پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد علوم جانوری(گرایش سلولی-تکوینی)

تحت عنوان:

بررسی اثر سدیم آرسنیت بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ به استئوبلاست

توسط:

زهرا جعفری یزدی

استاد راهنما:

دکتر ملک سلیمانی مهرنجانی

دکتر محمدحسین آبنوسی

استاد مشاور:

دکتر سید محمدعلی شریعت زاده

دانشگاه اراک

بسم الله الرحمن الرحيم

ستایش می کنم خدایی را که علی رغم تمام کاستی ها و نقایص وجودم

نعمات بی شمار خود را در اختیار این حقیر قرار داد.

رساله حاضر کوشش اندکی جهت سپاسگزاری از عنایات اوست.

اگر بپذیرد و استحقاق داشتن عنایت خود را عطا فرماید.

تقدیم به همسر عزیزم

که همفکریها، راهنمایی ها و دلسوزی هایش

همواره راه گشای من بود.

تقدیم به دو گل زندگی ام :

مادری مهربان که تمام داشته هایم را مدیون دلسوزی ها و راهنمایی ها و صبر بی کرانش، هستم و روح بزرگ پدری که همیشه سپاسگزار لطف و مهر اویم.

از توجهات بی دریغ و راهنمایی های بی شمار استاد ارجمندم جناب آقای دکتر ملک سلیمانی که زحمت راهنمایی اول این پایان نامه را بر عهده داشتند، کمال تشکر را دارم.

از استاد گرانقدرم جناب آقای دکتر محمد حسین آبنوسی به خاطر تمام زحمات و راهنمایی هایشان در طی این مدت که زحمت راهنمایی دوم این پایان نامه را بر عهده داشتند، سپاسگزارم.

از راهنمایی های بی شمار استاد ارجمندم جناب آقای دکتر سید محمد علی شریعت زاده که زحمت مشاورت این پایان نامه را بر عهده داشتند، سپاسگزارم.

از دوستان و همکاران در آزمایشگاه سلولی- تکوینی جناب آقای دکتر مهدیه، آقای فراهانی، خانم منیره محمودی، جناب آقای بنه، جناب آقای صادقی و سایر دوستان به خاطر کمک ها و راهنمایی های ارزشمندشان متشکرم.

چکیده:

سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان(MSCs)، سلول‌هایی چندتوان هستند که توانایی تمایز به سلولی دیگر مانند استئوبلاست، کندروبلاست و آدیپوسیت را دارند. آرسنیک شبه فلزی است که از طرف آژانس سرطان شناسی جزء گروه I کارسینوژن‌های انسانی طبقه بندی شده است.مطالعاتی که تا کنون در مورد تاثیر سدیم آرسنیت بر روی سلول های مختلف انجام گرفته همگی اثر این نمک را در غلظت های بیشتر از غلظت مجاز ppm ۱۰ و در کوتاه مدت بررسی کرده اند. با توجه به وجود سدیم آرسنیت بعنوان یک آلاینده زیست محیطی بخصوص در جوامع صنعتی و تماس مداوم انسان با آن از طریق آب و مواد غذائی تاثیر دوز پایین در مدت زمان طولانی این آلاینده بر MSCs و میزان تمایز به استئوبلاست بررسی شد.

پس از استخراج و کشت MSCs رت بالغ،سلول‌های پاساژ ۳ طی ۲۱ روز در معرض دزهای مختلف سدیم آرسنیت(SA)(۰/۰۰۱ تا ۱۰۰ نانومولار)قرار گرفتند و توانایی حیات سلول‌ها از طریق تست تریپان بلو و MTT ارزیابی شد.در ادامه دوزهای ۰/۸ و۲۵ نانومولار برای ادامه کار انتخاب شد. توان تکثیر سلول‌ها به وسیله تستCFC و PDN سنجیده شد.مورفولوژی سلول‌ها توسط رنگ‌های فلورسنس و وقوع آپوپتوزیس توسط تست‌های DNA Ladder، کاسپاز، کامت و تانل ارزیابی شد. تاثیر SA بر میزان تمایز استئوبلاستی MSCs از طریق تست‌های MTT، آلیزارین رد، سنجش میزان رسوب کلسیم و میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز ارزیابی شد.نتایج نشان داد دوز کم سدیم آرسنیت طی۲۱ روز موجب کاهش توانائی زیستی MSCs و کاهش میزان تمایز استئوبلاست شد.کاهش توانائی زیستی در نتیجه آپوپتوزیس وابسته به کاسپاز بود.تماس طولانی مدت با دوز کم این آلاینده می تواند بقای سلول‌های بنیادی بالغ موجود در بافت‌های مختلف را تحت تاثیر قرار دهد.در ادامه این تحقیق پیشنهاد می گردد در محیط ها و شهر های صنعتی احتمال بروز بیماری هائی مانند پوکی استخوان و رابطه آن با این آلاینده مورد بررسی قرار گیرد.

