حیات و رشد دارند. به علاوه سلول‌های بنیادی در برخی بافت‌ها به عنوان منبعی از سیستم‌های ترمیمی درونی عمل می‌کنند، به طوری که بدون محدودیت برای جایگزین کردن سلول‌ها در تمام طول حیات یک فرد یا جانور تقسیم می‌شوند. هنگامی که یک سلول بنیادی تقسیم می‌شود، هر کدام از سلول‌های جدید دارای پتانسیل، جهت باقی ماندن در وضعیت بنیادی یا رفتن به سمت نوع دیگری از سلول، با عملکرد اختصاصی‌تر، مانند یک سلول ماهیچه‌ای، یک سلول قرمز خونی یا یک سلول مغزی، می‌باشند.

سلول‌های بنیادی به وسیله‌ی دو ویژگی مهم از دیگر سلول‌ها قابل تشخیص هستند. اول این‌که آن‌ها سلول‌های اختصاص نیافته‌ای هستند که قادر به خودتجدیدی از طریق تقسیم سلولی، گاهی اوقات بعد از دوره‌های طولانی عدم فعالیت، می‌باشند. دوم این‌که تحت شرایط آزمایشگاهی یا فیزیولوژیکی خاص، آن‌ها می‌توانند برای رفتن به سمت سلول‌های خاص اندامی یا بافتی با عملکرد ویژه القا شوند. در برخی از اندام‌ها مانند لوله‌ی گوارش و مغز استخوان، سلول‌های بنیادی به طور منظم جهت ترمیم و جایگزینی بافت‌های آسیب دیده یا فرسوده تقسیم می‌شوند. در اندام‌های دیگر مانند پانکراس و قلب، سلول‌های بنیادی تنها تحت شرایط ویژه‌ای تقسیم می‌شوند (Tuch., 2006).

۱-۲- ویژگی‌های سلول‌های بنیادی

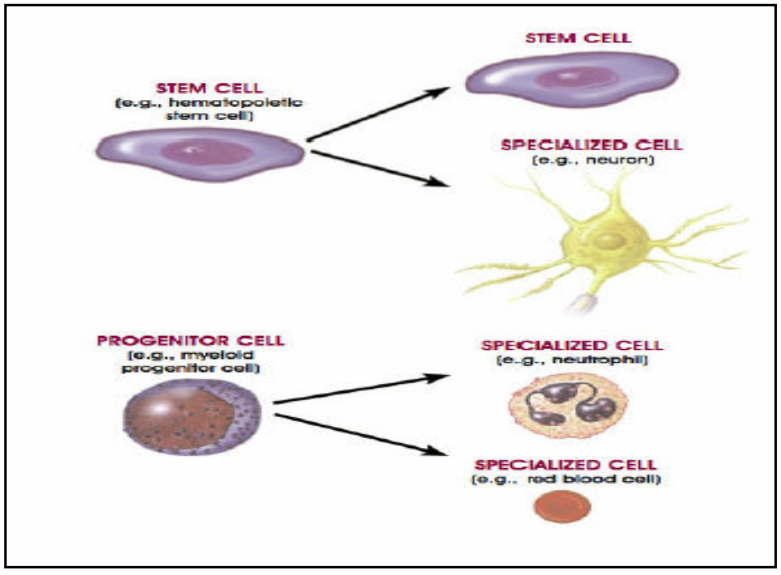
بدن انسان از انواع مختلف سلول‌ها تشکیل شده است که از سلول‌های معمولی پوست تا سلول‌های عصبی در مغز را شامل می‌شوند. اعمال این سلول‌های اختصاصی به طور طبیعی تغییر نمی‌کند. آن‌ها در تمام طول حیات خود، مجموعه‌ی از پیش تعیین شده‌ای از اعمال و فعالیت‌ها را انجام می‌دهند که مختص به همان سلول‌ها است. از طرف دیگر، سلول‌های بنیادی از انواع سلول‌های اصلی بدن هستند. این سلول‌ها دارای عمر طولانی و توانایی تمایز یا تغییر به سمت انواع دیگر سلول‌ها هستند. همچنین قابلیت تکثیر دارند به طوری که ذخایری از سلول‌های بنیادی را برای تولید نسل‌های بیشتر امکان‌پذیر می‌سازند (شکل ۱-۱). به دلیل این ویژگی‌ها، سلول‌های بنیادی می‌توانند بافت‌ها را بازسازی نمایند و بدین ترتیب در پزشکی کاربرد دارند (Yu and Thomson., 2007).

