بسم الله الرحمن الرحيم

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از
پایان‌نامه کارشناسی ارشد

خانم **فاطمه محمد علی** رشته **خون شناسی آزمایشگاهی و بانک خون** پایان‌نامه **کارشناسی ارشد** خود را با عنوان « **بررسی اثر آگونیست و آنتاگونیست بتا آدرنرژیک در تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان به استئوبلاست در شرایط آزمایشگاهی** » در تاریخ **۱۳۹۲/۶/۱۳** ارائه کردند.

بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنند.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

دکتر سعید آبرون (استاد راهنما)

دکتر مسعود سلیمانی (استاد مشاور)

دکتر مهین نیکوگفتار (استاد ناظر)

دکتر امیر آتشی (استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی)

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 دانشجو 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، نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) 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 آئین نامه های مصوب انجام شود.

ماده ٤- 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 ٥- این آیین‌نامه در ٥ ماده و یک تبصره در تاریخ۸۷/٤/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/٤/۲۳ 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.

«اینجانب فاطمه محمدعلی دانشجوی رشته علوم شناختی گرایش روانشناسی ورودی سال تحصیلی ۹۰
مقطع کارشناسی ارشد دانشکده پزشکی متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آئین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آئین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هر گونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله بر اساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هر گونه اعتراض را از خود سلب نمودم»

امضا:.....

تاریخ: ۹۲/۶/۲۸

آیین نامه چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (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 پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد/ رساله دکتری نگارنده در رشته خون‌شناسی و بانک خون آزمایشگاهی است که در سال شهریور ۹۲ در دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی سرکار خانم/جناب آقای دکتر سعید اکبرون ، مشاوره سرکار خانم/جناب آقای دکتر مسعود سلیمانی و مشاوره سرکار خانم/جناب آقای دکتر — از آن دفاع شده است.»

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت‌چاپ) را به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر درمعرض فروش قرار دهد.

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت‌مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت 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 فاطمه محمدعلی دانشجوی رشته خون‌شناسی و بانک خون آزمایشگاهی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق وضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: فاطمه محمدعلی

تاریخ و امضا: ۹۲/۶/۲۸

پایان نامه دوره ی کارشناسی ارشد در رشته ی خونشناسی آزمایشگاهی و بانک خون

عنوان:

بررسی اثر آگونیست و آنتاگونیست بتا آدرنرژیک در تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان به استئوبلاست در شرایط آزمایشگاهی

نگارش:

فاطمه محمدعلی

استاد راهنما:

دکتر سعید آبرون

استاد مشاور:

دکتر مسعود سلیمانی

شهریور ۱۳۹۲

این پایان نامه را در کمال افتخار و امتنان تقدیم می کنم به :

محضر ارزشمند پدر و مادر عزیزم به خاطر همه تلاشهای محبت آمیزی که در دوران مختلف زندگی ام انجام داده اند . والدینی که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر بودنم، چرا که این دو وجود، پس از پروردگار ، مایه هستی ام بوده اند دستم را گرفتند و راه رفتن را در این وادی زندگی پر از فراز و نشیب آموختند. آموزگارانی که برایم زندگی، بودن و انسان بودن را معنا کردند....

خواهران مهربانم که همواره همراه و همگام من بوده اند.

و استادان فرزانه و فرهیخته ای که در راه کسب علم و معرفت مرا یاری نمودند.

تشکر و قدردانی :

خداوند را شاکرم که این توفیق را نصیبم ساخت تا این پایان نامه را با موفقیت به اتمام برسانم.

از استاد فاضل و اندیشمند جناب آقای دکتر آبرون به عنوان استاد راهنما , که همواره بنده را مورد لطف و محبت خود قرار دادند و با حسن خلق از هیچ کمکی در این عرصه به من دریغ ننمودند ,کمال تشکر و سپاس را دارم و به وجودشان افتخار می کنم.

