

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



رساله دکترای تخصصی

رشته زیست‌شناسی گرایش سلولی و مولکولی

### عنوان

بررسی تأثیرات احتمالی رتینوئیک اسید و GDNF بر بیان برخی نشانگرهای سلول‌های

زایا در سلول‌های مشتق از مغز قرمز استخوان جوجه در شرایط *in vitro*

استادان راهنما

دکتر احمد رضا بهرامی

دکتر مریم مقدم متین

استادان مشاور

دکتر حسام دهقانی

دکتر ناصر مهدوی شهری

نگارنده

سهراب بوذرپور

اسفند ۹۲



## \* فرم ارزشیابی پایان نامه دکترا \*

نام و نام خانوادگی دانشجو : سهراب بوذرپور رشته و گرایش تحصیلی: زیست شناسی - سلولی مولکولی  
 تاریخ شروع به تحصیل : ۱۳۸۷ نام دانشکده : علوم گروه آموزشی: زیست شناسی نام و نام خانوادگی استادان راهنما : آقای دکتر احمد رضا بهرامی و خانم دکتر مریم مقدم متین

۲- مشخصات مقاله چاپ شده یا پذیرفته شده برای چاپ ( حداقل یک مقاله مستخرج از پایان نامه جهت چاپ در مجلات علمی - پژوهشی معتبر)  
 عنوان مقاله: بررسی اثر عصاره بیدانه با کتورهای رترو ویروس در مهارت تولید اسپرم در موش  
 نام مجله: دانش و پژوهش در علوم دامی محل انتشار: دانشگاه علوم پزشکی مشهد سال انتشار: ۱۳۹۲

۳- عنوان پایان نامه: مطالعه ارتباط احتمالی تاثیرات اسید رتینوئیک و *GDNF* بر بیان برخی مارکر های سلول زایا از مغز قرمز استخوان جوجه در شرایط *in vitro*

| ملاحظات | نمره کسب شده | حداکثر نمره | معیارهای ارزشیابی  |               |
|---------|--------------|-------------|--|---------------|
|         | ۲,۹۵         | ۳           | انسجام در تنظیم و تدوین مطالب ، حسن نگارش و رعایت دستورالعمل کیفیت تصاویر ، اشکال و منحنی های استفاده شده  | کیفیت نگارش   |
|         | ۱۱           | ۱۱          | بررسی تاریخچه موضوع و بیان سابقه پژوهش در موضوع ابتکار و نوآوری<br>ارزش علمی و یا کاربردی<br>استفاده از منابع و مواخذ به لحاظ کمی و کیفی (به روز بودن)<br>کیفیت نظرات و پیشنهادات برای ادامه تحصیل | کیفیت علمی    |
|         | ۳            | ۳           | تسلط به موضوع و توانایی در پاسخگویی به سوالات در جلسه دفاع<br>نحوه ارائه (رعایت زمان - تفهیم موضوع ، کیفیت ترانس پرنتی و ...)  | کیفیت ارائه   |
|         | ۱            | ۲           | کیفیت مقاله چاپ شده فوق الذکر  | مقاله         |
|         | ۱            | ۱           | اتمام به موقع دوره و تحویل گزارشها   | اتمام به موقع |
|         | ۱۱,۹۵        | ۲۰          | نمره پایان نامه  |               |

۴- اعضای هیات داوران جلسه دفاع ( ونیز نماینده شورای تحصیلات تکمیلی دانشگاه )

| ردیف | نام و نام خانوادگی        | مرتبه علمی | سمت                    | نام دانشگاه محل خدمت | امضاء |
|------|---------------------------|------------|------------------------|----------------------|-------|
| ۱    | آقای دکتر احمد رضا بهرامی | استاد      | استاد راهنمای اول      | دانشگاه فردوسی مشهد  |       |
| ۲    | خانم دکتر مریم مقدم متین  | دانشیار    | استاد راهنمای دوم      | دانشگاه فردوسی مشهد  |       |
| ۳    | آقای دکتر حسام دهقانی     | دانشیار    | استاد مشاور            | دانشگاه فردوسی مشهد  |       |
| ۴    | آقای دکتر ناصر مهدوی شهری | استاد      | استاد مشاور            | دانشگاه فردوسی مشهد  |       |
| ۵    | آقای دکتر محمدرضا باسامی  | استاد      | عضو دفاع خارجی         | دانشگاه فردوسی مشهد  |       |
| ۶    | آقای دکتر محمدرضا نصیری   | دانشیار    | عضو دفاع خارجی         | دانشگاه فردوسی مشهد  |       |
| ۷    | خانم دکتر راضیه جلال      | دانشیار    | عضو دفاع داخلی         | دانشگاه فردوسی مشهد  |       |
|      | آقای دکتر منصور مشرفی     | دانشیار    | نماینده تحصیلات تکمیلی | دانشگاه فردوسی مشهد  |       |