سلول‌های بنیادی دارای سه ویژگی زیرهستند:

۱- خودتجدیدی[1]: توانایی تکرار سیکل‌های متعدد تقسیم سلولی با حفظ وضعیت سلول تمایزنیافته.به این معنی که سلول‌های بنیادی قادر به تقسیمات سلولی خودتجدید هستند که در نهایت یکی از سلول‌های دختر، مشخصات بنیادی را حفظ می‌کند.

۲- پوتنسی[2]: ظرفیت تمایز به سمت انواع اختصاص یافته‌ی سلول است. سلول‌های بنیادی ویژگی‌های سلول‌های غیر اختصاصی را از خود به نمایش می‌گذارند، به این معنی که سلول‌های بنیادی نمی‌توانند اعمال خاصی فراتر از یک سلول بنیادی انجام دهند. آن‌ها می‌توانند از طریق تمایز، به سمت انواع خاص سلول مانند سلول‌های خونی، سلول‌های اندام‌های مختلف و سلول‌های عصبی تغییر شکل دهند. فرایند تمایز با سیگنال-های داخلی، که بوسیله ژن‌ها هدایت می‌شود و نیز سیگنال‌های شیمیایی کنترل می‌شود.

۳- سلول‌های بنیادی قادر به تولید بافت در شرایط in vivo هستند. (Verfaillie., 2009; Sell, 2004; Lakshmipathy and Verfaillie., 2005).



شکل ۱-۱ تمایز سلول‌های بنیادی (http://stemcells.nih.gov/info/scireport/chapter4.asp)

۱-۲-۱- انواع پوتنسی

پوتنسی پتانسیل تمایزی سلول‌های بنیادی را برای تمایز به سمت انواع مختلف سلول تعیین می‌کند (شکل ۱-۲).

1 Self–renewal
2 Potency

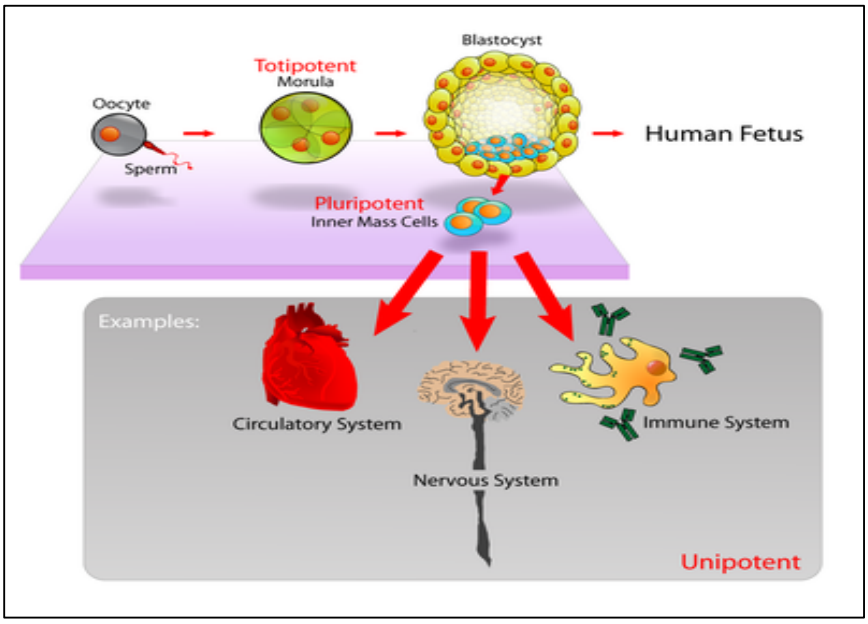
همه توان[1]: سلول‌های بنیادی می‌توانند به انواع سلول‌های جنینی وخارج جنینی تمایز یابند. چنین سلول-هایی می‌توانند یک موجود کامل و قابل نمو را تولید کنند. این سلول‌ها از لقاح تخمک و اسپرم تولید می-شوند. سلول‌های تولید شده به وسیله اولین تقسیمات تخم لقاح یافته نیز همه توان هستند.

پر توان[2]: سلول‌های بنیادی پرتوان‌زاده‌های سلول‌های همه توان هستند و می‌توانند تقریباً به انواع سلول‌ها، یعنی سلول‌های مشتق از هر سه لایه‌ی زایای جنینی تمایز یابند.