از استاد با کمالات و شایسته جناب آقای دکتر سلیمانی , مدیریت محترم گروه که زحمت مشاوره این پایان نامه را در حالی متقبل شدند که بدون مساعدت ایشان این پروژه به نتیجه مطلوب نمی رسید کمال تشکر رادارم.

از استاد فرزانه و دلسوز جناب آقای دکتر آتشی , که زحمت داوری این پایان نامه را متقبل شدند و در طول مدت انجام این تحقیق همواره از راهنمایی های بی دریغ ایشان بهره گرفتم کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از اساتید محترم, جناب آقای دکتر کاویانی و سرکار خانم دکتر نیکوگفتار کمال تشکرو سپاس را دارم .

همچنین از همکلاسی های عزیزم خانم ها : مینو و مینا عجمی , زمانی , اسماعیلی , محمودی , پرهیزکار و آقایان مختاری و اله وردی و دانشجویان محترم گروه آقایان سلالی, محرابی و دهقانی فرد و خانم ها مشهدی خان , شیرخورشیدی و اسفندیاری بسیار تشکر می کنم .

از کارشناس محترم گروه سرکار خانم شوکتی تشکر و سپاس دارم.

چکیده

زمینه و هدف: تاکنون در مطالعات مختلفی به بررسی پتانسیل استئوژنیک سلولهای بنیادی مزانشیمی و اهمیت سیگنالهای بتا آدرنرژیک در تشکیل و بازجذب استخوان پرداخته شده است. با این وجود اطلاعات کمی درباره نقش سیگنال های بتا آدرنرژیک در تمایز استئوبلاستی سلولهای بنیادی مزانشیمی که از اهمیت بالایی در فیزیولوژی و فارماکولوژی استخوان برخوردار است، وجود دارد. RUNX2 اختصاصی ترین فاکتور نسخه برداری و استئوکلسین اختصاصی ترین پروتئین غیر کلاژنی در تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست می باشند .در این تحقیق، میزان بیان کمیRUNX2 و استئوکلسین در طول تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست با استفاده از محیط تمایزی استئوبلاستی و داروهای ایزوپرترنول (آگونیست بتا آدرنرژیک) و پروپرانولول (آنتاگونیست بتا آدرنرژیک) مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها :در این مطالعه تجربی، سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان تحت تیمار با محیط تمایزی استئوبلاستی و داروهای ایزوپرترنول و پروپرانولول قرار گرفتند.استخراج RNA در روزهای ۴ و ۲۱ تمایز استئوبلاستیک و از سلولهای بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته صورت گرفت.بیان کمی RUNX2 و استئوکلسین با روش quantitative Real Time-PCR سنجیده شد.

نتایج و یافته ها: بیان ژنهای RUNX2 و استئوکلسین در روزهای۴ و ۲۱ تمایز استئوبلاستی تحت تیمار با داروی ایزوپرترنول کاهش یافت که در روز ۲۱ تمایز این اختلاف از نظر آماری معنی دار بود ($P<0.05$). و تحت تیمار با داروی پروپرانولول افزایش یافت که در روزهای ۴ و ۲۱ تمایز این اختلاف از نظر آماری معنی دار بود ($P<0.05$).

نتیجه گیری :داروی ایزوپرترنول به طور منفی بر تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست تاثیر دارد (به خصوص بر مراحل انتهایی تمایز استئوبلاستی)، در حالیکه داروی پروپرانولول به طور مثبت بر تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست تاثیر دارد(هم بر مراحل ابتدایی و هم مراحل انتهایی تمایز استئوبلاستی).این یافته ها پیشنهاد میکنند که سلول های بنیادی مزانشیمی نیز هدف تنظیم بتا آدرنرژیک قرار می گیرند و سیگنالینگ بتا آدرنرژیک در استئوژنز سلول های بنیادی مزانشیمی نقش دارد.

