بسم الله الرحمن الرحیم

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 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.

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 تشریح** است که در سال **۱۳۸۸** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **سرکار خانم دکتر منصوره موحدین** و مشاوره **جناب آقای دکتر مهدی فروزنده مقدم** 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 ماکولاتی** دانشجوی رشته **علوم تشریح** مقطع دکتری تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضا

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D) در رشته علوم تشریح

عنوان

تولید سلولهای زایای مذکر از سلولهای بنیادی جنینی موش پس از هم-کشتی و یا افزودن BMP4 در محیط کشت و پیوند به بیضه موش بالغ مدل آزوسپرمی

نگارش

زهره ماکولاتی

استاد راهنما

دکتر منصوره موحدین

استاد مشاور

دکتر مهدی فروزنده مقدم

پائیز ۱۳۸۸

تشکر و قدردانی

" من علمنی حرفا فقد صیرنی عبدا "

حضرت علی

(ع)

سپاس بی کران به درگاه پاک وکبریایی حضرت احدیت که جهانی این چنین بزرگ آفرید ودر کوچکترین اجزای آن جهانی دیگر خلق کرد و انسان را سرآمد مخلوقات خود قرار داد و به او توفیق گام نهادن در وادی کسب معرفت و شناخت عالم بی انتهایش را عطا فرمود.

تقدیم به روح پاک پدر **بزرگوارم که مشوق اصلی‌ام در گام نهادن در راه علم بود. روحش شاد**

تقدیر از مادر **مهربانم، اسوه صبر و فداکاری و امید زندگیم. فرشته‌ای که من امروز به واسطه‌ی وجود اوست که پیام نسیم را می‌شنوم و عطرش را حس می کنم.**

تقدیر از علیرضا و رسول، **برادران عزیزم که با محبت بی‌انتهای خویش، خالصانه و بی‌ریا عشقشان را نثارم کردند و یاریم نمودند.**

تقدیر و تشکر بی انتها از مهدی‌ام **، همسر بسیار عزیزم که قدم به قدم در تمام مراحل این پژوهش همراه و همدلم بود و با صبر، متانت، محبت بی دریغ و سخنان دل نشین، سختیهای این راه را برایم هموار نمود.**

و تقدیر از خانواده محترم همسرم و همه عزیزانی که مرا در این راه یاری کردند و تشکر بسیار از همه بزرگوارانی که در این مسیر کمک نموده اند و اگر در این مجال اندک نام انها نیامده، شرمگین آنها خواهم بود.

ومن، این پایان نامه را تقدیم می کنم به عزیزترین کسانم تا شاید بتوانم بدین طریق از محبتهای بی دریغشان تشکر کنم.

سپاس و قدردانی از استاد راهنمای ارجمندم سرکار خانم دکتر منصوره موحدین **که به پاس زحمات بی‌دریغ و راهـــــنمایـــی های مشفقانه و تعالیم مفیدشان، که همواره روشنگر راهم بوده مرا در تهیه این رساله یاری دادند و در طول دوران تحصیلم از حسن خلق، صداقت، تفکر در کارها و فروتنی ایشان بهره گرفتم.**

سپاس و تشکر از استاد محترم جناب آقای دکتر مهدی فروزنده مقدم **که زحمت مشاوره این رساله را به عهده گرفتند و راهنمایی های ایشان سهم بسزایی در به ثمر رسیدن این رساله داشت.**

تقدیر و تشکر خالصانه از کلیه اساتید بزرگوارم سرکار خانم دکتر مژده صالح نیا، جناب آقای دکتر مجتبی رضازاده ولوجردی و جناب آقای دکتر تقی طریحی **که در دوران تحصیل افتخار شاگردی ایشان را داشتم .**

با سپاس از تمامی هم کلاسی های خوبم ***جناب آقای دکتر کاکا جناب آقای دکتر عابدالهی جناب آقای دکتر غریبانی و جناب آقای دکتر پیریایی*** *که محبت‌های شان را هیچ گاه فراموش نخواهم کرد.*

با سپاس از همراهان خوب و دوستان بسیار عزیزم در تمامی این سالها خانم ها ***دکتر فاطمه پیغمبری، زهرا دهقانی، سعیده ابراهیمی، زهره مظاهری، مومنه محمدی، اعظم انارکی، فروزان آبسالان، حمیده آقاجانی، حمیده کلهر و*** آقایان ***شهرام پوربیرانوند، محسن مسلم ، سعید زواره، هادی حسن زاده و دکترمجید نقدی***

با سپاس از ***آقای محمدلو****. و کلیه دانشجویان عزیز گروه علوم تشریح*

و با سپاس از تمامی کسانی که لطافت لبخندشان مرا در این راه همراهی کرد.