فهرست مطالب

فصل اول (مقدمه)

۱-۱. سلول‌های بنیادی ۲
۱-۱-۱. خصوصیات سلول های بنیادی ۲
۱-۱-۱-۱. خودنوزایی ۲
۱-۱-۱-۲. پتانسیل تمایز ۳
۱-۱-۲. پلاستیسیتی سلول های بنیادی ۳
۱-۱-۳. انواع سلول‌های بنیادی ۴
۱-۱-۳-۱. تقسیم بندی سلول‌های بنیادی بر اساس توان تمایز ۴
۱- همه‌توان ۴
۲- پرتوان ۵
۳- چندتوان ۵
۴- تک‌توان ۵
۱-۱-۳-۲. تقسیم بندی سلول‌های بنیادی براساس منشاء ۵
۱-۱-۳-۲-۱. سلول های بنیادی جنینی ۵
۱-۱-۳-۲-۲. سلول های بنیادی خون بند ناف ۶
۱-۱-۳-۲-۱. سلول های بنیادی بالغین ۶
۱-۲. تاریخچه شناسایی سلول های بنیادی مزانشیم ۸
۱-۲-۱. خصوصیات سلول های بنیادی مزانشیم ۱۰
۱-۲-۱-۱. خصوصیات مورفولوژیکی سلول های بنیادی مزانشیم ۱۱
۱-۲-۱-۲. چرخه سلولی سلول‌های بنیادی مزانشیم ۱۱
۱-۲-۱-۳. ایمنوفنوتیپ سلول‌های ۱۲
۱-۲-۱-۴. پلاستیسیتی در سلول‌های بنیادی مزانشیم ۱۲
۱-۲-۲. استخراج و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیم ۱۳
۱-۲-۳. محل استقرار سلول‌های بنیادی مزانشیم ۱۴
۱-۳. سیستم اسکلتی ۱۴
۱-۳-۱. استئوبلاست ۱۵
۱-۳-۲. ماتریکس استخوانی ۱۶
۱-۳-۳. مغز استخوان ۱۷
۱-۳-۴. مسیرهای تشکیل استخوان ۱۸

