بسمه تعالی

دانشگاه تربیت معلم تهران
دانشکده علوم - گروه زیست شناسی
پایان نامه کارشناسی ارشد

رشته زیست شناسی
گرایش سلولی- تکوینی جانوری

بررسی اثر تمایزی زجاجیه چشم بر سلولهای بنیادی مشتق از بافت چربی در In vitro

استاد راهنما
دکتر هما محسنی کوچصفهانی

استاد مشاور
دکتر محمد نبیونی

پژوهشگر
پریسا غیبی
سال تحصیلی ۱۳۹۰-۱۳۸۹

عنوان | صفحه

چکیده فارسی ۱

فصل اول

مقدمه ۲

۱-۱- مبانی سلول‌های بنیادی ۳

۱-۱-۱- تقسیم بندی سلول‌های بنیادی بر اساس توان تمایزی و برگشت پذیری ۴

سلول‌های بنیادی همه توان ۴

سلول‌های بنیادی پر توان ۴

سلول‌های بنیادی چند توان ۴

سلول‌های بنیادی یک توانی (progenitor) یا سلول‌های پیش ساز ۴

۱-۱-۲- طبقه بندی سلول‌های بنیادی از نظر منشا ۵

۱) سلول‌های بنیادی با منشا جنینی ۵

۲) سلول‌های بنیادی بالغ ۶

۱-۱-۳- سلول‌های بنیادی مزانشیمی(MSC) ۷

۱-۱-۴- بافت چربی ۸

۵-۱-۱- سلول‌های بنیادی گرفته شده از بافت چربی ۹

۶-۱-۱- مارکرهای سلول‌های بنیادی ۹

الف) مارکرهای سلول‌های بنیادی جنینی ۹

ب) مارکرهای سلول‌های بنیادی بالغ ۱۰

۷-۱-۱- مارکرهای سلول‌های مزانشیمی (Mesenchymal Cell Markers) ۱۱

۲-۱- رشد و نمو چشم ۱۱

۳-۱- رشد و نمو عدسی چشم ۱۱

۴-۱- زجاجیه ۱۴

۵-۱- کریستالینها در چشم ۱۵

۵-۱-۱- آلفا کریستالین‌ها ۱۵

۵-۲-۱- عملکرد چاپرونی و نقش تکوینی ۱۶

۵-۳-۱- مهار آپوپتوزیس و حفظ سلول تحت تاثیر کریستالینها ۱۷

۵-۴-۱- اعمال β-Crystallin و γ-Crystallin ۱۷

۵-۵-۱- میانکش بین کریستالینها و اسکلت سلولی ۱۸

۵-۶-۱- آلفا- کریستالین ها و رشد سلول‌های اپیتلیومی عدسی ۱۸

۵-۷-۱- مطالعات قبلی در مورد تمایز سلول های فیبری عدسی چشم ۱۹

۶-۱- اهداف این تحقیق ۲۰

فصل دوم

مواد و روش‌ها ۲۱

۲-۱- آماده کردن حیوان آزمایشگاهی ۲۲

۲-۲- وسایل مورد نیاز ۲۲

۲-۳- مواد مورد نیاز ۲۴

۲-۴- محلول‌های مورد نیاز و طرز تهیه آنها ۲۵

۲-۵- جدا کردن سلول‌های بنیادی چربی و کشت اولیه آنها ۲۶

۲-۶- پاساژ دادن سلول‌های کشت شده ۲۸

۲-۷- شناسایی سلول‌های بنیادی در محیط کشت ۲۹

۲-۷-۱- روش ایمونوسیتوشیمی ۳۱

۲-۸- شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی به روش فلوسایتومتری..... ۳۲

۲-۹- روش انجماد سلول‌های بنیادی و ذخیره آن و تهیه بانک سلولی ۳۵

۲-۱۰- روش ذوب کردن سلول‌ها ۳۶

۲-۱۱- نحوه گرفتن مایع زجاجیه ۳۷

۱۲-۲- تیمار سلول‌های بنیادی جداشده از بافت چربی با مایع زجاجیه ۳۷

۱۲-۱-۲- کشت سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت چربی

همراه با زجاجیه به مدت چهارده روز ۳۷

۱۲-۲-۲- کشت سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت چربی

همراه با زجاجیه به مدت بیست و یک روز ۳۸

۱۳-۲- رنگ‌آمیزی سلول‌ها با مارکر کریستالین ۳۸

فصل سوم

نتایج ۳۹

۱-۳- کشت اولیه سلول‌های جداشده از بافت چربی ۴۰

۲-۳- کشت سلولی پس از پاساژ اول و تولید لاین سلولی ۴۱

۳-۳- شناسایی سلول‌های بنیادی با استفاده از مارکر OCT4 ..... ۴۲

۴-۳- شناسایی سلول‌های گرفته شده از بافت چربی با استفاده ازمارکرها به روش فلوسایتومتری : ۴۲

۵-۳- سلول‌های بنیادی بافت چربی بعد از ذوب شدن ۴۶

۶-۳- نتایج کشت سلول‌های بنیادی به مدت ۱۴ روز

در گروه‌های تجربی و کنترل ۴۶

۷-۳- نتایج کشت سلول‌های بنیادی به مدت ۲۱ روز

در گروه‌های تجربی و کنترل ۵۰

۸-۳- نتایج رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانت در کشت‌های ۱۴ روزه ۵۳

۹-۳- نتایج رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانت در کشت‌های ۲۱ روزه ۵۶

فصل چهارم

بحث و تفسیر ۵۹

پیشنهادات ۶۵

منابع ۶۶

چکیده انگلیسی ۷۸

چکیده

مقدمه و هدف:

بافت چربی دارای سلول‌های بنیادی چند توانی است که قابلیت خودنوزایی و تکثیر بدون تمایز را دارا هستند. احتمال می‌رود که سلول‌های بنیادی این بافت تحت القا فاکتورهای موجود در مایع زجاجیه به سمت فیبری شدن پیش‌روی کنند. هدف از این تحقیق بررسی قابلیت‌های سلول‌های بافت چربی در تمایز به گروهی از سلول‌های اپیتلیومی می‌باشد.