چکیده

مقدمه: تمایز سلول زایا از سلول‌های بنیادی جنینی در محیط In vitro روش جدیدی را برای مطالعه تکامل سلول زایا فراهم کرده است. در مطالعه حاضر، سلول‌های زایای تمایز یافته از سلول بنیادی جنینی به بیضه موش بالغ مدل آزوسپرمی تیمار شده با بوسولفان پیوند زده شد و نقش این سلول‌ها در فرآیند اسپرماتوژنز بررسی شد.

مواد و روشها: واکنش ایمونوسیتوشیمی OCT4 جهت تایید حالت غیرتمایزی و واکنش PCR ژن SRY برای تعیین جنسیت سلول بنیادی جنینی موشی رده CCE انجام شد. همچنین، تاثیر غلظت‌های مختلف BMP4 (۰، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ ng/ml) بر میزان بقا و تکثیر سلول‌های بنیادی جنینی مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌های بنیادی جنینی به مدت ۱ روز جهت تشکیل اجسام شبه جنینی (مرحله اول القای سلول زایا) و سپس به مدت ۴ روز در سیستم همکشتی با سلول‌های STO و سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش و سیستم کشت ساده در حضور و غیاب ۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر BMP4 جهت القای تمایز سلول‌های زایای بدوی کشت داده شد (مرحله دوم القای سلول زایا). به منظور تکثیر و غنی‌سازی سلول‌های زایای بدوی، سلول‌های زایای تمایز یافته از سلول‌های بنیادی جنینی کشت داده شده در سیستم کشت ساده حاوی ۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر BMP4، به مدت ۷ روز در حضور غلظت‌های مختلف اسید رتینوئیک (۰-۵ میکرومولار) در سیستم کشت ساده و سیستم همکشتی با سلول‌های STO کشت داده شد (مرحله سوم القای سلول زایا). جهت القای تمایز سلول بنیادی اسپرماتوگونی از سلول‌های زایای بدوی، سلول‌های تمایز یافته از سیستم هم‌کشتی با سلول‌های STO دارای غلظت ۳ میکرومولار اسید رتینوئیک به مدت ۲ روز بر روی لایه تغذیه کننده سلول‌های سرتولی و در حضور و عدم حضور ترکیب سه فاکتور LIF، bFGF و اسید رتینوئیک و نیز در سیستم کشت ساده حاوی سه ترکیب فوق کشت داده شد (مرحله چهارم القای سلول زایا). در مرحله بعد، کارآیی سیستم هم-کشتی با سلول‌های سرتولی و سیستم کشت ساده به مدت ۲ هفته در تکثیر و غنی‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بررسی شد (مرحله پنجم القای سلول زایا). در انتهای تمامی مراحل فوق، بیان ژن‌های Mvh، α6 integrin، β1 integrin، Stra8 و Piwil2 با روش PCR کمی اندازه‌گیری شد. به‌علاوه، در انتهای مراحل ۱-۴، میزان بقا و تکثیر اندازه‌گیری شد و اثرات القایی سیتوکین-های مختلف با استفاده از واکنش‌های ایمونوسیتوشیمی Mvh که مارکر اختصاصی برای سلول‌های زایای بدوی و CDH1 که مارکر اختصاصی برای سلول‌های اسپرماتوگونی است در گروه‌های منتخب هر مرحله و گروه‌های کنترل مربوطه مورد ارزیابی قرار گرفت. در انتها سلول‌های حاصل از تمایز در انتهای مرحله ۴ به بیضه موش بالغ مدل آزوسپرمی تیمار شده با بوسولفان پیوند زده شد.