واژه های کلیدی :سلول های بنیادی مزانشیمی، محیط تمایزی، بتا آدرنرژیک، ایزوپرترنول،پروپرانولول ، RUNX2 ، استئوکلسین

فهرست مطالب

فصل اول-مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱. مقدمه ۲

۱-۲ . بافت استخوان ۵

۱-۲-۱.بازسازی استخوان ۶

۱-۲-۲. سلولهای استخوانی ۸

۱-۲-۲-۱ .استئوسیت ها *۸*

۱-۲-۲-۲. استئوکلاست ها ۱۰

۱-۲-۲-۳. استئوبلاست ها ۱۱

۱-۲-۳ . ماتریکس استخوانی ۱۳

۱-۳. سلولهای بنیادی ۱۴

۱-۳-۱. سلولهای بنیادی مزانشیمی ۱۵

۱-۳-۱-۱. مارکرهای سطحی سلولهای بنیادی مزانشیمی *۱۷*

۱-۳-۱-۲. فنوتیپ پیش ساز سلولهای بنیادی مزانشیمی ۱۹

۱-۳-۱-۳ . منابع استحصال سلولهای بنیادی مزانشیمی ۱۹

۱-۳-۱-۴ . کاربردهای بالینی سلولهای بنیادی مزانشیمی ۲۰

۱-۴ . تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست ۲۲

۱-۵. فاکتورهای نسخه برداری دخیل در تمایز استئوبلاست ها ۲۶

۱-۵-۱. فاکتور نسخه برداری RUNX2 ..... ۲۸

۱-۵-۲ . فاکتور نسخه برداری OSTERIX ۳۰

۱-۵-۳ . فاکتور نسخه برداری DLX5 ..... ۳۱

۱-۵-۴. سایر فاکتورهای نسخه برداری دخیل در تمایز استئوبلاستی ۳۲

۱-۶ . ژنهای شاخص تمایز استئوبلاستی ۳۶

۱-۶-۱. استئوکلسین ۳۷

۱-۶-۲. سیالو پروتئین استخوانی(BSP) ۳۹

۱-۶-۳ . استئوپونتین ۴۰

۱-۶-۴ . کلاژن تیپ IA1 ..... ۴۲

۱-۶-۵. استئونکتین ۴۲

۱-۷.سیستم عصبی و بازسازی استخوان ۴۳

۱-۷-۱. اثرات سیستم آدرنرژیک بر استئوبلاست ها و تشکیل استخوان ۴۳

۱-۷-۲. تاثیر نورون های هیپوتالاموس بر بازجذب استخوان ۴۵
۱-۷-۳. اثرات آدرنرژیک در مقابل هورمون پاراتیروئید بر سلول های استخوانی . ۴۷
۱-۷-۴. نورومدیاتورهای استخوانی ۴۸
۱-۷-۵. گیرنده های آدرنرژیک ۵۳
۱-۸. ارتباط سیستم عصبی با بیماری های انسانی و درمان آنها ۵۴
۱-۸-۱.پوکی استخوان ۵۵
۱-۸-۱-۱ . درمان پوکی استخوان ۵۸
۱-۸-۱-۲.هدف ۵۹

فصل دوم- مواد و روش ها

۲-۱ مواد ،وسایل وتجهیزات مورد استفاده ۶۲
۲-۱-۱ . وسایل مورد استفاده ۶۲
۲-۱-۲. مواد مورد استفاده ۶۳
۲-۱-۳. سلول های مورد استفاده ۶۴
۲-۱-۳-۱. سلول های یوکاریوتی ۶۴
۲-۱-۴ . کیت های مورد استفاده ۶۵
۲-۱-۵. دستگاه های مورد استفاده ۶۵
۲-۲ .کشت سلول ۶۶
۲-۲-۱. کشت مجدد و تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیمی ۶۶
۲-۲-۲ . فریز کردن سلول های بنیادی مزانشیمی ۶۷
۲-۲-۳ . د فریز سلول ها ۶۷
۲-۲-۴. شمارش سلولی به وسیله لام نئوبار ۶۸
۲-۲-۵. تعیین درصد زنده بودن سلولهای بنیادی مزانشیمی ۶۸
۲-۲-۶. القای تمایز استئوبلاستی در سلولهای بنیادی مزانشیمی ۶۸
۲-۲-۷. تیمار سلولهای بنیادی مزانشیمی با ایزوپرترنول و پروپرانولول ۶۹
۲-۲-۸. رنگ آمیزی آلیزارین رد ۷۰
۲-۳ . استخراج RNA ۷۰
۲-۴ .سنتز CDNA **از** RNA **استخراج شده** ۷۲
۲-۵. واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ۷۴
۲-۶. REAL TIME PCR ۷۶

