

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه پیام نور

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته علوم جانوری

دانشکده پیام نور مرکز تهران

گروه علمی زیست شناسی

عنوان پایان نامه :

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز

استخوان جوجه و تمایز آنها به سلولهای پیوندی

استاد راهنما :

آقای دکتر مهدی کدیور

استاد مشاور:

خانم دکتر مینا رمضانی

نگارش:

فاطمه پیریانی

بهمن ماه سال 1388

تقدیم به

پدرم

که آرام جان است

و

مادرم

که بزرگترین سنبل آفرینش پرورگار

و

تمامی کسانی که دوستشان دارم...

حرفی برای سپاس و ستایش

واژه ای نمی یابم تا عشق عزیزان و سپاس قلبی ام را گزاره ای باشد. با وجود آن اندکی از آنچه را در دل دارم به رسم قدر شناسی در قالب کلماتی باز می گویم:

- سپاس دارم از استاد ارجمند جناب آقای دکتر مهدی کدیور به عنوان استاد راهنما که در انجام این رساله از بزرگواری ها و راهنمایی ارزشمندشان برخوردار بوده ام.

- از سرکار خانم دکتر مینا رضانی که مشاور این پایان نامه بودند و با لطف و کمک بی منتشان یاریم نمودند، نهایت تشکر و قدردانی را دارم.

- از مدیر محترم گروه زیست شناسی خانم دکتر سیما نصری کمال تشکر را دارم.

- از همکاری صمیمانه گروه بیوشیمی انستیتو پاستور ایران که در انجام این تحقیق نهایت همکاری را داشته اند تشکر و قدردانی می کنم.

- از زحمات دلسوزانه کارشناس محترم گروه زیست شناسی سرکار خانم مرادی بسیار متشکرم.

- از دوستان خوب خانم ها الهه تکیه، ندا معماری و ساره راستی پیشه که یادشان همواره ستاره باران خاطراتم خواهد بود سپاسگزارم.

- همچنین از خانواده مهربانم که در تمام دوران تحصیل حامی و پشتیبانم بوده اند، نهایت سپاس و تشکر را دارم و از خداوند منان برایشان سلامتی آرزومندم.

چکیده

مقدمه و هدف: سلولهای بنیادی مزانشیمی سلولهای بنیادی بالغی هستند که توانایی تمایز به بسیاری از سلولها را دارند و از این نظر در مطالعات پیش بالینی اهمیت دارند. هدف مطالعه حاضر، جدا سازی سلولهای بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان جوجه و اثبات توانایی تمایز این سلول ها است. این سلول ها می توانند برای استفاده در مطالعات مرتبط با مهندسی بافت و ژن درمانی در نظر گرفته شوند.

مواد و روش ها: این پژوهش، از مغز استخوان جوجه های سالم نژاد Raf در سن 3، 5، 10، 15، 20، 25 روزه استفاده شد. به منظور کشت سلولهای بنیادی مزانشیمی، با عمل فلاشینگ، مغز استخوان ران و درشت نی جدا شد. سپس سلول ها کشت شده و بعد از تکثیر سلولی، بخشی از آنها به منظور نگهداری در ازت مایع، منجمد شد. برای اثبات اینکه سلول های استحصال شده، سلولهای بنیادی مزانشیمی هستند، تمایز سلول ها به سه رده استخوان، غضروف و چربی انجام شد. برای آنالیز هیستولوژیکی، رنگ آمیزی اختصاصی سلول ها صورت گرفت.

یافته ها: مغز استخوان جوجه، یک منبع بالقوه از سلول های بنیادی بالغ می باشد. در مقایسه ی تراکم مغز استخوان جوجه، جدا شده از جوجه های نژاد گوشتی در سنین 3 تا 25 روزه مشخص شد که بهترین منبع برای جدا سازی، جوجه های 15 روزه است. سلول های بنیادی به دست آمده از مغز استخوان جوجه، قادر به تمایز به سلول های استئوسیت، کندروسیت و آدیپوسیت بودند.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه برای اولین بار نشان می دهد که سلول های بنیادی مغز استخوان جوجه، به علت تمایز، استحصال آسان، کم هزینه بودن و بدون محدودیت اخلاقی، می توانند به عنوان یک منبع با ارزش سلولهای بنیادی مزانشیمی پیشنهاد شوند.