یافته‌ها: حالت غیرتمایزی و جنسیت XY این رده سلولی تایید شد. نتایج دوزیابی نشان داد که BMP4 با غلظت ۵ ng/ml تاثیرات بهتری بر میزان بقا و تکثیر این رده سلولی داشته است. بیان تمامی ژن‌های مورد بررسی در اجسام شبه جنینی نسبت به سلول بنیادی جنینی افزایش یافته و این افزایش در مورد ژن‌های Mvh، Stra8 و Piwil2 معنی‌دار بود. در انتهای مرحله دوم، میزان بقا و تکثیر افزایش معنی‌داری را در دو سیستم کشت ساده فاقد و دارای BMP4 ۵ ng/ml نشان داد. به‌علاوه، نتایج PCR و ایمونوسیتوشیمی نشان داد که بیشترین میزان بیان mRNA و پروتئین Mvh مربوط به سیستم کشت ساده دارای BMP4 بوده است. در مرحله سوم، بیشترین میزان بقا و تکثیر در سیستم کشت ساده فاقد اسید رتینوئیک مشاهده شد. نتایج PCR و ایمونوسیتوشیمی این مرحله نشان داد که بیشترین میزان بیان mRNA و پروتئین Mvh در سیستم هم‌کشتی با سلول‌های STO دارای غلظت ۳ میکرومولار اسید رتینوئیک می‌باشد. در مرحله چهارم، بیشترین میزان بقا و تکثیر و بیشترین میزان بیان ژن‌های Mvh، Stra8، Piwil2 و α6 integrin در سیستم هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی دارای ترکیب سه فاکتور LIF ۱۰۰۰u/ml، bFGF ۱ng/ml و۲μM اسید رتینوئیک مشاهده شد. نتایج ایمونوسیتوشیمی نیز نشان داد که بیان پروتئین CDH1 در گروه مذکور به صورت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل سیستم هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی بیشتر بوده است. سیستم‌های کشت مرحله پنجم نیز تاثیری در غنی‌سازی سلول‌های اسپرماتوگونی نداشت. به‌علاوه، پیوند سلول‌های مرحله چهارم پس از۸ هفته نشان داد که سلول‌های پیوندی در قاعده لوله‌های منی‌ساز جای‌گیری نموده‌اند. تعداد سول‌های اسپرماتوگونی در گروه پیوندی به صورت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل بیشتر بود.

نتیجه‌گیری: نتایج تایید می‌کند که افزودن BMP4 ۵ ng/ml در محیط کشت ساده در القای تمایز سلول زایای بدوی موثر است. به‌علاوه، غلظت ۳ μM اسید رتینوئیک در سیستم هم‌کشتی با سلول‌های STO در غنی‌سازی سلول زایای بدوی و سیستم هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی دارای فاکتورهای LIF، bFGF و اسید رتینوئیک در تمایز سلول‌اسپرماتوگونی از سلول زایای بدوی نقش دارد. پیوند این سلول‌ها در موش مدل آزوسپرمی منجر به ایجاد نتایج بهتری در تعداد اسپرماتوگونی گردید.

واژگان کلیدی: سلول بنیادی جنینی، BMP4، اسید رتینوئیک، LIF، bFGF، سلول زایا، هم‌کشتی

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱. مقدمه ۲

۱-۲. اسپرم زایی ۴

۱-۳. چرخه زندگی سلولهای زایای موش در محیط In vivo ۵

۱-۴. مارکرهای مولکولی سلول‌های زایای بدوی و سلول‌های زایای جنینی ۷

۱-۵. اختلال در فرآیند اسپرم زایی و ناباروری ۹

۱-۶. طرح ریزی سیستم های In vitro جهت تولید سلول زایا از سلول های بنیادی ۱۰

۱-۷. سلول های بنیادی جنینی ۱۱

۱-۷-۱. **مشخصات سلول های بنیادی جنینی** ۱۱

۱-۷-۲. تکثیر و نگهداری سلول‌های بنیادی جنینی ۱۱

۱-۷-۳. کاربرد سلول‌های بنیادی جنینی ۱۲

۱-۷-۴. سلول های بنیادی جنینی رده CCE ۱۳

۱-۸. تمایز سلول های بنیادی جنینی موشی به سلول های زایا در محیط کشت وعوامل مؤثر برآن ۱۳