سمت در پایان نامه منظور استاد راهنما، استاد مشاور ، عضو دفاع داخلی ، عضو دفاع خارجی (مدعو) ، نماینده تحصیلات تکمیلی می باشد.  
 لطفاً جهت تکمیل بقیه فرم ، مصوبات شورای تحصیلات تکمیلی دانشگاه ، ارائه شده در پشت برگه ، رعایت شود.

جلسه دفاع در تاریخ ۹۲/۱۲/۲۵ با حضور هیئت داوران تشکیل و پایان نامه :

ارزشیابی شد.

مورد قبول واقع شد و با اخذ نمره حرف اعداد **۱۸,۹۵** بدارجه   
 مردود شناخته شد.

نام و نام خانوادگی مدیر گروه: **زهرا قلی**

نام و نام خانوادگی استاد راهنما : **احمد رضا بهرامی**

امضاء **زهرا قلی**  
 ۹۳۶۱۶

## تعهد نامه

اینجانب سهراب بوذرپور دانشجوی دوره دکتری تخصصی رشته زیست شناسی گرایش سلولی و مولکولی دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد نویسنده پایان نامه بررسی تاثیرات احتمالی رتینوئیک اسید و GDNF بر بیان برخی نشانگرهای سلول های زایا در سلول های مشتق از مغز قرمز استخوان جوجه در شرایط *in vitro* نام اساتید راهنما جناب آقای دکتر احمد رضا بهرامی و سرکار خانم دکتر مریم مقدم متین متعهد می شوم:

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه فردوسی مشهد می باشد و مقالات مستخرج با نام «دانشگاه فردوسی مشهد» و یا «Ferdowsi University of Mashhad» به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیر گذار بوده اند در مقالات مستخرج از رساله رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه در مواردی که از موجود زنده (یا بافت های آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاقی انسانی رعایت شده است.

تاریخ ۹۳/۱/۱۴

امضای دانشجو



### مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده) متعلق به دانشگاه فردوسی مشهد می باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

تقدیم بہ:

روح پاک پدرم کہ ہموارہ دلم برای مہربانیش تنگ می شود،  
مادر بزرگوارم کہ فداکاری اویش از فداکاری مادرانہ است و محبتش فراتر از وصف

و

خواہرم سحر، کہ مہر خواہرانہ او شیرینی زندگیم می باشد.

"و من لم يشكر المخلوق لم يشكر الخالق"

## باتقدیر و شکر از:

استاد ارجمند و بزرگوارم جناب آقای دکتر احمد رضا بهرامی که افتخار شاگردی ایشان را داشته و همواره از راهنمایی‌های مفید و دیدگاه‌ها و نظرات ارزشمند ایشان بهره‌مند بودم، کمال شکر را دارم.

استاد ارجمند و بزرگوارم سرکار خانم دکتر مریم مقدم متین که همواره از راهنمایی‌های استادانه، دلسوزانه و مادرانه ایشان استفاده نموده‌ام کمال شکر را دارم.

استاد ارجمند و بزرگوارم جناب آقای دکتر حسام دهقانی که در طول انجام پایان نامه از مشاوره‌های ایشان استفاده نمودم، بسیار متشکرم.

استاد ارجمند و بزرگوارم جناب آقای دکتر ناصر مهدوی شهری که همواره با روی باز پذیرای من بوده و به  
عموان استاد مشاور بهره‌های فراوان از مساعدت‌های ایشان بردم، تشکر فراوان دارم.

دوست عزیزم جناب آقای دکتر مجید مومنی مقدم که مانند برادری مهربان همواره در کنار من بوده و صمیمانه و  
صادقانه در فراز و نشیب این راه مرا کمک نمودند، کمال تشکر را دارم.

تمام دوستان و همکارانی که صمیمانه مراد طول انجام این پایان نامه یاری رسانند.