واژه های کلیدی: سلولهای بنیادی، سلولهای بنیادی مزانشیمی، تمایز سلولی، جوجه

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول : مقدمه و مروری بر مطالعات انجام شده	
1-1-1- تعریف سلولهای بنیادی.....	2
1-2-1- ویژگی های منحصر به فرد سلول های بنیادی.....	2
1-3-1- انواع سلول های بنیادی بر مبنای قدرت تکثیر و قابلیت تمایز.....	5
1-3-1-1- سلول های بنیادی همه توان.....	5
1-3-1-2- سلول های بنیادی پر توان.....	7
1-3-1-3- سلول های بنیادی چند توان.....	8
1-3-1-4- سلول های بنیادی تک توان.....	9
1-4-1- انواع سلول های بنیادی بر اساس محل حضورشان در بافت ها و زمان جداسازی (قبل یا بعد از تولد).....	10
1-4-1-1- سلول های بنیادی بند ناف یا نوزادی.....	12
1-4-1-1-1- سلول های بنیادی خونساز بند ناف HSCs.....	13
1-4-1-1-1-1- ایمونوفنوتیپ های سلول های HSCs در خون بند ناف.....	16
1-4-1-1-2- تفاوت های عملکردی بین سلول های بنیادی خون ساز در خون بند ناف و مغزاستخوان.....	19
1-4-1-2-1- سلول های بنیادی مزانشیمی خون بند ناف MSCs.....	20
1-4-1-3-1- تاریخچه سلول های بنیادی بند ناف.....	23
1-4-1-4-1- کاربردهای درمانی و تجربی سلول های بنیادی بند ناف.....	25
1-4-1-5-1- مزیت استفاده از سلول های بنیادی بند ناف.....	26
1-4-2-1- سلول های بنیادی جنینی.....	27
1-4-2-1-1- سلول های بنیادی جنینی بر اساس پتانسیل تمایزی در زمان جداسازی از بلاستوسیست به چند گروه تقسیم می شوند.....	29
1-4-2-2-1- منابع سلول های بنیادی جنینی.....	30

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
30	1-4-2-3-تاریخچه سلول های بنیادی جنینی.....
32	1-4-2-4- محدودیت های کاربرد سلول های بنیادی جنینی.....
32	1-4-2-5-مهم ترین کاربرد های سلول های بنیادی جنینی.....
34	1-4-2-6- سلول های بنیادی جنسی.....
36	1-4-3-سلول بنیادی بالغ.....
40	1-4-3-1-پلاستیسیته سلول های بنیادی بالغ.....
42	1-4-3-2-سلول های بنیادی سیستم عصبی.....
44	1-4-3-3-سلول های بنیادی بالغ در بافت چربی.....
45	1-4-3-4-سلول های بنیادی پیش ساز اپیتلیال در پوست و سیستم گوارش.....
47	1-4-3-5-سلول های بنیادی آندوتلیال.....
47	1-4-3-6-سلول های بنیادی ماهیچه اسکلتی.....
49	1-4-3-7-سلول های بنیادی خون محیطی.....
49	1-4-4-سلول های بنیادی مغز استخوان.....
49	1-4-4-1-ساختمان مغز استخوان.....
51	1-4-4-1-1- سلول بنیادی خون ساز مغز استخوان.....
57	1-4-4-2-1-سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان MSCS.....
60	1-4-4-2-2-ایمونوفنوتیپ سلول های بنیادی مزانشیمی.....
63	1-4-4-3-تاریخچه سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان.....
64	1-4-5-ضرورت تحقیق و پژوهش در خصوص سلول های بنیادی چیست؟.....

فصل دوم: مواد و روش ها

75	2-1- حیوانات آزمایشگاهی مورد مطالعه.....
75	2-2- وسائل، دستگاهها و مواد مورد نیاز.....
76	2-3- محیط کشت.....