۱-۳-۵. شرایط آزمایشگاهی لازم برای تمایز سلول های مزانشیم مغز استخوان به استئوبلاست ۱۸
۱-۳-۶. فاکتورهای رونویسی تنظیم کننده استئوبلاستوژنز ۱۹
۱-۳-۷. نقش مسیر سیگنالی Wnt در تمایز سلول های مزانشیم به استئوبلاست ۲۰
۱-۳-۸. مکانیسم مسیر سیگنال‌دهی کانونیکال-بتا کاتنین ۲۲
۲-۳-۹. نقش مسیر کونونیکال Wnt در پروسه استخوان‌سازی ۲۳
۱-۳-۱۰. آنزیم آلکالین فسفاتاز ۲۴
۱-۴. مرگ سلولی ۲۵
۱-۴-۱. نکروزیس ۲۵
۱-۴-۲. آپوپتوزیس ۲۶
۱-۴-۲-۱. خصوصیات سلول‌های آپوپتوزیس ۲۷
الف-تغییرات مورفولوژیک ۲۷
ب-تغییرات بیوشیمیایی ۲۷
۱-۴-۲-۲. مسیرهای وقوع آپوپتوز ۲۸
۱-۴-۲-۲-۱.مسیر مستقل از سیتوکروم c ۲۸
۱-۴-۲-۲-۲. مسیر وابسته به سیتوکروم C ۲۸
۱-۴-۳. کاسپازها ۳۰
۱-۵. معرفی عنصر آرسنیک ۳۱
۱-۵-۱. انواع گونه‌های آرسنیک ۳۳
۱-۵-۲. متابولیسم آرسنیک در پستانداران ۳۴
۱-۵-۳. خصوصیات سمی آرسنیت ۳۵
۱-۵-۴. آرسنیت و القای آپوپتوزیس ۳۵
۱-۶. مروری بر مطالعات گذشته ۳۹
۱-۶-۱. بررسی اثر آرسنیت بر مراحل جنین‌زایی ۳۹
۱-۶-۲. بررسی اثر آرسنیت بر سلول‌های فیبروبلاست انسان ۳۹
۱-۶-۳. اثر آرسنیت بر سلول های لنفوسیت انسانی ۴۰
۱-۶-۴. اثر آرسنیت بر سلول های میوبلاست ۴۰
۱-۶-۵. اثر سدیم آرسنیت در سلول های NB4 ..... ۴۰
هدف مطالعه ۴۰

فصل دوم (مواد و روش‌ها)

۲-۱. انتخاب حیوان ۴۳
۲-۲. جدا سازی وکشت سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان ۴۳
۲-۲-۱. اجرای پاساژ ۴۴
۲-۲-۲. اثبات مزانشیم بودن سلول‌های استخراج شده ۴۶
۲-۳-۱. تمایز به استخوان ۴۶
۲-۲-۲-۲. مراحل رنگ آمیزی آلیزارین رد ۴۶
۲-۳. بررسی توان زیستی سلول‌ها(دوز فایندینگ) ۴۷
۲-۳-۱. بررسی حیات سلولی به کمک تریپان بلو ۴۷

۲-۳-۱-۱. مراحل رنگ آمیزی تریپان بلو ۴۸
۲-۳-۲. بررسی حیات سلول بر پایه‌ی رنگ سنجی (MTT) ۴۹
۲-۳-۳. ترسیم منحنی استاندارد با استفاده از سنجش تترازولیوم ۴۹
۲-۳-۵. مراحل انجام تست MTT استئوژنیک ۵۱
۲-۴. انتخاب دز مورد نظر ۵۱
۲-۵. بررسی توان تکثیری سلول‌های بنیادی مزانشیم ۵۲
۲-۵-۱. توانایی تشکیل کلونی ۵۲
۱-۵-۱-۱. سنجش پتانسیل کلنی زایی ۵۳
۲-۵-۱-۲. رنگ آمیزی کریستال ویولت ۵۳
۲-۵-۲. محاسبه تعداد دو برابر شدگی جمعیتی ۵۴
۲-۵-۲-۱. روش انجام تست PDN ۵۴
۲-۶. بررسی آپوپتوزیس ۵۵
۲-۶-۱. بررسی تغییراتمورفولوژیکی با استفاده ازرنگ‌های فلورسنس ۵۵
۲-۶-۲.DNA Ladder ۵۷
۲-۶-۲-۱. مراحل انجام تستDNA Ladder ۵۸
۲-۶-۲-۱-۱. استخراج DNA سلول ۵۸
۲-۶-۳. بررسی مولکولی سیتوپلاسم با استفاده از کیت کاسپاز۳ ۶۰
پروتکل تست کاسپاز۳ ۶۰
۲-۶-۴. آزمون کامت ۶۱
۲-۶-۴-۱. آماده سازی لام‌ها ۶۲
۲-۶-۴-۲. لیز کردن سلول‌ها ۶۳
۲-۶-۴-۳. تیمار قلیایی سلول‌ها ۶۳
۲-۶-۴-۴. الکتروفورز سلول‌ها ۶۳
۲-۶-۴-۵. خنثی سازی و تثبیت ۶۳
۲-۶-۴-۶. رنگ آمیزی ۶۴
۲-۶-۴-۷. بررسی میکروسکوپی و عکس برداری ۶۴
۲-۶-۵. تکنیک تانل ۶۴
۲-۷.بررسی روند تمایز ۶۷
۲-۷-۱. انجام تست MTT برای سلول‌های تمایز یافته ۶۷
۲-۷-۱-۱. مراحل انجام تست MTT استئوژنیک ۶۷
۲-۷-۲. سنجش میزان رسوب ماتریکس معدنی به کمک استخراج رنگ آلیزارین رد ۶۷
۲-۷-۲-۱. رسم منحنی استاندارد برای رنگ‌آمیزی آلیزارین رد ۶۸
۲-۷-۲-۲. بررسی میزان رسوب ماتریکس استخوانی در نمونه های تیمار شده ۶۹
۲-۷-۳. بررسی میزان رسوب کلسیم با استفاده از کیت کلسیم به روش رنگ سنجی ۷۰
۲-۷-۴. بررسی میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز ۷۲
۲-۷-۴-۱. طرز تهیه منحنی استاندارد ۷۳
۲-۷-۴-۲. بررسی میزان فعالیت آنزیم درسلول های تیمار شده استئوژنیک و غیراستئوژنیک ۷۴