فصل سوم-نتایج و یافته ها

۳-۱. مشاهدات میکروسکوپی ۸۰

۳-۲. نتایج کنترل کیفی RNA استخراج شده ۸۱

۳-۳. تایید تمایز استئوبلاستیک با رنگ آمیزی آلیزارین رد ۸۲

۳-۴. نتایج RT- PCR در تمایز استئوبلاستی سلولهای بنیادی مزانشیمی با محیط تمایزی و ایزوپرترنول و پروپرانولول ۸۴

۳-۵. نتایج QUANTITATIVE REAL TIME PCR در تمایز استئوبلاستی سلولهای بنیادی مزانشیمی با محیط تمایزی ۸۶

۳-۵-۱. نتایج QUANTITATIVE REAL TIME PCR ژن RUNX2 در طول تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی ۸۸

۳-۵-۲. نتایج QUANTITATIVE REAL TIME PCR ژن استئوکلسین در طول تمایزاستئوبلاستی با محیط تمایزی ۸۹

۳-۶. نتایج QUANTITATIVE REAL TIME PCR در سلولهای بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی ایزوپرترنول ۹۱

۳-۶-۱. نتایج QUANTITATIVE REAL TIME PCR ژن RUNX2 در سلولهای بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی ایزوپرترنول ۹۱

۳-۶-۲. نتایج QUANTITATIVE REAL TIME PCR ژن استئوکلسین سلولهای بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی ایزوپرترنول ۹۳

۳-۷. نتایج QUANTITATIVE REAL TIME PCR در سلولهای بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی پروپرانولول ۹۴

۳-۷-۱ . نتایج QUANTITATIVE REAL TIME PCR ژن RUNX2 در سلولهای بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی پروپرانولول ۹۵

۳-۷-۲. نتایج QUANTITATIVE REAL TIME PCR ژن استئوکلسین سلولهای بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی پروپرانولول ۹۶

۳-۸. نتایج مقایسه ای تاثیر داروی ایزوپرترنول و پروپرانولول بر بیان ژن RUNX2 ..... ۹۸

۳-۹. نتایج مقایسه ای تاثیر داروی ایزوپرترنول و پروپرانولول بر بیان ژن استئوکلسین ۹۸

فصل چهارم - بحث ، نتیجه گیری و پیشنهادها

۴-۱.بحث و نتیجه گیری ۱۰۱

۴-۲ .پیشنهادها ۱۱۱

فهرست منابع ۱۱۳

خلاصه انگلیسی ۱۲۸

فهرست جداول

جدول ۱-۱. فهرست پروتئینهای غیرکلاژنی تولید شده توسط استئوبلاست ها ۱۳

جدول۱-۲ . برخی از فاکتورهای کلیدی دراستئوبلاستوژنز و تشکیل استخوان ۲۶

جدول ۳.۱- شباهت ها و تفاوت های بین سیگنالینگ PTH و بتا آدرنرژیک در استخوان ۴۷

جدول ۱-۴ : زیرگروه های گیرنده های آدرنرژیک ۵۴

جدول ۲-۱ : مقادیر مورد استفاده جهت CDNA سازی ۷۲

جدول ۲-۲. مقادیر مورد استفاده جهت CDNA سازی ۷۳

جدول ۲-۳ . چرخه دمایی CDNA سازی. ۷۳

جدول ۲-۴. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای ژنهای RUNX2 ،استئوکلسین و بتا اکتین (کنترل داخلی) ۷۴