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
77	2-3-1- طرز تهیه محیط کشت.....
78	2-4- سرم.....
78	2-5- محلول ها و بافر های مورد استفاده.....
79	2-6- محیط القا کننده تمایز.....
79	2-6-1- محیط القا کننده آدیپوسیت.....
79	2-6-2- محیط القا کننده استئوژنیک.....
80	2-6-3- محیط القا کننده کندروسیت.....
80	2-7- محلول های رنگ آمیزی مورد استفاده.....
80	2-7-1- محلول رنگ آمیزی اوایل رد.....
80	2-7-2- محلول رنگ آمیزی آلیزارین رد اس.....
80	2-7-3- محلول رنگ آمیزی تولوئیدین بلو.....
81	2-8- مراحل انجام تحقیق.....
81	2-8-1- آماده کردن ظروف کشت یاخته.....
82	2-8-2- جدا سازی سلول های مغزاستخوان جوجه.....
82	2-8-3- کشت و تکثیر سلولی.....
83	2-8-3-1- تعویض محیط کشت.....
83	2-8-3-2- پاساژ سلولی.....
84	2-8-3-3- انجماد سلولی.....
84	2-8-3-4- ذوب سلولی.....
85	2-8-3-5- شمارش سلول.....
85	2-9- تعیین هویت سلول ها بر اساس پتانسیل تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به دودمان های مزانشیمی.....
85	2-9-1- تمایز به سمت استئوسیت.....

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
86	2-9-2- تمایز به سمت آدیپوسیت.....
86	2-9-3- تمایز به سمت کندروسیت.....
86	2-10-10- ارزیابی تمایز سلول های مزانشیمی بنیادی به دودمان های مزانشیمی.....
86	2-10-1- ارزیابی تمایز استئوسیت.....
87	2-10-2- ارزیابی تمایز آدیپوسیت.....
87	2-10-3- ارزیابی تمایز کندروژنیک.....
87	2-11- بررسی اثر سن جوجه نژاد Raf بر میزان جدا سازی سلول های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان.....
88	2-12- آنالیز آماری.....
فصل 3- نتایج	
90	3-1- نتایج مشاهدات مورفولوژی کشت جوجه های نژاد گوشتی (Raf).....
92	3-2- نتایج تست های تمایزی.....
92	3-2-1- تمایز به استئوسیت.....
94	3-2-2- تمایز به آدیپوسیت.....
97	3-2-3- تمایز به کندروسیت.....
98	3-3- نتایج تأثیر سن جوجه در میزان سلول های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از مغز استخوان.....
فصل 4- بحث، نتیجه گیری و پیشنهادات	
101	4-1- بحث.....
107	4-2- نتیجه گیری.....
107	4-3- پیشنهادات.....

فهرست شکل ها

عنوان	صفحه
شکل 1-1.نمایش قابلیت تمایز سلول های بنیادی به انواع سلول های بدن.....	4
شکل 1-2.نمایش سلول های بنیادی همه توان در جنین 16 سلولی.....	6
شکل 1-3. نمایش سلول های بنیادی پر توان.....	7
شکل 1-4.نمایش سلول های بنیادی چند توان.....	8
شکل 1-5.نمایش سلول های بنیادی تک توان در بافتهای بالغ بدن.....	9
شکل 1-6. نمایی از انواع سلول های بنیادی بر اساس محل حضورشان در بافت ها و زمان جداسازی(قبل یا بعد از تولد).....	11
شکل 1-7.نمایش سلول های بنیادی بند ناف.....	12
شکل 1-8.نمایش شماتیک از بلاستوسیست.....	28
شکل 1-9.نمایش کشت سلول های بلاستوسیست.....	29
شکل 1-10. نمایش کشت سلول های بنیادی جنینی.....	31
شکل 1-11.نمایش دارو درمانی با سلول های بنیادی.....	33
شکل 1-12.نمایش سلول های بنیادی جنسی.....	35
شکل 1-13.نمایش جایگاه سلولهای بنیادی در بافتهای بالغ.....	37
شکل 1-14.نمایی از سلول های بنیادی بالغ.....	39
شکل 1-15. نمایی از plasticity در سلولهای بنیادی بزرگسالان.....	41
شکل 1-16. سلول های بنیادی سیستم عصبی.....	44
شکل 1-17.ساختمان پوست و جایگاه سلول های بنیادی در پوست.....	46
شکل 1-18. نمایی از ساختمان درونی مغز استخوان.....	50
شکل 1-19. ارتباط بین سلول های استخوانی و سلول های بنیادی خون ساز در مغز استخوان.....	51
شکل 1-20. شمایی از مراحل خون سازی.....	54
شکل 1-21.نمایش بافت مزانشیم استخوان.....	58
شکل 1-22.نمایش درمان بیماری ها با سلول های بنیادی.....	66
شکل 1-23.تبدیل سلول بنیادی به انواع سلول ها.....	67