روش مطالعه :

سلول‌های بنیادی از بافت چربی ناحیه کشاله ران موش نژاد NMRI با استفاده از روش استاندارد چسبندگی به ظرف کشت جدا شده و برای شناسایی بنیادی بودن سلول‌ها، از مارکر OCT4 و روش ایمونوسیتوشیمی و فلوسایتومتری استفاده گردید. همچنین سلول‌های بنیادی بافت چربی از لحاظ بیان مارکرهای cd31، cd45، cd90، cd29 بررسی شدند. سپس سلول‌ها تحت القا زجاجیه چشم گاو به مدت ۱۴ و ۲۱ روز با درصدهای مختلف ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ درصد از مایع زجاجیه نسبت به محیط کشت قرار گرفتند. بیان مارکرهای کریستالین آلفا در نمونه‌های تجربی و کنترل با روش ایمونوسیتوشیمی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها:

سلول‌های بنیادی بافت چربی موش نسبت به مارکر OCT4 پاسخ مثبت نشان دادند. بیان دو مارکر خونی cd 45 و cd 31 در این سلول‌ها منفی بود و بالعکس میزان بیان مثبتی را نسبت به مارکر مزانشیمی cd29 و cd90 داشتند. بررسی های مورفولوژیکی پس از تیمار نشان داد که سلول‌های تیمار شده با غلظت ۴۰ ٪ از مایع زجاجیه از لحاظ شکل ظاهری نسبت به سلول‌های گروه کنترل کشیده تر و به صورت موضعی به موازات هم آرایش یافتند و نیز در داخل هسته آنها تعداد هستک‌ها افزایش یافت. بیان مثبت مارکر کریستالین در نمونه‌های تجربی تمایز آنها را به سمت فیبرهای عدسی تایید کرد.

نتیجه‌گیری :

بر اساس یافته‌های این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که بر اساس مورفولوژی و پاسخ مثبت سلول‌های گروه تجربی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی در اثر تیمار با زجاجیه می تواند به سلولهای شبه فیبر عدسی متمایز شوند.

واژگان کلیدی : *بافت چربی، سلول‌های بنیادی، مایع زجاجیه.*

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مبانی سلول‌های بنیادی

جنین در مراحل اولیه تکامل خود به صورت موقتی و گذرا حاوی جمعیتی از سلول‌های پرتوان است که عامل تولید انواع مختلف سلول‌ها و بافت‌های بدن در دوران جنینی و حتی پس از تولد هستند. به این سلول‌ها، سلول‌های بنیادی گفته می‌شود. امروزه سلول‌های بنیادی از زمینه‌های جذاب زیست شناسی شناخته می‌شوند. تحقیق روی سلول‌های بنیادی به پیشبرد دانش ما در زمینه‌ی چگونگی تکوین جاندار کامل از یک سلول منفرد یا چگونگی جایگزینی سلول‌های آسیب دیده توسط سلول - های سالم در جاندار بالغ کمک می‌کند. به علاوه این سلول‌ها نوید بخش روش‌های نوین درمان مبتنی بر سلول درمانی هستند(۲و۱).

سلول‌های بنیادی دارای چند ویژگی مهم نسبت به سایر سلول‌ها هستند:

۱. سلول‌های بنیادی خاصیت کلونی زایی دارند و هر سلول می‌تواند تعداد زیادی سلول‌بنیادی تولید کند.(۳و۴)

۲. قادر به تولید انواع سلول‌های تمایز یافته در محیط آزمایشگاه هستند. (۳و۴)

۳. هنگامی که سلول‌های بنیادی به یک بافت آسیب دیده پیوند شوند به طور عملی یک جمعیت سلولی ترمیمی را تشکیل می‌دهند. بطور مثال سلول‌های بنیادی خونساز (HSC) اخیراً برای ترمیم سلول‌های کبدی در بیماران دارای ناراحتی کبدی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. (۳و۴)

۴. دارای قدرت خودنوزایی هستند. سلول‌های بنیادی قادرند تحت تقسیمات کاملاً یکسان که شرط لازم برای پشتیبانی و نگهداری جمعیت سلول‌های بنیادی است، خود تجدیدی کنند. (۳و۴)

خودبازسازی سلولی شامل وجود تکثیر سلولی و حفظ توان سلولی است. سلول‌های بنیادی به عنوان سلول‌های پرتوان در نظر گرفته شده و مکانیسم‌های منظمی جهت حفظ توان سلولی در این سلول‌ها به کار گرفته می‌شوند که هدف نهایی آنها جلوگیری از ورود سلول‌ها به مسیرهای تمایزی و حفظ توان سلول‌ها برای تبدیل شدن به سلول‌های متنوع یک اندام می-باشد.(۵)

به همین دلیل از این سلول‌ها در تحقیقات جدید مانند تولید و تمایز رده‌های ویژه سلولی و پیوند به بدن به عنوان سلول درمانی و نیز در تولید حیوانات ترنس ژنیک استفاده می‌شود. دانشمندان تصور می‌کنند که در آینده این سلول‌ها مبنای درمان بسیاری از بیماری‌های عصبی، قلبی و دیابت و ... خواهند بود(۶).