چند توان[3]: سلول‌های بنیادی چند توان می‌توانند به انواعی از سلول‌های متعلق به یک خانواده‌ی بسیار مرتبط ازآن‌ها تمایز یابند.

کم توان[4]: سلول‌های بنیادی کم توان می‌توانند به انواع بسیار کمی از سلول‌ها نظیر سلول‌های بنیادی لنفوییدی یا میلوییدی تمایز یابند.

یک توان[5]: سلول‌های بنیادی یک توان می‌توانند تنها یک نوع سلول تولید کنند اما این سلول‌ها ویژگی خود تجدیدی دارند که آن‌ها را از سلول‌های غیر بنیادی، متمایز می‌سازند (مانند سلول‌های بنیادی ماهیچه-ای) (Hans R. Schöler., 2007)



شکل ۱- ۲ سلول‌های بنیادی همه‌توان جنینی که از توده سلول‌های داخلی بلاستوسیست منشأ گرفته‌اند. این سلول‌ها می‌توانند به سمت هر یک از بافت‌های بدن به استثنای جفت پیش روند.تنها سلول‌های مورولا همه توان هستند و قابلیت تبدیل به همه‌ی بافت‌ها و نیز جفت را دارند.

1. Totipotent
2. Pluripotnt
3. Multipotnt
4. Oligopotent
5. Unipotent

۱-۳- انواع سلول‌های بنیادی

دو دسته مهم از سلول‌های بنیادی وجود دارند که سلول‌های بنیادی جنینی[۱] (ESCs) و سلول‌های بنیادی بالغ[۲] (ASCs) نامیده می‌شوند. ASCs در بدن فرد رشد یافته یافت می‌شوند و بر خلاف سلول‌های ES می‌توانند از بافت‌های بالغ یا از بند ناف جداسازی شوند. ASCs بطور عمده به منظور حفظ هموستازی بافت و جایگزینی سلول‌های مرده یا در حال مرگ مورد استفاده قرار می‌گیرند و تنها در مناطق خاصی از بدن انسان یافت می‌شوند. متأسفانه ASCs بسیار نادرند و بنابراین جداسازی آن‌ها مشکل است. علاوه براین در اندام‌های خاصی از بدن یافت می‌شوند و بسته به موقعیت خود اعمال مختلفی دارند. به همین دلیل همه‌ی ASCs یکسان نیستند و همه‌ی آن‌ها دارای ظرفیت برابر جهت تمایز به سمت انواع سلول نمی‌باشند. انواع مختلف سلول‌های بنیادی بالغ شامل سلول‌های بنیادی خون‌ساز[۳] (HSCs)، سلول‌های بنیادی عصبی[۴] (NSCs)، سلول‌های بنیادی مزانشیمی[۵] (MSCs)، سلول‌های بنیادی پوششی[۶](ESCs)، سلول‌های بنیادی قلبی[۷](CSCs) هستند. (Martin et al., 2005).

۱-۳-۱- سلول‌های بنیادی جنینی

یک جانور در ابتدای تشکیل، حیات خود را به عنوان یک سلول بنیادی منفرد که سلول بنیادی همه توان نامیده می‌شود،آغاز می‌کند. سلول بنیادی همه توان سپس به سمت اختصاصی شدن[۸] پیش می‌رود که حاصل آن تشکیل مزودرم خارج جنینی[۹] و توده سلول داخلی[۱۰] (ICM) می‌باشد که از سلول‌های پرتوان تشکیل شده است. این سلول‌های بنیادی درجنین‌هایی که در روز چهارم یا پنجم جنینی به سر می‌برند و در یک توده‌ی توخالی از سلول‌ها که بلاستوسیست[۱۱] نامیده می‌شوند، یافت می‌گردند. بلاستوسیست از تروفوبلاست[۱۲] (لایه بیرونی جفت)، بلاستوسل[۱۳] (ناحیه تو خالی بلاستوسیست) و ICM (توده‌ای از سلول‌های داخل بلاستوسیست) تشکیل شده است (شکل ۱-۳).

1. Embryonic Stem Cell (ESCs)
2. Adult Stem Cell(ASCs)
3. Hematopoietic Stem Cell(HSCs)
4. Neural Stem Cell(NSCs)
5. Mesenchymal Stem Cell(MSCs)
6. Epithelial Stem Cell(ESCs)
7. Cardiac Stem Cell(CSCs)
8. specification
9. Extra Embyonic mesoderm
10. Inner cell mass(ICM)
11. blastocyst
12. trophoblast
13. blastocoel