فهرست شکل ها

عنوان	صفحه
شکل 1-24. نمایش سلول بنیادی درمانی در بیماری های خاص.....	68
شکل 1-25. شکل استفاده از سلول های بنیادی در زمینه های مختلف.....	70
شکل 1-26. نمایی از شبیه سازی با استفاده از سلول های بنیادی.....	71
شکل 1-2: جداسازی سلولها از مغز استخوان جوجه به روش فلاشینگ.....	82
شکل 1-3: A) سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان جوجه نژاد Raf , 3 روز بعد از کشت.....	90
شکل 1-3: B) سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان جوجه نژاد Raf , 7 روز بعد از کشت.....	91
شکل 1-3: C) سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان جوجه نژاد Raf , 2 هفته بعد از کشت.....	91
شکل 1-3: D) پاساژ 3 سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان جوجه نژاد Raf.....	92
شکل 1-2-3: A) سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان جوجه 5 روز پس از اضافه کردن مواد القاکنند تمایز به استخوان.....	93
شکل 1-2-3: B) تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان جوجه نژاد Raf به استخوان که به مدت 21 روز در معرض محیط تمایز به استخوان قرار گرفته اند و با آلیزارین رد رنگ آمیزی شده اند.....	93
شکل 1-2-3: C) سلولهای کنترل منفی که به مدت 21 روز در محیط فاقد القا قرار داشتند.....	94
شکل 1-2-3: A) سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان جوجه 21 روز پس از اضافه کردن مواد القا کننده تمایز به چربی.....	95
شکل 1-2-3: B) سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان جوجه نژاد Raf , 21 روز پس از اضافه کردن مواد القا کننده تمایز به چربی.....	95

فهرست شکل ها

عنوان	صفحه
شکل 3-2-2-C) سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان جوجه نژاد Raf که به مدت 21 روز در معرض محیط تمایز به چربی قرار گرفته اند و با اوایل رد رنگ آمیزی شده اند.....96	96
شکل 3-2-2-D) سلولهای کنترل منفی که به مدت 21 روز در محیط فاقد القا قرار داشتند.....96	96
شکل 3-2-3-A) تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان جوجه نژاد Raf به غضروف که به مدت 21 روز در معرض مواد تمایز به غضروف قرار گرفته اند و با تولوئیدن بلو رنگ آمیزی شده اند.....97	97
شکل 3-2-3-B) سلولهای کنترل منفی که به مدت 21 روز در محیط فاقد القا قرار داشتند.....98	98

فهرست جداول

صفحه	عنوان
15.....	جدول 1-1: مقایسه بین انواع سلول های خونساز در خون بند ناف و مغز استخوان.....
18.....	جدول 1-2: انواع آنتی ژن های سطحی سلول های $CD34^+$ موجود در بند ناف.....
21.....	جدول 1-3: ایمونوفنوتیپ های سلول های بنیادی مزانشیمی کشت داده شده در آزمایشگاه.....
55	جدول 1-4: مقایسه نشانگرهای سطحی سلول های بنیادی خونساز در انسان و موش.....
61.....	جدول 1-5: مهم ترین آنتی ژن ها و سایتوکاین های سلول های بنیادی مزانشیمی.....

فهرست نمودار

صفحه	عنوان
99.....	نمودار 3-1: تأثیر سن جوجه های Raf در بازده سلول های بنیادی مشتق از مغز استخوان.....

فصل اول

مقدمه و مروری بر مطالعات انجام
شده

1-1- تعریف سلولهای بنیادی

سلول بنیادی¹، نوعی سلول سوماتیک تمایز نیافته است که می تواند در محیط کشت به طور نامحدودی تکثیر یابد و این توانایی تکثیر و بازسازی² خود را برای دوره ای نامحدود، در تمام مدت طول زندگی حفظ کند (Chaple, 2003). همچنین می تواند به سلول های تخصص یافته تبدیل شود و تحت شرایط خاص و حضور سیگنالهای مشخص و یا وجود فاکتور های رشد و سایتوکاین های ویژه قادر است به انواع سلول های سازنده بدن موجود زنده تمایز یابد (Dasilva, 2006).