## فهرست مطالب

|    |   |
|----|---|
| ۱  | چکیده   |
| ۲  | فصل اول: مقدمه                                      |
| ۳  | ۱-۱ سلول های بنیادی                                 |
| ۳  | ۱-۱-۱ تاریخچه سلول های بنیادی                       |
| ۴  | ۱-۱-۲ توانایی تمایز سلول های بنیادی                 |
| ۴  | ۱-۲-۱-۱ سلول های بنیادی همه توان                    |
| ۴  | ۲-۲-۱-۱ سلول های بنیادی پر توان                     |
| ۵  | ۳-۲-۱-۱ سلول های بنیادی چند توان                    |
| ۵  | ۴-۲-۱-۱ سلول های بنیادی تک توان                     |
| ۶  | ۳-۱-۱ انواع سلول های بنیادی بر اساس منشا            |
| ۶  | ۱-۳-۱-۱ سلول های بنیادی رویانی (ES)                 |
| ۶  | ۲-۳-۱-۱ سلول های بنیادی بزرگسالان                   |
| ۷  | ۴-۱-۱ کاربرد سلول های بنیادی                        |
| ۷  | ۱-۴-۱-۱ پتانسیل های درمانی                          |
| ۷  | ۲-۴-۱-۱ تولید حیوانات تراریخت                       |
| ۸  | ۲-۱ روش های تراریخت سازی جانوران                    |
| ۸  | ۱-۲-۱ تزریق ژن مورد نظر به داخل پیش هسته            |
| ۹  | ۲-۲-۱ انتقال هسته سلول پیکری                        |
| ۹  | ۳-۲-۱ انتقال ژن خارجی به جنین توسط ویروس            |
| ۹  | ۴-۲-۱ انتقال ژن از طریق اسپرم                       |
| ۱۰ | ۵-۲-۱ استفاده از سلول های زاینده جنسی آغازین (PGCS) |
| ۱۰ | ۶-۲-۱ استفاده از سلول های بنیادی اسپرم ساز          |



- ۳-۱ تکوین سلول‌های بنیادی اسپرم ساز در طی فرآیند اسپرم زایی..... ۱۱
- ۴-۱ گنام سلول‌های بنیادی اسپرم ساز..... ۱۳
- ۴-۱-۱ نقش GDNF در بیضه پستانداران..... ۱۷
- ۴-۱-۲ گیرنده های GDNF..... ۱۷
- ۴-۱-۳ مسیرهای آبشاری که از GDNF شروع می شوند..... ۱۹
- ۴-۱-۳-۱ مسیر آبشار SRC..... ۱۹
- ۴-۱-۳-۲ مسیر آبشاری RAS..... ۲۰
- ۴-۱-۴ سایر مولکول های هدف GDNF..... ۲۱
- ۴-۱-۵ رتینوئیک اسید (RA)..... ۲۲
- ۵-۱ نشانگرهای سلول‌های بنیادی اسپرم ساز..... ۲۴
- ۵-۱-۱ STRA8..... ۲۵
- ۵-۱-۲ PLZF (ZBTB16)..... ۲۶
- ۵-۱-۳ DAZL..... ۲۶
- ۵-۱-۴ BCL6B..... ۲۷
- ۵-۱-۵ ETV5 (ERM)..... ۲۷
- ۵-۱-۶ KIT/KITL..... ۲۸
- ۵-۱-۶-۱ POU5F1 (OCT3/4)..... ۲۸
- ۶-۱ اهمیت و کاربردهای سلول‌های بنیادی اسپرم ساز..... ۲۹
- ۶-۱-۱ اهمیت سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز جوجه..... ۳۰
- ۷-۱ سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCS)..... ۳۱
- ۷-۱-۱ ویژگی های عمومی سلول‌های بنیادی مزانشیمی..... ۳۲
- ۷-۱-۲ MSCS مشتق شده از مغز قرمز استخوان (BM-MSCS)..... ۳۳
- ۷-۱-۳ مزیت های استفاده از MSCS در مقایسه با دیگر سلول‌های بنیادی..... ۳۴