۱-۹. پیوند سلول های بنیادی اسپرماتوگونی ۲۲

۱-۱۰. **اهداف اساسی این پژوهش** ۲۳

۱-۱۱. سوالات اصلی پژوهش ۲۳

۱-۱۲. **فرضیات اصلی پژوهش** ۲۴

فصل دوم: مواد و روشها ۲۵

۲-۱. سلول‌های بنیادی جنینی ۲۶

۲-۲. محلول‌های مورد نیاز جهت کشت سلول ۲۶

۲-۲-۱. ژلاتین ۰/۱٪ ۲۶

۲-۲-۲. بافرنمکی PBS فاقد کلسیم / منیزیم ۲۶

۲-۲-۳. محلول تریپسین – EDTA ۲۶
۲-۲-۴. رنگ تریپان بلو ۲۷
۲-۲-۵. محیط کشت DMEM ۲۷
۲-۳. *کشت سلول* ۲۸
۲-۳-۱. رده سلولی ۲۸
۲-۳-۲. پایداری/ نگهداری ۲۸
۲-۳-۳. طرز تهیه ظروف کشت ژلاتینه ۲۸
۲-۳-۴. نگهداری و تکثیر سلول های بنیادی جنینی ۲۹
۲-۳-۵. پاساژ سلول های بنیادی جنینی ۲۹
۲-۳-۶. انجماد سلول های بنیادی جنینی ۳۰
۲-۳-۷. مراحل ذوب کردن سلول های بنیادی جنینی ۳۱
۲-۳-۸. شمارش سلولی ۳۲
۲-۴. بررسی میزان حفظ بقا و تزاید سلولی پس از تاثیر BMP4 بر سلول‌های زنده با استفاده از تست سمیت ۳۲
۲-۵. *تمایز سلول های بنیادی* ۳۴
۲-۵-۱. فاکتورهای رشد و لایه های تغذیه کننده مورد استفاده در فرایند تمایز ۳۴
۲-۵-۱-۱. تهیه و آماده سازی فاکتورهای رشد ۳۴
۲-۵-۱-۱-۱. تهیه استوک BMP_4 ..... ۳۴
۲-۵-۱-۱-۲. تهیه استوک اسید رتینوئیک ۳۵
۲-۵-۱-۲. تهیه لایه سلولی تغذیه کننده ۳۵
۲-۵-۱-۲-۱. روش تهیه لایه‌های سلولی تغذیه کننده ۳۵
۲-۵-۱-۲-۱-۱. تهیه فیبروبلاستهای اولیه جنینی (MEFs) ۳۵
۲-۵-۱-۲-۱-۲. تهیه لایه سلولی تغذیه کننده از سلولهای سرتولی ۳۷
۲-۵-۱-۲-۲. غیر فعال کردن لایه پشتیبان ۴۰
۲-۵-۲. مراحل متوالی کشت درگروه های تیمار شده با فاکتورهای رشد مختلف و گروه های کنترل در حضور و عدم حضور لایه های تغذیه کننده ۴۰

۲-۵-۲-۱. کشت سلولهای بنیادی جنینی (مرحله اول کشت) ۴۰
۲-۵-۲-۲. تولید اجسام شبه جنینی ۱روزه (مرحله دوم کشت) ۴۱
۲-۵-۲-۳. کشت درگروه های تیمار شده با BMP4 و گروه های کنترل در حضورو عدم حضور لایه های تغذیه کننده سلول‌های STO و فیبروبلاست جنینی اولیه (مرحله سوم کشت) ۴۱
۲-۵-۲-۴. کشت درگروه های تیمار شده با اسید رتینوئیک و گروه های کنترل در حضور و عدم حضور لایه تغذیه کننده سلول‌های STO (مرحله چهارم کشت) ۴۲
۲-۵-۲-۵. کشت درگروه های تیمار شده با ترکیب سه فاکتور اسید رتینوئیک، LIF و bFGF و گروه‌های کنترل در حضورو عدم حضور لایه تغذیه کننده سلول‌های سرتولی (مرحله پنجم کشت) ۴۲
۲-۵-۲-۶. کشت در حضورو عدم حضور لایه تغذیه کننده سلول‌های سرتولی (مرحله ششم کشت) ۴۳
۲-۶. انواع روشهای بررسی در این تحقیق ۴۴
۲-۶-۱. *بررسی میزان حفظ بقا و تزاید سلولی* ۴۴
۲-۶-۲. *بررسی مولکولی* ۴۴
۲-۶-۲-۱. مقدمات کار با RNA ۴۴
۲-۶-۲-۲. استخراج RNA کل ۴۶
۲-۶-۲-۳. بررسی RNA استخراج شده ۴۷
۲-۶-۲-۳-۱. *اسپکتروفتومتری UV* ۴۸
۲-۶-۲-۳-۲. *الکتروفورز ژل آگارز* ۴۹
۲-۶-۲-۳-۲-۱. آماده‌سازی تجهیزات جهت الکتروفورز RNA ۴۹
۲-۶-۲-۴. تیمار RNA با DNase ۵۲
۲-۶-۲-۵. ساخت cDNA ۵۳
۲-۶-۲-۶. واکنش PCR ۵۵
۲-۶-۲-۶-۱. طراحی پرایمر ۵۵
۲-۶-۲-۶-۲. آماده سازی پرایمرها ۵۵
۲-۶-۲-۷. بیان کمی ژن‌ها ۵۷
۲-۶-۳. بررسی ایمونوسیتوشیمی و ایمونوهیستوشیمی ۵۹