از سلول های بنیادی می توان در تولید سلول و نهایتاً بافت های مختلف در بدن موجود زنده استفاده کرد زیرا سلول های بنیادی چند پتانسیلی هستند. یعنی قابلیت تبدیل به بافت های مختلف را دارند از جمله بافت عضلانی، پوششی، قلبی، عصبی و غیره که این توانایی محور اصلی توجه به سلولهای بنیادی است (Eslaminejad, 2006) (شکل 1-1).

برخلاف یک سلول معمولی که با تکثیر شدن فقط قادر است چندین سلول از نوع خود را به وجود آورد، سلول بنیادی همه منظوره و بسیار توانمند است و وقتی تقسیم شود، در شرایط خاص می تواند به هر یک از انواع سلول ها در بدن تبدیل شود.

1-2- ویژگی های منحصر به فرد سلول های بنیادی

سلول های بنیادی، متفاوت از تمام انواع سلول های بدنی هستند. از مهم ترین ویژگی های این سلول ها که سبب متمایز شدن آن ها از سایر سلول های سوماتیکی دیگر بدن می شوند عبارتند از :

1- این سلول ها قادرند تحت تقسیمات مکرر و یکسان که شرط لازم برای حمایت و نگهداری جمعیت سلول های بنیادی است، به طور پیوسته سلول های دختری مشابه خود را ایجاد کنند به این مفهوم که

¹ -Stem cell

² -Self-renewal

خاصیت تکثیر³ و بازسازی دارند (Fuchs, 2004) .

2- سلول های دختری حاصل از تقسیمات مکرر یک سلول بنیادی توانایی لازم برای تولید انواع پیش سازهای سلول های بالغ را دارند به این مفهوم که خاصیت گسترش⁴ دارند (Frisbie, 2006) .

3- قادرند به انواع مختلف سلول های تمایز یافته تبدیل شوند به طور مثال سلول های بنیادی عصبی قادر به تولید سلول های استروسیت و الیگودندریت بوده و یا سلول بنیادی جنینی قادر به تولید اووسیت می باشد و یا سلول بنیادی خونساز⁵ قادر است انواع سلول های خونی را تولید کند و یا سلول بنیادی مزانشیمی مغز استخوان توانایی تولید انواع سلول های بافت مزانشیمی از جمله فیبروبلاست، کندروسیت، استئوسیت و آدیپوسیت را داراست (Abboud, 1992, Sanchez, 2006) .