۱-۱-۱- تقسیم بندی سلول‌های بنیادی بر اساس توان تمایزی و برگشت پذیری:

سلول‌های بنیادی همه توان

این سلول‌ها توانایی تمایز به انواع سلول‌های جنینی و خارج جنینی را دارند. سلول تخم لقاح یافته و سلول‌های حاصل از تقسیم‌های اولیه آن همه توان بوده و می‌توانند یک موجود زنده و کامل را بوجود آورند. در پستانداران اووسیت لقاح یافته، تخم، جنین در مراحل ۲ سلولی، ۴ سلولی،۸ سلولی و مورولا همه توان می‌باشد. دلایلی که این سلول‌ها همه توانند از آنجا ناشی می‌شود که دو قلوهای همسان را می‌توان از جدا کردن جنین اولیه در مراحل ذکر شده ایجاد کرد. اما از آنجا که اووسیت لقاح یافته و بلاستومرها نمی‌توانند در طول تقسیمات کلیواژی خود تجدیدی کنند و تولیدشان محدود می‌شود آنها را معمولاً سلول بنیادی نمی‌گویند. (۷)

سلول‌های بنیادی پرتوان

این سلول‌ها نسل‌های بعدی سلول‌های همه توان هستند و می‌توانند تا حدودی به تمام سلول‌ها تمایز یابند. سلول‌های مشتق شده از سه لایه زاینده جنینی پرتوان هستند. مثلاً سلول‌های بنیادی جنینی تحت شرایط خاص می‌توانند یک فرد کامل را بسازند اما قادر به ایجاد سلول‌های برون جنینی نیستند. (۷)

سلول‌های بنیادی چند توان

این سلول‌ها تعداد محدودتری از انواع سلول‌ها را می‌سازند. این سلول‌ها در بافت‌های خونساز (۸)، ماهیچه‌ای (۹)، کبد (۱۰)، پانکراسی (۱۱)، سلول‌های پوشش روده (۱۲)، پوست (۱۳)، مغز (۱۵و۱۴) و غیره یافت می‌شوند. عملکرد اولیه آنها حفظ هومئوستازی در بافت‌ها و اندام‌ها می‌باشد. تعدادی از سلول‌های بنیادی بالغ توان تمایز به سلول‌های دیگر به غیر از بافتی که از آن منشا گرفتند را دارند. (۷)

سلول‌های بنیادی یک توانی (progenitor) یا سلول‌های پیش ساز:

توانایی ایجاد یک سلول را دارند. سلول‌های پیش ساز چربی فقط به سلول‌های چربی می‌توانند تبدیل شوند و سلول‌های پیش ساز اریتروئیدی تنها به سلول‌های قرمز خونی تمایز می‌یابند.(۱۶)

۲-۱-۱- طبقه بندی سلول‌های بنیادی از نظر منشا:

۱) سلول‌های بنیادی با منشا جنینی:

الف) سلول‌های بنیادی جنینی:

سلول‌های بنیادی جنینی(ES) از توده سلول‌های داخلی (ICM) جنین در مرحله بلاستوسیست بدست می‌آید. بلاستوسیست مرحله ای از تکوین جنینی پس از لانه‌گزینی است که شامل سه بخش است:

۱) تروفوبلاست: لایه‌ای از سلول‌ها که بلاستوسیست را احاطه می‌کنند.

۲) بلاستوسل: حفره توخالی دارای بلاستوسیست را گویند.

۳) توده سلول داخلی که شامل حدود ۳۰ سلول است و در یک انتهای بلاستوسیست قرار دارد.

ویژگی‌های خاص این سلول‌ها عبارتند از :

۱) از توده سلولی داخلی مشتق شده‌اند.

۲) دارای توان تقسیم متقارن نامحدود و بدون تمایز هستند.

۳) کاریوتایپ آنها دیپلوییید و طبیعی است.

۴) پرتوان هستند و توانایی تبدیل شدن به انواع سلول‌های هر سه لایه جنینی (اکتودرم، مزودرم و آندودرم) را دارند.

۵) عامل رونویسی OCT4 را بیان می‌کنند. این عامل باعث حفظ سلول‌های بنیادی در حالت تکثیر و ممانعت از تمایز آنها می‌شود.

۶) می‌توان آنها را القا کرد تا تمایز یابند و یا به تکثیر خود ادامه دهند.(۱۷)

ب) سلول‌های زاینده جنسی (Primordial germ cells):

PGC ها می‌توانند قبل یا بعد از رسیدن به طنابهای تناسلی جدا شوند. اگر این سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی با فاکتورهای مناسب کشت شوند می‌توانند سلول‌های زاینده جنسی را ایجاد کنند. این سلول‌ها نیز پرتوان بوده و قادر به ایجاد انواع سلولهای هر سه لایه زاینده می‌باشند.(۱۸)

ج) سلول‌های بنیادی تروفوبلاست:

از لایه تروفواکتودرم جنین در مرحله بلاستوسیت جدا شده و می‌توانند تمام سلول‌های دودمان ترفواکتودرمی از قبیل سلولهای تروفوبلاستی غول پیکر تمایز یافته را تولید کنند.(۱۸)

د) سلول‌های بنیادی رویانی:

انواع سلول‌های یافته شده در اندام‌های رویان را در بر می‌گیرند. سلول‌های ستیغ عصبی، سلول‌های بنیادی هماتوپویتیک رویانی و پروژنیتورهای جزایر پانکراس از جنین‌های سقط شده جدا شده‌اند.(۱۹)

۲) سلول‌های بنیادی بالغ:

امروزه به جای لفظ سلول‌های بالغ بهتر است که از سلولهای بنیادی سوماتیک استفاده کنیم. این سلول‌های بنیادی، سلول‌های تمایز نیافته‌ای هستند که در میان سلول‌های تمایز یافته‌ی یک بافت یا اندام یافت می‌شوند و یا در جفت، بند ناف و کیسه های جنینی قرار دارند.(۲۰)

الف) سلول‌های بنیادی بندناف:

خون بندناف شامل سلول‌های بنیادی در گردشی است که به نظر می‌رسد محتویات سلولی آنها از سلول‌های موجود در مغز استخوان و خون محیطی بالغ کاملاً متفاوت باشد. سلول‌های بنیادی هماتوپویتیک خون بندناف برابر یا حتی بیشتر از مغز استخوان است و در مقایسه با سلول‌های هماتوپویتیک مغز استخوان در شرایط آزمایشگاهی ایجاد کلنی‌های بزرگتر کرده، تلومراز بلندتر و در نتیجه تکثیر طولانی تری دارند. این سلول‌ها بعد از پیوند حساسیت کمتری نسبت به واکنش میزبان نشان می‌دهند(۲۱).