جدول ۲-۵ : مقادیر مورد استفاده جهت انجام واکنش PCR ۷۵

جدول ۲-۶. چرخه دمایی انجام PCR ۷۶

جدول ۲-۷ : مقادیر مورد استفاده جهت انجام واکنش REAL TIME PCR ۷۷

جدول ۲-۸. چرخه دمایی انجام REAL TIME PCR ۷۸

جدول ۳-۱. غلظت RNA استخراج شده و خلوص آن در (260/280) OD و (260/280) OD ۸۱

جدول ۳-۲ .CT ژنهای هدف و بتا اکتین در سه آزمایش جداگانه ۸۷

فهرست نمودارها

نمودار ۳-۱.نتایج QUANTITATIVE REAL TIME PCR ژن RUNX2 در طول تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی ۸۸
نمودار ۳-۲. نتایج QUANTITATIVE REAL TIME PCR ژن استئوکلسین در طول تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی ۹۰
نمودار ۳-۳. نتایج QUANTITATIVE REAL TIME PCR ژن RUNX2 در طول تمایز استئوبلاستی با داروی ایزوپرترنول ۹۲
نمودار ۳-۴. نتایج QUANTITATIVE REAL TIME PCR ژن استئوکلسین در طول تمایز استئوبلاستی با داروی ایزوپرترنول ۹۳
نمودار ۳-۵. نتایج QUANTITATIVE REAL TIME PCR ژن RUNX2 در طول تمایز استئوبلاستی با داروی پروپرانولول ۹۵
نمودار ۳-۶. نتایج QUANTITATIVE REAL TIME PCR ژن استئوکلسین در طول تمایز استئوبلاستی با داروی پروپرانولول ۹۷
نمودار ۳-۷ . مقایسه نتایج QUANTITATIVE REAL TIME PCR ژن RUNX2 در طول تمایز استئوبلاستی با داروی ایزوپرترنول و پروپرانولول ۹۸
نمودار ۳-۸ . مقایسه نتایج QUANTITATIVE REAL TIME PCR ژن استئوکلسین در طول تمایز استئوبلاستی با داروی ایزوپرترنول و پروپرانولول. ۹۹

فهرست شکل ها

شکل ۱-۱ .سلولهای استخوانی..... ۵

شکل۱-۲. ارتباط بین تشکیل و تحلیل استخوان..... ۸

شکل۱-۳. تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی..... ۱۶

شکل ۱-۴. تمایز استئوبلاستی..... ۲۳

شکل ۱-۵. تعهد سلول های بنیادی مزانشیمی به انواع سلولهای مختص بافت ۲۵

شکل ۱-۶. مراحل مختلف تمایز استئوبلاستی و فاکتورهای نسخه برداری موثر بر این مراحل ۲۸

شکل ۱-۷ . تنظیم ژن استئوکلسین ۳۸

شکل۱-۸ . تصویر ساده شده ای ازنوروپپتید ها و ارتباط آنها با تنظیم بازسازی استخوان..... ۵۲

شکل ۳-۱. مورفولوژی فیبروبلاستی سلولهای بنیادی مزانشیمال مغز استخوان انسان..... ۸۰

شکل ۳-۲ . سلولهای بنیادی مزانشیمال در روزهای مختلف تمایز..... ۸۱

شکل۳-۳ . رنگ آمیزی آلیزارین رد..... ۸۳

شکل ۳-۴. نتایج RT- PCR ژنهای بتا اکتین(کنترل داخلی), استئوکلسین و RUNX2 در سلولهای بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته و روز ۴ تمایز ۸۴