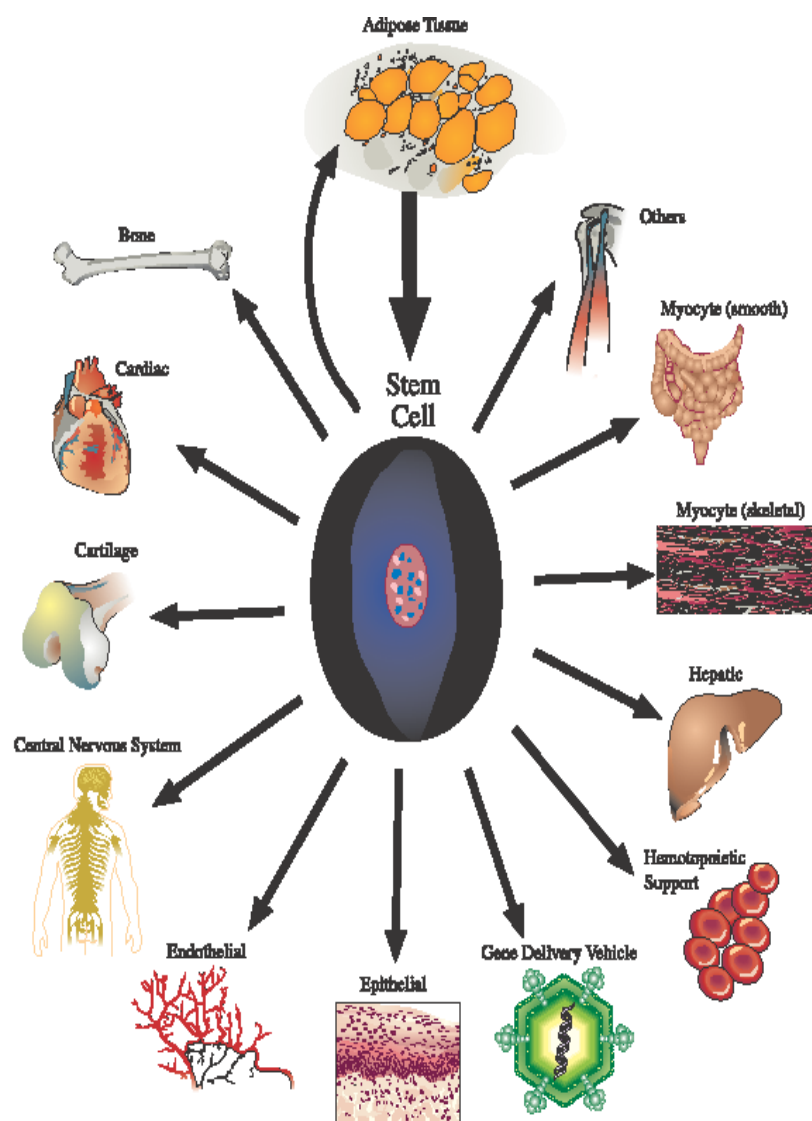
4- خاصیت ترمیمی و تکثیر در بافت های آسیب دیده از دیگر ویژگی های این سلول ها ست، به طوری که وقتی این سلول ها به یک بافت آسیب دیده پیوند شوند یک جمعیت سلولی تولید کرده که نقش ترمیمی دارند به عنوان مثال سلول های بنیادی خونساز اخیراً برای ترمیم سلول های کبدی در بیماران مبتلا به عارضه کبدی مورد استفاده قرار گرفته است و از این نظر این سلول ها برای درمان بیماری های مختلف از جمله ضایعات قلبی، مغزی، نخاعی و غیره... قابل توجه است و این مهمترین عمل سلول های بنیادی در بافت های بالغ محسوب می شود (Wang, 2003) .

به طور کلی قابلیت خونسازی، تکثیر طولانی و قدرت تمایز به حداقل یک نوع سلول بالغ از ویژگی های منحصر به فرد این سلول هاست (Fallah, 2006) .

³- Proliferation

⁴-Expantion

⁵-Hematopoetic stem Cells (HSCs)



شکل 1-1: نمایش قابلیت تمایز سلول های بنیادی به انواع سلول های بدن (www.nature.com).

1-3-1- انواع سلول های بنیادی بر مبنای قدرت تکثیر و قابلیت تمایز

قابلیت تمایز سلول های بنیادی به رفتار این سلول ها در بدن موجود زنده یا بعد از پیوند به بدن یک موجود زنده و تحت شرایط آزمایشگاهی خاص بستگی دارد.

بر این اساس سلول های بنیادی را می توان به 4 نوع سلول همه توان، پرتوان، چند توان و تک توان تقسیم کرد (Gronthos, 2005).