۲-۶-۳-۱. **رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی و ایمونوهیستوشیمی** ۵۹
۲-۶-۳-۲. **مواد و محلول های مورد نیاز برای انجام تکنیک ایمونوسیتوشیمی و ایمونوهیستوشیمی** ۵۹
۲-۶-۳-۳. نحوه رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی ۶۰
۲-۶-۳-۴. نحوه رنگ‌آمیزی ایمونوهیستو شیمی ۶۴
۲-۷. *بررسی* In vivo ۶۴
۲-۷-۱. **آماده سازی موش‌های گیرنده** ۶۴
۲-۷-۳. مرحله پیوند ۶۵
۲-۷-۴. نمونه‌برداری ۶۶
۲-۸. **بررسی آماری** ۷۰

فصل سوم: نتایج ۷۱
۳-۱. تایید ماهیت پرتوانی سلول‌های بنیادی جنینی رده CCE ۷۲
۳-۱-۱. بررسی بیان پروتئین OCT4 در سلول‌های بنیادی جنینی رده CCE ۷۲
۳-۲. تعیین جنسیت سلول‌های بنیادی جنینی رده CCE ۷۳
۳-۳. بررسی میزان حفظ بقا و تزاید سلولی پس از قرار گرفتن سلول‌ها در معرض غلظت‌های مختلف BMP4 ..... ۷۴
۳-۳-۱. تاثیر غلظت‌های مختلف BMP4 بر تؤایی سلولی سلول‌های CCE ۷۵
۳-۳-۲. تاثیر غلظت های مختلف BMP4 بر میزان حفظ بقای سلولی در سلول های CCE ۷۶
۳-۴. بررسی میزان حفظ بقا و تزاید سلولی در مراحل مختلف کشت ۷۸
۳-۴-۱. میزان حفظ بقا و تزاید سلولی در انتهای مرحله سوم کشت ۷۸
۳-۴-۲. میزان حفظ بقا و تزاید سلولی در پایان مرحله چهارم کشت ۷۸
۳-۴-۳. میزان حفظ بقا و تزاید سلولی در انتهای مرحله پنجم کشت ۸۰
۳-۵. بررسی کمی میزان بیان ژن های Mvh (VASA)، α6 integrin، β1 integrin، Stra8 و Piwil2 در مراحل مختلف کشت ۸۰
۳-۵-۱. بررسی بیان ژن ها در سلول های بنیادی جنینی رده CCE (مرحله اول کشت) ۸۵
۳-۵-۲. بررسی بیان ژن ها دراجسام شبه جنینی یک روزه (مرحله دوم کشت) ۸۶

۳-۵-۳. بررسی بیان ژن‌ها پس از۴ روز کشت درگروه‌های تیمار شده با BMP4 و گروه‌های کنترل در حضورو عدم حضور لایه‌های تغذیه کننده STO و فیبروبلاست (مرحله سوم کشت)..... ۸۶

۳-۵-۴. بررسی بیان ژن‌ها پس از ۷ روز کشت درگروه‌های تیمار شده با اسید رتینوئیک و گروه‌های کنترل در حضورو عدم حضور لایه تغذیه کننده STO (مرحله چهارم کشت)..... ۹۰

۳-۵-۵. 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 (مرحله پنجم کشت)..... ۹۵

۳-۵-۶. بررسی بیان ژن ها پس از دو هفته هم کشتی در حضورو عدم حضور لایه تغذیه کننده سرتولی (مرحله ششم کشت)..... ۹۹

۳-۶. بررسی نتایج واکنش های ایمونوسیتوشیمی ۱۰۲

۳-۶-۱. بررسی بیان پروتئین CDH1 در مراحل مختلف کشت..... ۱۰۳

۳-۶-۲. بررسی بیان پروتئین Mvh در مراحل مختلف کشت ۱۰۵

۳-۷. پیوند سلول های کشت شده و ارزیابی موفقیت پیوند ۱۰۸

۳-۷-۱. ردیابی سلول های پیوندی و رده‌های سلولی حاصل از آنها..... ۱۰۸

۳-۷-۲. بررسی و مقایسه وزن بیضه و تعداد اسپرم اپیدیدیم در گروه پیوندی و کنترل ۱۰۹

۳-۷-۳. بررسی بافت شناسی برشهای بیضه در گروه های پیوندی..... ۱۱۰

فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۱۱۲

۴-۱. **تایید ماهیت پرتوانی سلول‌های بنیادی جنینی رده CCE**..... ۱۱۳

۴-۲. **تعیین دوز مناسب BMP4 جهت تولید سلول زایا از سلول‌های بنیادی جنینی** ۱۱۴

۴-۳. بررسی بیان ژن‌ها و پروتئین‌های درگیر در تمایز سلول‌های زایا در سلول‌های بنیادی جنینی و اجسام شبه جنینی یک روزه ۱۱۵