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| ۳۸                             | ..... ۸-۱ ناقل های انتقال ژن                                    |
| ۳۸                             | ..... ۱-۸-۱ ناقل های لنتی ویروسی                                |
| فصل دوم: مواد و روش ها..... ۴۱ |   |
| ۴۲                             | ..... ۱-۲ تجهیزات آزمایشگاهی                                    |
| ۴۳                             | ..... ۲-۲ لیست مواد و محلول های مورد استفاده در این پژوهش       |
| ۴۳                             | ..... ۱-۲-۲ آزمایش های کشت سلول                                 |
| ۴۳                             | ..... ۱-۲-۲-۲ رده های سلولی مورد استفاده در پژوهش               |
| ۴۳                             | ..... ۲-۱-۲-۲ حیوان مورد مطالعه                                 |
| ۴۴                             | ..... ۳-۱-۲-۲ مواد مورد نیاز برای آزمایش های سلولی              |
| ۴۶                             | ..... ۴-۱-۲-۲ محیط کشت سلول ها                                  |
| ۴۶                             | ..... ۱-۴-۱-۲-۲ محیط کشت L-DMEM                                 |
| ۴۷                             | ..... ۲-۴-۱-۲-۲ محیط کشت H-DMEM                                 |
| ۴۷                             | ..... ۳-۴-۱-۲-۲ محیط کشت HAM'S F12                              |
| ۴۷                             | ..... ۴-۴-۱-۲-۲ محیط کشت DMEM/F12                               |
| ۴۸                             | ..... ۵-۱-۲-۲ طرز تهیه محلول ها و بافرهای مورد نیاز در کشت سلول |
| ۴۸                             | ..... ۱-۵-۱-۲-۲ محلول نمکی بافر فسفات (۱۰ X)                    |
| ۴۸                             | ..... ۲-۵-۱-۲-۲ محلول رنگ آمیزی OIL RED O                       |
| ۴۸                             | ..... ۳-۵-۱-۲-۲ محلول رنگ آمیزی ALIZARIN RED S                  |
| ۴۹                             | ..... ۴-۵-۱-۲-۲ محلول NBT/BCIP                                  |
| ۵۰                             | ..... ۲-۲-۲ آزمایش های شبیه سازی مولکولی و ترانس فکشن           |
| ۵۰                             | ..... ۱-۲-۲-۲ ناقل های لنتی ویروسی مورد استفاده در پژوهش        |
| ۵۰                             | ..... ۱-۱-۲-۲-۲ PLEX JRED-TURBOGFP                              |
| ۵۱                             | ..... ۲-۱-۲-۲-۲ FUM-M   |

- ۵۲.....PSPAX2 ۳-۱-۲-۲-۲
- ۵۳.....PMD2.G ۴-۱-۲-۲-۲
- ۵۴.....۲-۲-۲-۲ باکتری های مورد استفاده در پژوهش
- ۵۵.....۳-۲-۲-۲ محیط کشت باکتری
- ۵۵.....۱-۳-۲-۲-۲ محیط کشت LB مایع
- ۵۵.....۲-۳-۲-۲-۲ محیط کشت LB جامد
- ۵۶.....۴-۲-۲-۲ طرز تهیه محلول های مورد استفاده در شبیه سازی مولکولی و ترانس فکشن
- ۵۶.....(۱۰۰ MM) CACL2 ۱-۴-۲-۲-۲
- ۵۶.....۲-۴-۲-۲-۲ محلول ذخیره آنتی بیوتیک آمپی سیلین
- ۵۶.....۳-۴-۲-۲-۲ محلول HEPES (PH=۷/۳) و (۱ M)
- ۵۷.....۴-۴-۲-۲-۲ طرز تهیه بافر TE (PH=۸)
- ۵۷.....(۲/۵ M) CACL2 ۵-۴-۲-۲-۲
- ۵۷.....۶-۴-۲-۲-۲ آب بافری
- ۵۷.....۷-۴-۲-۲-۲ بافر HBSS
- ۵۹.....۳-۲-۲-۲ آزمایش های مولکولی
- ۵۹.....۱-۳-۲-۲ آغازگرها
- ۶۰.....۲-۳-۲-۲ مواد مورد نیاز برای آزمایش های مولکولی
- ۶۱.....۳-۳-۲-۲ طرز تهیه محلول ها و بافرهای مورد نیاز در آزمایش های PCR و الکتروفورز ژل آگارز
- ۶۱.....۱-۳-۳-۲-۲ روش تهیه آب تیمار شده با DEPC
- ۶۱.....۲-۳-۳-۲-۲ محلول EDTA (PH=۸ و ۰/۵ M)
- ۶۱.....۳-۳-۳-۲-۲ بافر الکتروفورز (۵۰ X) TAE
- ۶۲.....۴-۳-۳-۲-۲ بافر الکتروفورز (۵ X) TBE
- ۶۲.....۵-۳-۳-۲-۲ محلول اتیدیوم برماید (۱۰ MG/ML)