شکل ۳-۵. نتایج RT- PCR ژنهای بتا اکتین(کنترل داخلی), استئوکلسین و RUNX2 در روز ۲۱ تمایز ۸۵

شکل ۳-۶. نتایج RT- PCR ژنهای بتا اکتین(کنترل داخلی), استئوکلسین و RUNX2 در روز ۲۱ تمایز در حضور پروپرانولول..... ۸۵

شکل ۳-۷. منحنی MELTING ژن بتا اکتین ۸۶

شکل ۳-۸. منحنی MELTING در QUANTITATIVE REAL TIME PCR ژن RUNX2 در طول تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی..... ۸۹

شکل ۳-۹. منحنی MELTING در QUANTITATIVE REAL TIME PCR ژن استئوکلسین در طول تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی..... ۹۰

شکل ۳-۱۰. منحنی MELTING در QUANTITATIVE REAL TIME PCR ژن RUNX2 در طول تمایز استئوبلاستی با داروی ایزوپرترنول ۹۲

شکل ۳-۱۱. منحنی MELTING در QUANTITATIVE REAL TIME PCR ژن استئوکلسین در طول تمایز استئوبلاستی با داروی ایزوپرترنول ۹۴

شکل ۳-۱۲. منحنی MELTING در QUANTITATIVE REAL TIME PCR ژن RUNX2 در طول تمایز استئوبلاستی با داروی پروپرانولول..... ۹۶

شکل ۳-۱۳. منحنی MELTING در QUANTITATIVE REAL TIME PCR ژن استئوکلسین در طول تمایز استئوبلاستی با داروی پروپرانولول.....۹۷

فصل اول

مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱. مقدمه

سلولهای بنیادی مزانشیمی(MSCs)[1] کاربردهای مهمی در پزشکی ترمیمی و مهندسی بافت دارند. MSCs در ترمیم و احیا بافت‌ها به واسطه تمایز به استخوان، غضروف، ماهیچه، چربی، سلولهای استرومایی و کاردیومیوسیت‌ها دارای نقش هستند. با وجود کاربردهای فراوان MSCs در پزشکی ترمیمی و درمان بیماریهای مختلف، مسیرهای تمایزی و فاکتورهای دخیل در تمایز MSCs به رده‌های مختلف سلولی از جمله استئوبلاست‌ها ، هنوز بخوبی شناخته نشده است. تمایز استئوبلاستیک MSCs ،کلید اصلی و اولیه در تولید و ترمیم بافت‌های استخوانی و درمان بیماریهای استخوانی مانند استئوپورز می‌باشد. تمایز استئوبلاستیک MSCs در In vivo تحت کنترل فاکتورهای مختلف از جمله هورمون‌ها، فاکتورهای رشد، سیتوکین‌ها ، مورفوژن‌ها مانند BMP [2] و پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی می‌باشد. در In vitro بیشترین بازخورد القا تمایز استئوبلاستی با استفاده از گلوکوکورتیکوئیدها حاصل می‌شود. القا تمایز استئوبلاستی MSCs در In vitro عمدتاً با استفاده از دگزامتازون، بتاگلیسرول فسفات، اسید آسکوربیک و FCS [3] ۱۰ % در محیط‌های عمومی کشت همانند DMEM [4]صورت می‌گیرد. هر یک از این فاکتورها مسیرهای سیگنال دهی مختلفی را در داخل سلول فعال می‌کنند که فاکتورهای نسخه برداری ویژه‌ای را

[1] Mesenchymal stem cells
[2] Bone Morphogenic Protein
[3] Fetal Calf Serum
[4] Dulbecco's Modified Eagle Medium

فعال کرده و تمایز استئوبلاستی را القا می‌کنند. دو فاکتور نسخه برداری RUNX2 [1] و OSX [2] نقش اساسی در تمایز استئوبلاستی دارند[۱و۲]. این فاکتورهای نسخه برداری بعد از فعال شدن، ژن‌های هدف خود شامل استئوکلسین، استئوپونتین، سیالوپروتئین استخوانی و کلاژن نوع Ia را مورد رونویسی قرار می‌دهند.