ب) سلول‌های بنیادی بالغ در اندام‌ها و بافتهای بدن:

این سلول‌ها توانایی خود بازسازی و همچنین تمایز در جهت ایجاد برخی از سلول‌ها و یا تمام سلول‌های تخصصی بافت یا اندامی که در آن قرار دارند را دارا می‌باشند. سلول‌های بنیادی بالغ در بسیاری از بافت‌ها و اندام‌ها شامل مغز، مغز استخوان، خون محیطی، رگ‌های خونی، ماهیچه اسکلتی، پوست، دندان ، قلب، لوله گوارشی، کبد، اپی‌تلیوم تخمدان و بیضه و بافت چربی شناسایی شده‌اند. این سلول‌ها در ناحیه ویژه‌ای از هر بافت به نام نیچ سلولی(stem cell niche) قرار دارند. این

سلول‌های بنیادی ممکن است تا مدت زمان طولانی به حالت خاموش باقی بمانند تا زمانیکه نیاز به سلول‌های بیشتر جهت حفظ بافت(مثلاً در زمان بیماری) می‌باشد.(۲۰)

به طور معمول تعداد بسیار کمی از سلول‌های بنیادی در هر بافت وجود دارد و زمانیکه از بدن جداسازی می‌شوند، ظرفیت تکثیری محدود شده‌ای را نشان می‌دهند. محققان در تلاش‌اند تا راه‌های بهتری جهت تولید مقادیر بیشتری از این سلول‌ها در محیط کشت سلولی، همچنین دستکاری آنها در جهت تولید انواع خاص سلولی پیدا کنند. این امر منجر به استفاده از این سلول‌ها در درمان جراحات و بیماری‌ها خواهد شد. از موارد استفاده از این سلول‌ها می‌توان به ترمیم استخوان با سلول‌های مشتق شده از مغز استخوان، ایجاد سلول‌های تولید کننده انسولین برای درمان بیماری دیابت نوع I و ترمیم ماهیچه آسیب دیده قلب به دنبال حمله قلبی با استفاده از سلول‌های بنیادی ماهیچه قلب نام برد. (۲۲)
از مهمترین سلولهای بنیادی بز رگسالان که امروزه توجه اکثر محققین را به خود جلب کرده است، می توان به سلولهای بنیادی مزانشیم اشاره کرد (۲۳).

۳-۱-۱- سلول‌های بنیادی مزانشیمی(MSC):

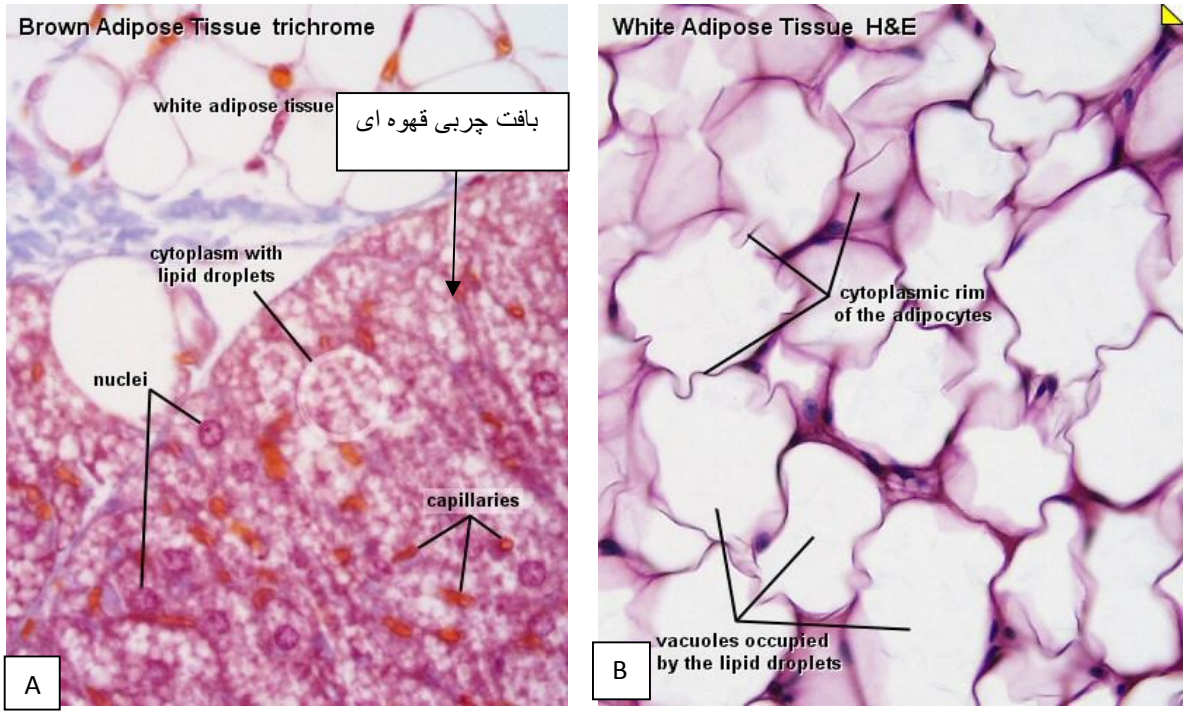
وجود سلول‌های بنیادی غیر خونساز اولین بار در مغز استخوان توسط یک پاتولوژیست آلمانی در بیش از ۱۳۰ سال پیش شناخته شد. او بیان داشت که در مغز استخوان سلول‌های فیبروبلاستی جدای از فیبرهای کلاژن در مراحل بازسازی زخم، وجود دارد. تا اینکه تا سال ۱۹۸۰ اطلاعاتی در نحوه کشت و شناخت بیشتر این سلول‌ها در مغز استخوان بدست آمد(۲۴). در طی این سال‌ها بر روی سلول‌های بنیادی بافت‌های دیگر نیز مطالعاتی صورت گرفت که در شرایط مناسب آزمایشگاهی قادرند که به استخوان، چربی، غضروف و ماهیچه تمایز یابند. از MSCها بیشتر در جهت ترمیم و بازسازی بافت‌های صدمه دیده استفاده می‌شود(۲۵).از منابع سلول‌های مزانشیمی که امروزه بیشتر در درمان بیماری‌ها و ترمیم اعضا صدمه دیده استفاده می‌شود، می‌توان به مغز استخوان (Bone marrow)، استرومای بندناف (Umbilical cord stroma)، بافت های متنوع بدن مانند: پانکراس، ریه، کبد، پریوستئوم، سینوووم، ماهیچه اسکلتی، پالپ دندان، بافت چربی، مایع آمنیوتیک و خون بند ناف اشاره کرد(۲۶).