- ۳-۲-۳ مراحل انجام پژوهش به صورت گام به گام ..... ۶۳
- ۱-۳-۲ نمونه‌گیری از استخوان ران جوجه خروس ..... ۶۳
- ۱-۱-۳-۲ استخراج و کشت سلول‌های مغز قرمز استخوان ..... ۶۳
- ۲-۱-۳-۲ جداسازی و گسترش سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز قرمز استخوان جوجه ..... ۶۴
- ۳-۱-۳-۲ پاساژ و تخلیص MSCS ..... ۶۴
- ۱-۳-۱-۳-۲ روش شمارش و تعیین درصد سلول‌های زنده ..... ۶۵
- ۴-۱-۳-۲ ذخیره سلول‌ها ..... ۶۶
- ۱-۴-۱-۳-۲ انجماد سلولی ..... ۶۶
- ۲-۴-۱-۳-۲ خارج کردن از انجماد ..... ۶۷
- ۵-۱-۳-۲ آماده سازی سرم جنینی گاو (HEAT INACTIVATION) ..... ۶۷
- ۲-۳-۲ تعیین هویت MSCS ..... ۶۸
- ۱-۲-۳-۲ بررسی ریخت شناسی سلول‌ها ..... ۶۸
- ۲-۲-۳-۲ تمایز سلول‌های CMSCS به سلول‌های چربی ..... ۶۸
- ۳-۳-۳-۲ تمایز سلول‌های CMSCS به سلول‌های استخوانی ..... ۶۹
- ۱-۳-۳-۳-۲ بررسی میزان رسوب کلسیم در ماتریکس خارج سلولی ..... ۶۹
- ۲-۳-۳-۳-۲ بررسی میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز ..... ۷۰
- ۳-۳-۲ انتقال ویروس به CMSCS ..... ۷۱
- ۱-۳-۳-۲ استخراج پلاسمید در مقیاس کم توسط کیت GENEJET PLASMID MINIPREP شرکت  
THERMO SCIENTIFIC ..... ۷۱
- ۲-۳-۳-۲ مستعد کردن باکتری *E. COLI DH5A* ..... ۷۲
- ۳-۳-۳-۲ ترانسفورماسیون ..... ۷۳
- ۱-۳-۳-۳-۲ ذخیره باکتری ..... ۷۳
- ۴-۳-۳-۲ ترانس فکشن با استفاده از روش فسفات کلسیم ..... ۷۴
- ۵-۳-۳-۲ تغلیظ ویروس نو ترکیب ..... ۷۶

- ۷۶.....انتخاب سلول‌های تراریخته با آنتی بیوتیک پیورومایسین.....۳-۳-۶
- ۷۷.....تیمار سلول‌های بنیادی جوجه.....۳-۴-۲
- ۷۷.....تهیه عصاره بیضه خروس و موش.....۳-۴-۱
- ۷۷.....تیمار CMSCS با RA، GDNF، عصاره بیضه خروس و عصاره بیضه موش.....۳-۴-۲
- ۷۸.....بررسی میزان بیان نشانگرهای SSCS با روش‌های مولکولی RT-PCR و REAL-TIME PCR.....۳-۵-۲
- ۷۸.....استخراج RNA تام توسط کیت TRIPURE شرکت ROCHE.....۳-۵-۱
- ۷۹.....بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده.....۳-۵-۲
- ۷۹.....نانو درآپ.....۳-۵-۳
- ۸۰.....الکتروفورز ژل آگارز.....۳-۵-۴
- ۸۱.....عکس برداری از ژل آگارز.....۳-۵-۵
- ۸۱.....واکنش رونویسی معکوس.....۳-۵-۶
- ۸۳.....واکنش PCR.....۳-۵-۷
- ۸۴.....واکنش REAL-TIME PCR.....۳-۵-۸
- ۸۵.....بررسی بیان نشانگرهای مولکولی با روش فلوسایتومتری.....۳-۵-۹
- ۸۵.....فلوسایتومتری با رنگ آمیزی مستقیم.....۳-۵-۹-۱
- ۸۷.....تمایز CMSCS در محیط کشت سه بعدی (SACS).....۳-۶-۲