قابلیت تمایز MSCs به رده‌های مختلف سلولی از جمله استئوبلاست به دلیل پتانسیل بیان ژن‌ها یا فاکتورهای نسخه برداری اختصاصی دخیل در تمایز می‌باشد. اما اینکه این پتانسیل بیان ژنی و عملکرد فاکتورهای نسخه برداری در استئوبلاستوژنزیس توسط چه فرآیندهایی کنترل می‌شوند هنوز به طور کامل روشن نیست.

به نظر میرسد که شکل گیری استخوان تحت تنظیم اعصاب باشد و مطالعات مختلف حضور نورونهای سمپاتیک در سطح سلولهای استخوانی را نشان داده اند [۳] . مطالعات نشان داده اند که استخوان منبعی غنی از فیبرهای عصبی سمپاتیک دریافت میکند[۴] .اثر نورونهای سمپاتیک بر سلولهای استخوان به طور عمده توسط رسپتورهای بتا آدرنرژیک میانجی گری میشود .در مطالعات مختلف حضور رسپتورهای بتا آدرنرژیک در سطح استئوبلاست های موشی و سل لاینهای استئوبلاستی به اثبات رسیده است . به نظر میرسد که در میان رسپتورهای آدرنرژیک در سطح سلولهای استئوبلاستی ، مهمترین آنها بتا -۲ -آدرنرژیک باشد[۵].

رسپتورهای بتا آدرنرژیک به خانواده بزرگ پروتئین های با دومین ترانس ممبران هفت تایی تعلق دارند که از طریق پروتئین های هترو دایمریک متصل به نوکلئوتید گوانین (G-protein) انتقال سیگنال انجام میدهند.به نظر میرسد مسیر سیگنال دهی رسپتور بتا-۲ آدرنرژیک فعال شده از طریق جفت شدن GSα و آدنیلات سیکلاز و تولید cAMP [3] و نهایتا فعال شدن PKA [4] باشد که PKA فعال شده به نوبه

[1] Runt-related transcription factor 2
[2] OSTERIX
[3] Cyclic adenosine monophosphate
[4] Protein kinase A

خود باعث فسفریله شدن پروتئین های هدف مختلفی از جمله فاکتورهای رونویسی ، کینازهای مختلف رسپتورهای سطح سلول از جمله خود رسپتور بتا -۲ - آدرنرژیک میشود [۶].

افزایش فعالیت سیستم عصبی سمپاتیک با اثرات مهاری مستقیم بر استئوبلاستها باعث از دست دادن استخوان میشود. در حین بازسازی استخوان ، نور اپی نفرین از نورونهای سمپاتیک آزاد شده و با تاثیر برروی استخوان باعث افزایش بازجذب استخوان [۵و ۷-۸] و مهار تشکیل استخوان [۹] میشود. از آنجا که تشکیل استخوان جدید نقش اصلی استئوبلاست هاست بنابراین عواملی که باعث افزایش پرولیفراسیون رده استئوبلاستی و یا القای تمایز استئوبلاستی شوند ، باعث افزایش تشکیل استخوان میشوند .بنابراین مهار فارماکولوژیک رسپتورهای بتا -۲- آدرنرژیک باعث افزایش توده استخوانی میشود. [۹و ۱۰] .علیرغم شواهد قوی مبنی بر تاثیر سیستم آدرنرژیک در تنظیم بازسازی استخوان ، آزمایشات فارماکولوژیکی و ژنتیکی نتایج متناقضی را نشان میدهند [۶] .