MSCها در مغز استخوان به طور وسیعی شناسایی شده‌اند و تمایز آنها به استخوان، چربی، غضروف، ماهیچه، اپیتلیوم و سلول‌های پروژنیتور عصبی بررسی شده است. در سال‌های اخیر پژوهشگران علاقه بسیار زیادی به انعطاف تکوینی و پتانسیل تمایزی سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت چربی نشان داده‌اند(۲۷).

۴-۱-۱- بافت چربی:

بافت چربی یک بافت همبند معمولی است که در آن سلول‌های چربی (آدیپوسیت) فراوان‌ترند. این سلول‌ها ممکن است به صورت جداگانه یا به همراه هم در داخل بافت همبند قرار بگیرند. این سلول‌ها اغلب به صورت توده های بزرگی بوده که بافت چربی را ساخته و در تمام بدن پراکنده‌اند. بنابراین بافت چربی، یکی از بزرگترین اندام‌های بدن است(۲۸).

بافت چربی حداق در پستانداران به سه دسته مختلف تقسیم می‌شود که دارای جایگاه، ساختمان، رنگ و ویژگی‌های پاتولوژیک مختلف می‌باشند. این سه گروه عبارتند از: بافت چربی قهوه‌ای(BAT) تصویر A، بافت چربی سفید(WAT) تصویر B، بافت چربی مغز استخوان(BMAT).



دو گروه اول BAT و WAT در توازن انرژی در بدن دخیلند ولی عکس هم عمل می‌کنند. به طوریکه BAT در سرما به عنوان تولید کننده حرارت عمل می‌کند در حالیکه WAT بیشتر در ذخیره انرژی دخالت دارد و امروزه به عنوان اندام اندوکرین به حساب می‌آید. همانطور که اشاره شد جایگاه این بافت‌ها متفاوت از یکدیگرند. بافت چربی قهوه‌ای در موش‌ها و بسیاری از پستانداران دیگر بیشتر در اطراف کمربند شانه‌ای دیده می‌شود. بافت چربی سفید تقریباً تمام چربی بدن فرد بالغ را شامل می‌شود. دو عامل سن و جنس در نحوه پخش و تراکم ذخایر چربی دخیلند(۲۸).

تحقیقات کمی بر روی بافت چربی مغز استخوان صورت گرفته است. در انسان سالم تعداد و اندازه آدیپوسیت ها در مغز استخوان با افزایش سن بالا می‌رود و این در حالی است که با کاهش خونسازی در این نواحی روبرو هستیم (۲۹).

بافت چربی سفید، بهترین نوع بافت چربی با دسترسی بالا برای استفاده از سلول‌های بنیادی می‌باشد؛ که پس از کشت اولیه، سلول‌های پیش ساز چربی از آن جدا شده و فقط در محیط سلول‌های بنیادی چربی (Adipose-Derived Stem Cell (ADSC)) باقی می‌مانند(۲۹).

۵-۱-۱- سلول‌های بنیادی گرفته شده از بافت چربی:

تحقیقات گروه‌های مختلف نشان دادند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی گرفته شده از بافت چربی توانایی تمایز به گروه‌های مختلف بافتی را دارا هستند(۳۰). این بافت دارای سلول‌های بنیادی چند توان است که با توجه به تحقیقاتی که انجام شده می‌تواند به استخوان، غضروف، چربی و سلول‌های تشکیل دهنده آئورت تبدیل شود(۳۱). اسامی مختلفی به این سلول‌ها در طول زمان داده شده که نشان دهنده رشد و توسعه اطلاعات در مورد این بافت بوده است. در ابتدا به این سلول‌ها، سلول‌های جدا شده از بافت چربی(processed lipoaspirate (PLA)cells) می‌گفتند. سپس به آنها سلول‌های بنیادی مشتق شده از چربی(adipose-derived stem cells)، (adipose-derived stromal cells) گفته شد. بافت چربی منبع غنی از سلول‌های بنیادی است، فراوانی سلول‌های بنیادی در بافت‌های چربی محدوده‌ای بین ۱۰۰ تا ۱۵۰۰ سلول می‌باشد و این مقدار بسیار بیشتر از آن چیزی است که در مغز استخوان یافت می‌شود. این سلول‌ها همانند سلول‌های بنیادی مغز استخوان به کف ظرف پلاستیکی کشت می‌چسبند و از لحاظ بررسی مارکرها حدوداً مشابه عمل می‌کنند. این سلول‌ها نسبت به مارکرهای سطحی سلول‌های خونساز منفی عمل کرده و نسبت به مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مثبت هستند(۳۱).