#### فصل سوم: نتایج.....۸۹

- ۹۰.....استخراج و گسترش سلول‌های بنیادی مزانشیمی جوجه مشتق از مغز قرمز استخوان.....۳-۱
- ۹۱.....تعیین هویت CMSCS.....۳-۲
- ۹۱.....ریخت شناسی.....۳-۲-۱
- ۹۱.....بررسی توان تمایزی.....۳-۲-۲
- ۹۲.....تمایز به سلول‌های چربی.....۳-۲-۱
- ۹۲.....تمایز به سلول‌های استخوانی.....۳-۲-۲

|          |   |
|----------|---|
| ۹۴.....  | ۳-۲-۳ بررسی بیان نشانگرهای سطحی ویژه سلول‌های بنیادی در CMSCS           |
| ۹۵.....  | ۳-۳ تراریخت سازی CMSCS با لنتی ویروس                                    |
| ۹۵.....  | ۱-۳-۳ ترانس فکشن سلول‌های HEK293T با ناقل های لنتی ویروسی               |
| ۹۶.....  | ۲-۳-۳ ترانس داکشن رده های سلولی با لنتی ویروس های نو ترکیب              |
| ۹۹.....  | ۳-۳-۳ تراریخت سازی CMSCS با لنتی ویروس PLEX JRED-TURBOGFP               |
| ۱۰۰..... | ۴-۳-۳ تزریق لنتی ویروس PLEX JRED-TURBOGFP به مغز قرمز استخوان جوجه      |
| ۱۰۰..... | ۵-۳-۳ تزریق CMSCS تراریخت با لنتی ویروس PLEX JRED-TURBOGFP به بیضه خروس |
| ۱۰۱..... | ۴-۳ تیمار CMSCS   |
| ۱۰۱..... | - روشهای RT-PCR و REAL-TIME PCR   |
| ۱۰۲..... | ۱-۴-۳ تیمار RA  |
| ۱۰۳..... | ۲-۴-۳ تیمار GDNF  |
| ۱۰۵..... | ۳-۴-۳ تیمار عصاره بیضه خروس   |
| ۱۰۶..... | ۴-۴-۳ تیمار عصاره بیضه موش  |
| ۱۰۷..... | ۵-۳ بررسی بیان نشانگرهای مولکولی در تیمارهای CMSCS با روش فلوسایتومتری  |
| ۱۱۰..... | ۶-۳ تیمار CMSCS در محیط کشت سه بعدی SACS                                |
| ۱۱۰..... | ۱-۶-۳ بررسی میکروسکوپی  |
| ۱۱۲..... | ۲-۶-۳ بررسی مولکولی   |

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری..... ۱۱۳

فصل پنجم: منابع..... ۱۲۵

فصل ششم: پیوست‌ها..... ۱۳۶

۱۳۷..... ABSTRACT

## فهرست اشکال

- شکل ۱-۱: انواع سلول‌های بنیادی بر اساس توان تمایزی ..... ۵
- شکل ۱-۲: سلول‌های بنیادی با منشاء رویانی ..... ۶
- شکل ۱-۳: مراحل اولیه فرآیند اسپرم زایی در پستانداران. نمای شماتیک مراحل اسپرم زایی به ویژه انواع اسپرماتوگونیای A (HOFMANN, 2008) ..... ۱۳
- شکل ۱-۴: تنظیم بیان GDNF در سلول‌های سرتولی ..... ۱۷
- شکل ۱-۵: میانکنش خانواده لیگاندهای GDNF و گیرنده هایشان ..... ۱۸
- شکل ۱-۶: پتانسیل تمایزی MSCS به رده‌های سلولی مختلف ..... ۳۶
- شکل ۱-۲: طرح شماتیک ناقل لنتی ویروسی PLEX JRED-TURBOGFP ..... ۵۰
- شکل ۲-۲: طرح شماتیک ناقل لنتی ویروسی FUM-M ..... ۵۱
- شکل ۲-۳: نقشه شماتیک ناقل بسته بندی PSPAX2 ..... ۵۲
- شکل ۲-۴: طرح شماتیک ناقل غشایی PMD2.G ..... ۵۳
- شکل ۲-۵: طرح کلی از مراحل انجام پژوهش ..... ۶۲
- شکل ۲-۶: تصویر لام نئوبار و محل شمارش سلول‌ها ..... ۶۵
- شکل ۲-۷: طرحی از ساختار سه بعدی SACS در یک چاهک پلیت ۲۴ خانه ..... ۸۸
- شکل ۳-۱: کشت اولیه CMSCS مشتق شده از مغز قرمز استخوان ..... ۹۰
- شکل ۳-۲: پاساژ دوم CMSCS مشتق از مغز قرمز استخوان ..... ۹۱
- شکل ۳-۳: بررسی توان تمایزی CMSCS به سلول‌های چربی با رنگ آمیزی OIL RED O ..... ۹۲
- شکل ۳-۴: بررسی توان تمایزی CMSCS به سلول‌های استخوانی به کمک ALIZARIN RED S ..... ۹۳
- شکل ۳-۵: بررسی توان تمایزی CMSCS به سلول‌های استخوانی با سنجش فعالیت آلکالین فسفاتازی ..... ۹۳
- شکل ۳-۶: بررسی بیان نشانگرهای SSEA3 و SSEA4 در CMSCS با روش فلوسایتومتری 2 ..... ۹۴
- شکل ۳-۷: بررسی بیان GPR125 در سطح CMSCS با روش فلوسایتومتری ..... ۹۵
- شکل ۳-۸: مشاهده سلول‌های HEK 293T با میکروسکوپ فلورسانت، ۴۸ ساعت پس از ترانس فکشن ..... ۹۶
- شکل ۳-۹: ترانس داکشن رده سلولی HEK293T توسط ویروس حاوی PLEX JRED-TURBOGFP ..... ۹۷