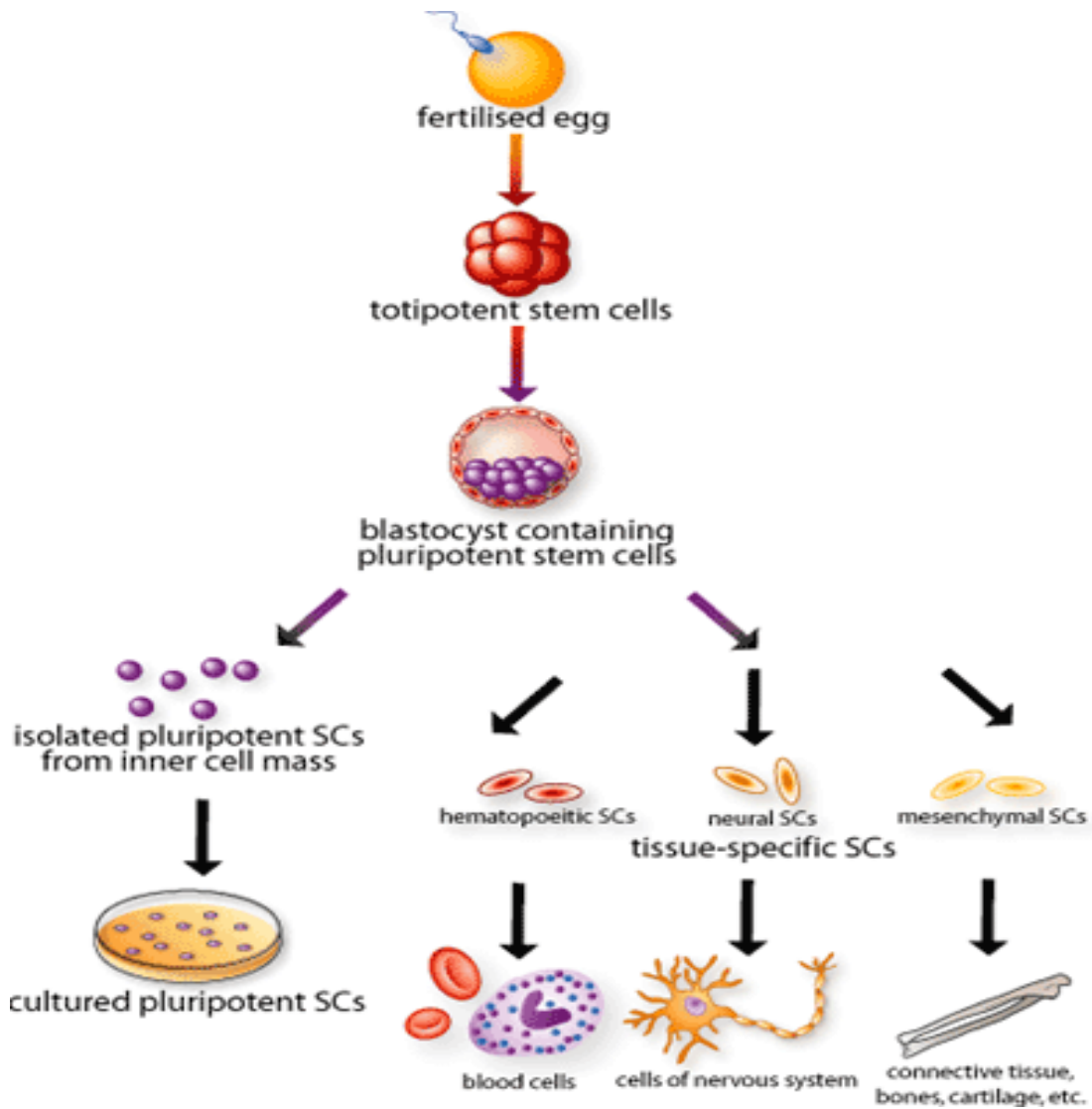
1-3-1-1- سلول های بنیادی همه توان⁶

واژه Totipotent از واژه لاتین "Totus" به معنی کامل برگرفته شده است. یک سلول بنیادی در صورتی همه توان نامیده می شود که قابلیت تولید همه سلول ها و بافت های سازنده جنین، سلول ها و بافت های حمایت کننده رشد جنین در داخل رحم را داشته باشد (Odorico, 2001).

به عنوان مثال تخمک لقاح یافته (سلول تخم) یک سلول بنیادی همه توان می باشد، زیرا با تقسیم و تمایز می تواند یک موجود زنده بالغ را ایجاد نماید که شامل بیش از 200 نوع سلول می باشد. سلول های تولید شده در تقسیمات تخمک بارور شده نیز همه توان هستند (Lil, 2005).

سلول های بنیادی همه توان دارای قدرت تکثیر فوق العاده بالایی بوده و قادرند سلول های سازنده پرده های جنینی و تمام انواع سلولی موجود در یک بدن کامل را بسازند که این ویژگی مربوط به جنین 1-3 روزه یعنی تا مرحله 16 سلولی نیز می باشد (Watt, 2000) (شکل 1-2).

⁶- Totipotent



شکل 1-2: نمایش سلول های بنیادی همه توان در جنین 16 سلولی (www.stem cells.nih.gov).