۴-۴. بررسی تاثیر افزودن BMP4 و استفاده از سیستم‌های هم کشتی در تمایز سلول‌های زایا ۱۱۸

۴-۵. بررسی نقش RA و سیستم هم کشتی با سلول‌های STO در تکثیر و غنی سازی سلول‌های زایای بدوی..... ۱۲۲

۴-۶. بررسی تاثیر استفاده از ترکیب سه فاکتور LIF، bFGF و RA و سیستم هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی در القای سلول‌های اسپرماتوگونی از سلول‌های زایای بدوی ۱۲۴

۴-۷. بررسی تاثیر استفاده از سیستم هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی در تکثیر و غنی سازی سلول‌های اسپرماتوگونی ۱۲۶
۴-۸. بررسی پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال تمایز یافته از سلول‌های بنیادی جنینی به بیضه موش بالغ مدل آزوسپرمی ۱۲۸
۴-۹. نتیجه گیری نهایی ۱۳۱
۴-۹-۱. نتیجه گیری نهایی در بخش کشت سلول ۱۳۱
۴-۹-۲. نتیجه گیری نهایی در بخش پیوند ۱۳۱
۴-۱۰. پیشنهادات برای ادامه کار ۱۳۲

فهرست منابع ۱۳۳
چکیده انگلیسی ۱۴۹

فهرست جداول

جدول ۲-۱. ویژگی‌های پرایمرهای اختصاصی بکار رفته ۵۸

جدول ۳-۱. تأثیر غلظت های مختلف BMP4 بر میزان تزاید سلولی و میزان حفظ بقای سلول های CCE ۷۴

جدول ۳-۲. مقایسه درصد سلول‌های زنده و میزان تزاید سلولی پس از ۴ روز کشت در گروه‌های مختلف مرحله سوم کشت ۷۸

جدول ۳-۳. مقایسه درصد سلول‌های زنده و میزان تزاید سلولی پس از ۷ روز کشت در گروه‌های مختلف مرحله چهارم کشت..... ۷۹

جدول ۳-۴. مقایسه درصد سلولهای زنده و میزان تزاید سلولی پس از ۲ روز کشت در گروههای مختلف مرحله پنجم کشت ۸۰

فهرست شکل‌ها

شکل ۳-۱. واکنش ایمونوسیتوشیمی مثبت برای آنتی‌بادی OCT4 در سلول‌های بنیادی جنینی رده CCE، بار = 30µM ۷۲

شکل ۳-۲. ژل الکتروفورز بیان ژن‌های Mvh، α6 integrin (Igα6)، β1 integrin (Igβ1)، Stra8، Piwil2، Sry، β2m و β-actin پس از RT-PCR در گروه کنترل ۷۳
شکل ۳-۳. واکنش ایمونوسیتوشیمی مثبت برای آنتی‌بادی سیتوکراتین در سلول‌های سرتولی ۱۰۲
شکل ۳-۴. آزمون ایمونوسیتوشیمی CDH1 ..... ۱۰۴
شکل ۳-۵. آزمون ایمونوسیتوشیمی Mvh ۱۰۷
شکل ۳-۶. پیوند سلول های کشت شده و ارزیابی موفقیت پیوند ۱۰۹

فهرست نمودارها

نمودار ۳-۱. A: منحنی Melt و B: منحنی استاندارد ژن Sry پس از Real-Time PCR درگروه کنترل ۷۳
نمودار ۳-۲. A: منحنی Melt و B: منحنی استاندارد ژن Mvh پس از Real-Time PCR درگروه کنترل ۸۱
نمودار ۳-۳. A: منحنی Melt و B: منحنی استاندارد ژن α6 integrin پس از Real-Time PCR درگروه کنترل... ۸۲