- شکل ۳-۱۰: تراریخت سازی رده های سلولی با ویروس نو ترکیب PLEX JRED-TURBOGFP..... ۹۸
- شکل ۳-۱۱: تراریخت سازی رده های سلولی با ویروس نو ترکیب FUM-M..... ۹۹
- شکل ۳-۱۲: تراریخت سازی رده های سلولی با ویروس نو ترکیب PLEX JRED-TURBOGFP..... ۱۰۰
- شکل ۳-۱۳: بررسی بیان ژن ها در CMSCS پس از تیمار با RA به روش RT-PCR..... ۱۰۲
- شکل ۳-۱۴: بررسی بیان ژن SPRY1 در CMSCS تیمار شده با RA به روش REAL-TIME PCR..... ۱۰۳
- شکل ۳-۱۵: بررسی بیان ژن ها در CMSCS پس از تیمار با GDNF به روش RT-PCR..... ۱۰۴
- شکل ۳-۱۶: بررسی بیان ژن SPRY1 در CMSCS تیمار شده با GDNF در روش REAL-TIME PCR..... ۱۰۵
- شکل ۳-۱۷: بررسی بیان ژن ها در CMSCS تیمار شده با عصاره بیضه خروس توسط روش RT-PCR... ۱۰۶
- شکل ۳-۱۸: بررسی بیان ژنها در CMSCS تیمار شده با عصاره بیضه موش توسط روش RT-PCR..... ۱۰۷
- شکل ۳-۱۹: بررسی بیان نشانگر TRA-1-60 در روز ۷ تیمار CMSCS با RA و GDNF با روش  
فلوسایتومتری ..... ۱۰۸
- شکل ۳-۲۰: بررسی بیان نشانگر TRA-1-81 در روز ۷ تیمار CMSCS با RA و GDNF با روش  
فلوسایتومتری ..... ۱۰۹
- شکل ۳-۲۱: بررسی ریختشناسی CMSCS پس از کشت در SACS و تیمار با عصاره بیضه خروس. .... ۱۱۱
- شکل ۳-۲۲: بررسی ریخت شناسی CMSCS پس از کشت در SACS و تیمار با RA..... ۱۱۲

#### فهرست جداول

- جدول ۲-۱: تجهیزات لازم برای انجام پژوهش..... ۴۲
- جدول ۲-۲: انواع رده های سلولی استفاده شده..... ۴۳
- جدول ۲-۳: مواد مورد نیاز برای جراحی جوجه خروس..... ۴۴
- جدول ۲-۴: مواد مورد نیاز برای کشت سلول ها..... ۴۴
- جدول ۲-۵: مواد مورد نیاز جهت تعیین هویت و تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی..... ۴۵
- جدول ۲-۶: مواد مورد نیاز در روش فلوسایتومتری..... ۴۵
- جدول ۲-۷: مواد مورد نیاز در آزمایش های بافت شناسی (تهیه لام)..... ۴۶
- جدول ۲-۸: مواد مورد نیاز برای آزمایش های شبیه سازی مولکولی و انتقال ژن ..... ۵۴



جدول ۲-۹: آغازگرهای طراحی شده جهت بررسی بیان ژن‌های مرتبط با سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز  
جوجه با روش RT-PCR ..... ۵۹

جدول ۲-۱۰: مواد مورد نیاز برای آزمایش‌های RT-PCR، REAL-TIME PCR و الکتروفورز. .... ۶۰