۶-۱-۱- مارکرهای سلول‌های بنیادی (Stem Cell Markers):

الف) مارکرهای سلول‌های بنیادی جنینی:

۱) SSEAs(Stage Specific Embryonic Antigens):

این آنتی‌ژنها بنام آنتی‌ژن‌های ویژه مرحله رشد و نموی جنینی در سطح سلول‌های جنین موش در پیش از لانه گزینی(در مرحله هشت سلولی) بیان می‌شوند(۳۲).

۲) آلکالین فسفاتاز(alkaline phosphatase):

سلول‌های تمایز نیافته جنینی میزان بالایی از فعالیت آلکالین فسفاتازی را هم در سطح خود و هم در سیتوپلاسم نشان می-دهند(۳۳).

۳) nanog:

این فاکتور رونویسی یک پروتئین هومئودمین است که اختصاصاً در سلول‌های پرتوان قبل از لانه گزینی در موش، انسان و میمون بیان می‌شود. بیان زیاد این پروتئین اهمیت زیادی در بازسازی سلول های بنیادی جنینی دارد.(۳۴ و ۳۵)

۴) Sox2:

این فاکتور رونویسی به همراه OCT4 به پروموتور Nanog متصل می‌شود و آن را فعال می‌کنند. همکاری این سه پروتئین منجر به سرکوب بسیاری از ژنها در جهت عدم تمایز در سلول‌های بنیادی می‌شود.(۳۶)

۵) OCT4 :

ژن Oct-4 در ساختارهای پرتوان دوران جنینی بیان می‌شود. بیان آنها در دوران جنینی به ترتیب در سلول‌های مورولا، توده سلولی داخلی(ICM)، اپی بلاست و سلول‌های زاینده جنسی که سلول‌های پرتوان می‌باشند محدود است. این ژن در بافت-های تمایز یافته بیان نمی‌شود. در بافت‌های بالغ، بسیار کم نشان داده شده است. (۳۷)

ب) مارکرهای سلول‌های بنیادی بالغ:

Oct-4:

ژن Oct-4 متعلق به خانواده فاکتورهای رونویسی POU می‌باشد، این خانواده در تنظیم ژن هدف در طول تکوین دخالت دارند (۴۰). ژن Oct-4 در ۵ اگزون خلاصه می‌شود که تولید یک mRNA با وزن تقریبی ۱.۵ kb را می‌کند. این ژن در موش بر روی کروموزوم ۱۷واقع شده است. ژن Oct-4 فقط در گونه های پستانداران یافت شده است. اسیدآمینه‌های توالی این ژن در انسان و موش دارای ۸۷٪ همولوژی است با این تفاوت که ژن بیان کننده Oct-4 در انسان بر روی کروموزوم ۶ قرار گرفته است. بیان این پروتئین در ابتدا در سلول اووسیت لقاح نیافته صورت می‌گیرد و در ناحیه پرونوکلئوس قرار دارد. پس از لقاح میزان بیان Oct-4 به طور قابل ملاحظه ای کم می‌شود اما هنوز به میزان بالایی در سلول‌های جنینی تا مرحله مرولا بیان می‌شود. سپس وقتی سلول‌های خارجی مرولا به تروفواکتودرم تبدیل می‌شوند بیان این ژن بسیار کاهش می‌یابد،

در حالیکه بیان آن محدود به ICM شده است. قابل ذکر است که بیان این ژن در PGCها نیز به وضوح دیده می‌شود. بیان این ژن هر چه به سمت تمایز پیشروی می‌کنیم کم و کمتر می‌شود. در نتیجه می‌توان بیان کرد که یک رابطه مستقیم بین بیان Oct-4 و عدم تمایز وجود دارد.

اخیراً بیان ژن Oct-4 در بافت‌های بالغ نظیر بافت کبد، پستان، پانکراس، کلیه، مزانشیمی و پوست در سطح mRNA و پروتئین بررسی شده و مشخص شد که بیان Oct-4 در این بافت‌ها منحصراً در بن‌یاخته‌های بافتی اتفاق می‌افتد. نقش این ژن در مهار تمایز بن یاخته‌های جنینی و پرتوان و چند توان به خوبی مطالعه شده است(۳۷).

۷-۱-۱- مارکرهای سلول‌های مزانشیمی (Mesenchymal Cell Markers):

بافت چربی شامل سلول های مزانشیمی است که با بررسی های فلوسایتومتری نشان داده شده که این سلول ها نسبت به مارکرهای CD63, CD13, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166, CD29, CD49e, CD29, CD73, مثبت هستند(۳۸، ۳۹)و نسبت به مارکرهای خونی CD34, CD3, CD19, CD45, CD14, CD117, CD31, CD62L, CD95L منفی می باشند (۳۹) .

۲-۱- رشد و نمو چشم (Development of Eye)

در مهره‌داران تشکیل چشم با رشد به بیرون دیانسفالن (Diencephalon) شروع میشود که در سطح خود با اکتودرم سری میانکنش می دهد تا عدسی چشمی ایجاد گردد. حباب بینایی با منشاء دیانسفالن به دو لایه و در دو مسیر مجزا تمایز می یابد. سلولهای لایه خارجی تولید پیگمان ملانین را میکنند و در نهایت شبکیه پیگماندار(Pigmented Retina) می شوند. سلولهای لایه داخلی انواع سلولهای گلیایی، گانگلیونی، اینترنورون و نورونهای گیرنده نور را بوجود می آورند که در مجموع آنها تشکیل شبکیه عصبی (Neural Retina) را می دهند. با ادامه رشد و نمو، جام بینایی (Optical Cup) اکتودرم سطحی خود را القاء می کند تا تمایل خاصی (Bias) برای تشکیل عدسی چشم در اکتودرم سری پیدا شود. با جداشدن عدسی چشم از اکتودرم و تماس عدسی با اکتودرم جدید در سطح خود، با عمل القایی عدسی بخش بعدی چشم یعنی قرنیه (Cornea) از اکتودرم سطحی بوجود می آید (۴۱).