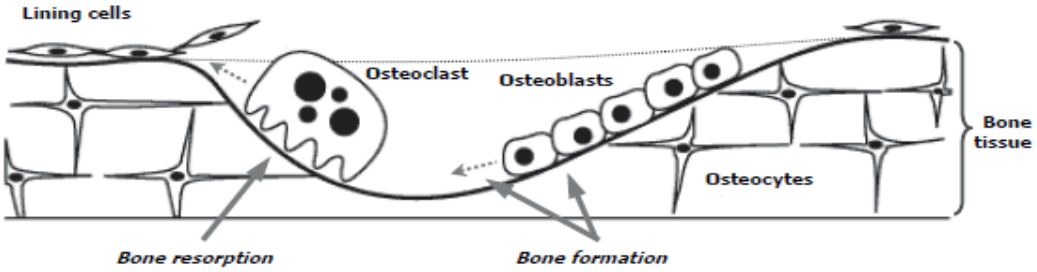
هدف از این مطالعه بررسی اثر ایزوپرترنول(آگونیست بتا آدرنرژیک) و پروپرانولول(آنتاگونیست بتا آدرنرژیک) برتمایز سلولهای استئوبلاستی در شرایط in vitro با استفاده از بررسی بیان ژنهای RUNX2 و استئوکلسین است .RUNX2 مهمترین فاکتور نسخه برداری در رده استئوبلاستی است .استئوکلسین که به نام BGLAP [۱] نیز نامیده میشود، یک جز پروتئینی غیر کلاژنی عمده ماتریکس خارج سلولی استخوان است که منحصرا توسط سلولهای استئوبلاستی و در مراحل آخر بلوغ سنتز و ترشح میشود و بیشتر نشان دهنده تمایز استئوبلاستی است[۱۱-۱۶].

بر این اساس تعیین بیان ژن‌های اختصاصی در تمایز استئوبلاستیک سلولهای بنیادی مزانشیمی تحت تاثیر آگونیست و آنتاگونیست بتا آدرنرژیک حایز اهمیت بوده و افق‌های روشنی را در ارائه رویکردهای جدید درمانی در درمان بیماریهای استخوانی ایجاد می‌کند.

[۱] bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein

۱-۲ . بافت استخوان

بافت استخوان یک نوع بافت همبند اختصاصی و به شدت سازمان یافته است که از سلولهای مختلفی تشکیل شده که در آن اجزاء خارج سلولی کلسیفیه شده و ماده‌ای سخت و مقاوم را بوجود آورده اند. این بافت ، با تمام سختی خاصیت الاستیسیته دارد و با وجود سختی یک ماده حیاتی دینامیکی است که دائماً در طول عمر خود تجدید و دوباره سازی می‌شود. ماتریکس استخوان از دو جزء آلی و معدنی تشکیل یافته است که جزء آلی عمدتا از الیاف کلاژن یا اوستئین به همراه کلاژن استخوانی تشکیل شده و حدود ۲/۳ وزن استخوان را شامل می‌شود و جزء معدنی حاوی نمک‌های معدنی ، هیدروکسی آپاتیت و کریستال های فسفات کلسیم آمورف رسوب کرده در ماتریس آلی میباشد که سفتی استخوان‌ها مربوط به آنها است . فسفات کلسیم ۸۵٪، کربنات کلسیم ۱۰٪ و مقادیر کمی کلرور کلسیم و منیزیوم جز معدنی را تشکیل می دهند. استخوان به طور مداوم توسط چهار نوع سلول مختلف تجدید و نوسازی میشود; این سلولها عبارتند از ؛ ۱) استئوسیت ، ۲) استئوکلاست ، ۳) استئوبلاست ، و ۴) سلولهای پوششی (شکل ۱.۱).



شکل ۱-۱ .سلولهای استخوانی

استئوسیت‌ها ، در حفراتی به نام لاکونا[1] قرار دارند و از استئوبلاست‌ها منشا می‌گیرند. از آنجا که متابولیت‌ها قادر به انتشار از طریق ماتریکس کلسیفیه استخوان نیستند تبادل بین استئوسیت‌ها و مویرگ‌های خونی بستگی به ارتباط سلولی از طریق کانالیکولها دارد که بستر را سوراخ می‌کنند. این

[1] Lacuna