جدول ۲-۱۱: مواد القائی و غلظت نهایی مورد استفاده در تمایز CMSCS ..... ۷۷

#### فهرست پیوست‌ها

پیوست ۶-۱: منحنی دمای ذوب قطعات حاصل از تکثیر ژن‌های *SPRY1* و *B-ACTIN* در واکنش REAL  
TIME-PCR ..... ۱۳۷

## چکیده

قابلیت پر توانی سلول‌های بنیادی اسپرم ساز (SSCs)، موجب شده است که توجه دانشمندان بیش از پیش به این سلول‌ها جلب گردد، به طوری که هر روز ابعاد جدیدی از کاربرد آن‌ها مشخص می‌شود. سلول‌های بنیادی مزانشیمی (cMSCs) یکی از معدود منابعی هستند که تاکنون برای تمایز به این سلول‌ها استفاده شده‌اند. در این پژوهش cMSCs به دست آمده از مغز قرمز استخوان جوجه با RA، GDNF و عصاره بیضه خروس و موش در شرایط آزمایشگاهی به مدت ۱۴ روز تیمار شدند. بیان نشانگرهای سلول‌های زایا در سلول‌های حاصل از تیمار با RA، GDNF و عصاره بیضه خروس پس از ۷ روز، با روش RT-PCR نشان داده شد. در صورتیکه تیمار سلول‌ها با عصاره بیضه موش باعث القاء بیان هیچ‌کدام از ژن‌های سلول‌های زایا در این سلول‌ها نشد. سلول‌های حاصل از تیمار cMSCs با GDNF در مقایسه با تیمار RA، علاوه بر نشانگرهای سلول‌های زایا، نشانگرهای خودنوزایی *POU5F1* و *NANOG* را نیز بیان کردند. بعلاوه سلول‌های تیمار شده با RA و GDNF به ترتیب حدود ۲۰ و ۴۰ درصد افزایش در بیان نشانگرهای TRA-1-60 و TRA-1-81 نسبت به سلول‌های تیمار نشده را نشان دادند که مبین تمایز این سلول‌ها به سلول‌های شبه زایا می‌باشد. همچنین تیمار cMSCs با عصاره بیضه خروس در محیط سه بُعدی SACS، باعث ایجاد سلول‌هایی با ریخت شناسی شبیه سلول‌های زایا در چرخه اسپرم‌زایی گردید.

# فصل اول

## مقدمه





## ۱- سلول‌های بنیادی

### ۱-۱-۱ تاریخچه سلول‌های بنیادی

در سال ۱۸۶۸، یک زیست‌شناس آلمانی بنام ارنست هکل از واژه stammzelle برای توصیف اجداد موجودات تک‌سلولی استفاده نمود. با این وجود واژه "stem cell" اولین بار بیش از یک قرن پیش به معنای خودنوزایی برای توصیف اسپرماتوگونیا در بیضه بکار گرفته شده است (Ramalho-Santos and Willenbring, 2007). در سال ۱۹۸۱ دانشمندان موفق به جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی جنینی موش از توده سلولی داخلی<sup>۱</sup> (ICM)، در شرایط *in vitro* شدند و کلمه سلول‌های بنیادی رویانی<sup>۲</sup> برای اولین بار به کار برده شد (Martin, 1981). با ادامه تحقیقات در این زمینه، جیمز تامسون و همکارانش در سال ۱۹۹۸ برای اولین بار موفق به استخراج و کشت دادن سلول‌های بنیادی جنینی انسانی شدند (Thomson *et al.*, 1998). با این وجود، به دلیل حساسیت‌های اخلاقی در استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی، پژوهشگران به دنبال یافتن منابع جدیدتری برای جایگزین کردن این سلول‌ها بوده‌اند (Yamanaka *et al.*, 2008). این تلاش‌ها از یافتن سلول‌های بنیادی بزرگسالان<sup>۳</sup> در دندان‌های شیری کودکان، خون بندناف و مایع آمنیوتیک آغاز شد و در نهایت، منجر به شناسایی سلول‌های بنیادی در اکثر بافت‌های بدن گردید. با وجود تحقیقات و دست‌آوردهای مهمی که تا آن زمان بدست آمده بود، با تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القائی<sup>۴</sup> (iPS) در سال ۲۰۰۶ فصل جدیدی در پژوهش‌های سلول‌های بنیادی آغاز گردید (Takahashi and Yamanaka, 2006).

<sup>1</sup> Inner cell mass

<sup>2</sup> Embryonic stem cells (ES)

<sup>3</sup> Adult Stem cell

<sup>4</sup> Induced Pluripotent stem cells