نمودار ۳-۴. A: منحنی Melt و B: منحنی استاندارد ژن β1 integrin پس از Real-Time PCR درگروه کنترل .. ۸۲
نمودار ۳-۵. A: منحنی Melt و B: منحنی استاندارد ژن Stra8 پس از Real-Time PCR درگروه کنترل ۸۳
نمودار ۳-۶. A: منحنی Melt و B: منحنی استاندارد ژن Piwil2 پس از Real-Time PCR درگروه کنترل..... ۸۳
نمودار ۳-۷. A: منحنی Melt و B: منحنی استاندارد ژن β2m پس از Real-Time PCR در گروه کنترل..... ۸۴
نمودار ۳-۸. A : منحنی Melt و B: منحنی استاندارد ژن β-actin پس از Real-Time PCR در گروه کنترل..... ۸۴
نمودار ۳-۹. الگوی بیان ژن‌های Mvh، α6 integrin، β1 integrin، Stra8 و Piwil2 در سلول‌های بنیادی جنینی (ESC) و اجسام شبه جنینی یک روزه (1-day-old EB) ۸۵
نمودار ۳-۱۰. میزان افزایش بیان ژن‌های Mvh، α6 integrin، β1 integrin، Stra8 و Piwil2 نسبت به اجسام شبه جنینی یک روزه پس از ۴ روز کشت در گروه‌های مورد مطالعه مرحله سوم کشت ۸۹
نمودار ۳-۱۱. میزان افزایش بیان ژن Mvh نسبت به SCB (Simple Culture with BMP4) پس از ۷ روز کشت در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۰ تا ۵ میکرومولار اسید رتینوئیک (0-5 µM RA) و سیستم هم‌کشتی با سلول‌های STO دارای غلظت‌های ۰ تا ۵ میکرومولار اسید رتینوئیک (0-5 µM RA + STO Co-C).. ۹۱
نمودار ۳-۱۲. A میزان افزایش بیان ژن α6 integrin نسبت به SCB (Simple Culture with BMP4) پس از ۷ روز کشت در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۰ تا ۵ میکرومولار اسید رتینوئیک (0-5 µM RA) و سیستم هم-کشتی با سلول‌های STO دارای غلظت‌های ۰ تا ۵ میکرومولار اسید رتینوئیک (0-5 µM RA + STO Co-C)..... ۹۲
نمودار ۳-۱۳. میزان افزایش بیان ژن β1 integrin نسبت به SCB (Simple Culture with BMP4) پس از ۷ روز کشت در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۰ تا ۵ میکرومولار اسید رتینوئیک (0-5 µM RA) و سیستم هم-کشتی با سلول‌های STO دارای غلظت‌های ۰ تا ۵ میکرومولار اسید رتینوئیک (0-5 µM RA + STO Co-C)..... ۹۳
نمودار ۳-۱۴. میزان افزایش بیان ژنStra8 نسبت به SCB (Simple Culture with BMP4) پس از ۷ روز کشت در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۰ تا ۵ میکرومولار اسید رتینوئیک (0-5 µM RA) و سیستم هم‌کشتی با سلول‌های STO دارای غلظت‌های ۰ تا ۵ میکرومولار اسید رتینوئیک (0-5 µM RA + STO Co-C). ۶۵ ۹۴
نمودار ۳-۱۵. میزان افزایش بیان ژن Piwil2 نسبت به SCB (Simple Culture with BMP4) پس از ۷ روز کشت در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۰ تا ۵ میکرومولار اسید رتینوئیک (0-5 µM RA) و سیستم هم‌کشتی با سلول‌های STO دارای غلظت‌های ۰ تا ۵ میکرومولار اسید رتینوئیک (0-5 µM RA + STO Co-C). ۹۵
نمودار ۳-۱۶. میزان افزایش بیان ژن‌های Mvh، α6 integrin، β1 integrin، Stra8 و Piwil2 نسبت به سیستم

هم‌کشتی با سلول‌های STO دارای غلظت۳ میکرومولار اسید رتینوئیک (3 μM RA + STO Co-C) پس از ۲ روز کشت در گروه تیمار شده با bFGF، LIF، RA (اسید رتینوئیک)، گروه هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی (Sertoli Co-C) وگروه هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی دارای bFGF، LIF ، RA (اسید رتینوئیک)..... ۹۸

نمودار ۳-۱۷. میزان افزایش بیان ژن‌های Mvh، α6 integrin، β1 integrin، Stra8 و Piwil2 نسبت به سیستم هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی دارای bFGF، LIF ، RA (اسید رتینوئیک) (LIF, bFGF, RA + Sertoli Co-C) پس از ۲ هفته کشت ۱۰۱