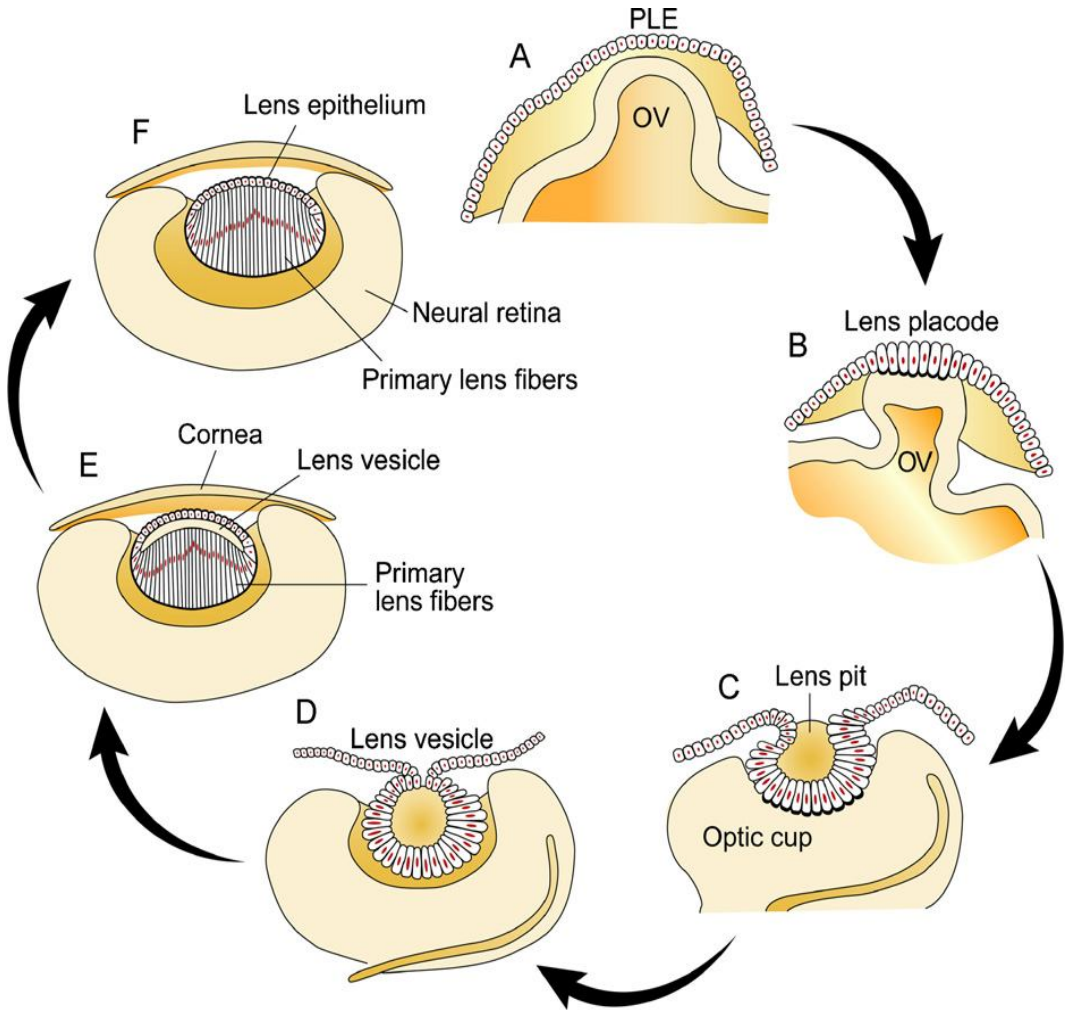
۳-۱- رشد و نمو عدسی چشم (Development of Eye Lens)

اولین جنین شناسان با استفاده از روش پیوند زدن (Transplant) جام بینایی قصد در آشکار سازی نقش جام بینایی در تکوین عدسی داشتند. این تجربیات نشان داد که در نبود جام بینایی هم می‌توان ساختاری شبیه عدسی ایجاد کرد که البته در

موش وجود جام بینایی یک عنصر ضروری برای القا عدسی به حساب می‌آید(۴۲). ادامه این تجربیات توسطFisher و Grainger نشان داد که القاء عدسی چشم پدیده‌ای پیچیده متشکل از چهار مرحله است که شامل : شایستگی (Competence)، تمایل خاص (Bias)، تخصص یابی (Specification) و تمایز (Differentiation) می باشد (۴۳). در القاء عدسی، ژن Pax6 در راس سیستم تنظیمی قرار دارد(۴۴). مطالعات بر روی موشهای جهش یافته نشان می دهند که (Fibroblast Growth Factors (FGFs (۴۵) و (Bone Morphpgenetic Protein(BMP7 (۴۶) برای القاء عدسی مورد نیاز بوده و با همکاری بیان ژن Pax6 را راه اندازی می کنند (۴۷).