نمودار ۳-۱۸. آزمون ایمونوسیتوشیمی CDH1 در سلول‌های بنیادی جنینی (ESC)، اجسام شبه جنینی یک روزه (1-day-old EB)، سلول‌های تیمار نشده (SC)، سلول‌های تیمار شده با BMP4 (SCB)، سیستم هم‌کشتی با سلول-های STO (STO Co-C)، سیستم هم‌کشتی با سلول‌های STO دارای ۳ میکرومولار اسید رتینوئیک (3μM RA + STO Co-C)، سیستم هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی (Sertoli Co-C) و سیستم هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی دارای LIF، bFGF و اسید رتینوئیک (LIF,bFGF,RA + Sertoli Co-C). ۱۰۵

نمودار ۳-۱۹. آزمون ایمونوسیتوشیمی Mvh در سلول‌های بنیادی جنینی (ESC)، اجسام شبه جنینی یک روزه (1-day-old EB)، سلول‌های تیمار نشده (SC)، سلول‌های تیمار شده با BMP4 (SCB)، سیستم هم‌کشتی با سلول-های STO (STO Co-C)، سیستم هم‌کشتی با سلول‌های STO دارای ۳ میکرومولار اسید رتینوئیک (3μM RA + STO Co-C)، سیستم هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی (Sertoli Co-C) و سیستم هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی دارای LIF، bFGF و اسید رتینوئیک (LIF,bFGF,RA + Sertoli Co-C). ۱۰۶

نمودار ۳-۲۰. میانگین تعداد اسپرم شمارش شده در واحد حجم (ml) در اپیدیدیم گروه‌های مختلف. ۱۱۰

نمودار ۳-۲۱. تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید در لوله‌های منی‌ساز گروه‌های کنترل و آزمایش در واحد حجم (mm^3) ۱۱۱

فصل اول

مقدمه و
مروری بر
مطالعات گذشته

۱-۱- مقدمه

سلول‌های زایا[1] جمعیت سلولی بسیار تخصص‌یافته‌ای هستند که جهت ادامه و تکامل گونه لازم می باشند. این سلول‌ها حاصل تمایز جمعیتی از سلول‌ها به نام سلول‌های زایای بدوی می‌باشند که در شرایط درون بدن[2] از سلول‌های اپی‌بلاست ایجاد می‌شوند [۱]. امروزه با افزایش نازایی و کاهش اهداکنندگان گامت ایجاد راهی جهت تولید یک منبع از سلول‌های جنسی جهت انجام تحقیقات بسیار باارزش می‌باشد [۲]. در سالهای اخیر چندین گزارش مبنی بر تمایز سلول‌های بنیادی جنینی موش به سلول‌های زایا [۳-۱۹] ارائه شده است. سلول‌های بنیادی جنینی از توده سلولی داخلی بلاستوسیست مشتق می‌شوند. این سلول‌ها دارای ۲ ویژگی عمده هستند: ۱- توانایی خودسازی به صورت نامحدود در محیط کشت[3] ۲- توانایی تمایز[4] به انواع مختلف سلول‌ها. پتانسیل تمایز قوی سلول‌های بنیادی جنینی سبب تولید یک وسیله یگانه برای تولید انواع مختلف سلول‌ها می گردد که در طب درمانی بسیار باارزش می‌باشد. نکته قابل توجه و مهم در مطالعات In vitro جهت تولید گامت از سلول‌های بنیادی جنینی این است که تعدادی از مارکرهای سلول‌های زایای بدوی دقیقا مشابه با سلول‌های بنیادی جنینی می‌باشند [۲۰، ۲۱]. بنابراین تشخیص بین سلول‌های زایای بدوی و سلول‌های بنیادی جنینی مشکل است. از این رو به منظور تشخیص سلول‌های زایا در محیط In vitro بیشتر از مارکرهایی استفاده می شود که در سلول های زایا از مرحله پس مهاجری تا مرحله میوزی بیان می‌شوند. همچنین از عملکرد سلول‌های زایا نظیر تولید یک موجود زنده نیز برای این منظور می‌توان استفاده نمود [۲۲].

کشت سلول‌های بنیادی جنینی در محیط In vitro منجر به تمایز این سلول‌ها بـه انـواع مختلفـی از سلول‌ها می‌گردد. اما مهمترین قسمت در بدست آوردن یک سلول خاص از سلول‌های بنیـادی شـامل ایجاد شرایط کشت مناسب، تشخیص و خالص سازی سلول های تمایز یافته می‌باشـد. اگرچـه توانـایی

[1] Germ cells
[2] In vivo
[3] Self-renewal
[4] Differentiation