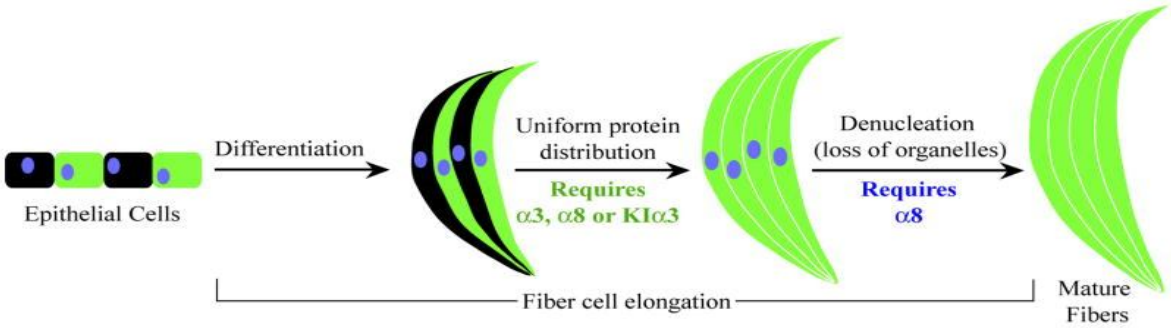
در مراحل اولیه مورفوژنز عدسی ارتباط نزدیکی بین پیش ساز عدسی و حباب بینایی وجود دارد و بین آنها یک شکاف باریکی هست که هیچ نوع بافت مزودرمی در این شکاف وارد نشده است. در این زمان بین اکتودرم عدسی و حباب بینایی زواید سیتوپلاسمی گسترش یافته اند. در این مرحله پیش ساز عدسی ضخیم شده و تشکیل پلاک عدسی (Lens Placode) را میدهد که به داخل فرو رفته و چال عدسی (Lens Pit) را به وجود می آورد (۴۸). یک ماتریکس بین سلولی، شامل لامینین و فیبرونکتین بین دو بافت، چال عدسی و جام بینایی ترشح می شود که مهاجرت، تمایز و فنوتیپ سلولها را تحت تاثیر قرار می دهد (۴۹). چال عدسی عمیق تر شده تبدیل به جام عدسی (Lens Cup) گردیده و از اکتودرم سطحی به صورت حباب عدسی (Lens Vesicle) جدا می شود. در مرحله بعدی رشد و نمو، سلولهای نیمه خلفی حباب عدسی طویل شده و تشکیل سلولهای فیبری اولیه را می دهند و در حالی که سلولهای نیمه قدامی به اپی تلیوم تمایز می یابند(شکل ۱-۱). در ناحیه اپی تلیومی تقسیمات میتوزی در بالای ناحیه استوایی عدسی انجام می گیرد (۵۰).

در نیمه خلفی، عدسی چشم با ماده ای بنام زجاجیه (Vitreous Body) که از جام بینایی منشاء میگیرد در تماس بوده که نقش القایی بر روی تمایز سلولهای خلفی حباب عدسی داشته و باعث ایجاد قطبیت عدسی چشم میشود. مهمترین عامل موجود در زجاجیه خانواده فاکتورهای FGF از جمله FGF-1 و FGF-2 هستند که باعث القاء بیان ژنهای Crystallin ، طویل شدن و تخصص یابی ساختاری در سلولهای فیبری میگردند (۵۲).



شکل ۱-۱- مراحل تکوین عدسی چشم در جنین موش: A) عدسی مهره‌داران از یک صفحه از اکتودرم که تحت القائات چندگانه‌ای در مرحله گاسترولاسیون قرار گرفته است، ایجاد می‌شود. میانکنش بین اکتودرم عدسی احتمالی (PLE) و حباب بینایی (OV) از مغز قدامی منجر به ضخیم شدگی PLE و در نهایت ایجاد پلاک عدسی می‌شود. B و C) درون فرو رفتگی پلاک عدسی و ایجاد چال عدسی که منجر به ایجاد حباب عدسی می‌شود. D) سلول‌ها در ناحیه جلویی حباب لنزی تکثیر می‌شوند و به سمت اپیتلیالی شدن پیش می‌روند، وحال آنکه سلول‌هایی که در ناحیه عقبی حباب لنزی قرار گرفته‌اند با افزایش طول خود به سلول‌های اولیه فیبری تبدیل می‌شوند. E) سلول‌های فیبر ثانویه عدسی از تکثیر و تمایز سلول‌های اپیتلیومی که در ناحیه استوای حباب لنزی واقع شده ایجاد می‌شود. F) سپس عدسی چشم در طول زندگی مهره دار رشد می‌کند و سلول‌های جدید فیبری بر روی سلول‌های قدیمی‌تر قرار می‌گیرند. در این سلول‌ها هیچ بازگشتی وجود ندارد و سلول‌های ثانویه فیبری لنز تا آخر به همین صورت باقی می‌مانند(۵۱).

با شروع سنتز پروتئین های کریستالین سلولهای اپیتلیالی طویل شده و به سلولهای فیبری تمایز می یابند. از پروتئین های کریستالینی ابتدا α-Crystallin و سپس در مراحل بعدی β –Crystallin و γ-Crystallin بیان میشوند. با اجتماع این پروتئین ها سلولهای فیبری عدسی، هسته و سایر اندامک ها را از دست داده و شفاف میگردند (شکل ۲-۱) (۵۳).



شکل ۲-۱- تمایز سلولهای فیبری از سلولهای اپیتلیالی: با سنتز کریستالین ها و اجتماع آنها در داخل سلولهای اپیتلیالی، این سلولها طویل شده و هسته و سایر اندامکهای درون سلولی را از دست داده و شفاف میگردند(۵۴).

عدسی چشم انسان در طول زندگی رشد دارد ولی با افزایش سن نرخ این رشد کاهش می یابد. سلولهای اپیتلیومی عدسی پیش سازهای سلولهای فیبری بوده که تمایز توسط بسیاری از فاکتورهای رشد و پروتئینهای سیگنال دهنده تنظیم میشود (۵۵).

۱-۴- زجاجیه (Vitreous Body)

٪۸۰ حجم داخلی چشم را زجاجیه تشکیل داده است. این ماده، شفاف بوده و حامی بافتهای اطراف می باشد. زجاجیه از ترکیبهای رشته ای کلاژنی تشکیل شده است. بررسی های ایمونوهیستوشیمی نشان می دهد که بیشتر، کلاژن نوعII، مشابه آنچه که در غضروف یافت می شود و به مقدار کمتر، کلاژن نوع IV و IX حضور دارند. در زجاجیه کندروایتین و هپاران سولفات و اسیدهیالورونیک وجود دارند. اسید هیالورونیک و رشته های کلاژن یک حالت ژله ای به زجاجیه می دهد (۵۶). در زجاجیه میزان بالایی از فاکتورهای رشد فیبروبلاستی Fibroblast Growth Factors (FGFs) ازجمله FGF1 وFGF2 وجود دارد (۵۷).