۲-۷-۵. بررسی تغییرات مورفولوژیکی در نمونه های استئوژنیک با استفاده از رنگ آمیزی فلورسنس.....۷۴
۲-۸. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها.....۷۵
فصل سوم (نتایج)
الف- نتایج مرحله استخراج سلول‌ها و انتخاب دوز موثر ۷۸
۳-۱. رشد و تکثیر سلول های بنیادی مزانشیم ۷۸
۳-۲. اثر سدیم آرسنیت بر توانایی زیستی سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت.....۷۹
۳-۲-۱. توانایی زیستی سلول های مزانشیم بر پایه جذب تریپان بلو ۷۹
۳-۲-۲. روش MTT (رنگ سنجی).....۷۹
انتخاب دز موثر ۸۱
ب- نتایج اثر دوزهای انتخابی سدیم آرسنیت بر توانایی کلنی زایی، تعداد دو برابرشدگی جمعیت سلولی و آپوپتوزیس ۸۱
۳-۳. اثر سدیم آرسنیت بر توان تکثیری سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت.....۸۱
۳-۳-۱. سنجش توانایی کلنی زایی.....۸۱
۳-۳-۱-۱. تعداد کلنی.....۸۱
۳-۳-۱-۲. قطر کلنی.....۸۳
۳-۳-۲. محاسبه تعداد دو برابر شدگی جمعیت سلول‌ها.....۸۴
۳-۴. آپوپتوزیس.....۸۵
۳-۴-۱. بررسی تغییرات مورفولوژیک با استفاده از رنگ آمیزی فلورسنس ۸۵
۳-۴-۲. DNA Ladder.....۸۸
۳-۴-۳. کاسپاز ۸۸
۳-۴-۴. آزمون کامت.....۸۹
۳-۴-۵. تانل.....۹۱
ج- نتایج اثر دوزهای انتخابی سدیم آرسنیت بر شاخص‌های تمایز به استئوبلاست.....۹۲
۳-۵. توانائی زیستی سلول‌ها در روند تمایز ۹۲
۳-۵-۱. روش MTT (رنگ سنجی).....۹۲
۳-۵-۲. میزان معدنی شدن ماتریکس با سنجش رنگ آلیزارین رد.....۹۴
۳-۵-۳. میزان رسوب کلسیم.....۹۶
۳-۵-۴. میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز ۱۰۰
۳-۵-۵. بررسی تغییرات مورفولوژیکی با استفاده از رنگ آمیزی فلورسنس در نمونه های استئوژنیک.....۱۰۳
فصل چهارم (بحث)
فصل پنجم (پیوست‌ها)
۵-۱. روش تهیه محیط کشت ۱۱۶
۵-۲. تهیه‌ی فسفات بافر سالین مثبت PBS^{+}.....۱۱۶
۵-۳. تهیه‌ی فسفات بافر سالین PBS^{-}.....۱۱۷
۵-۴. روش تهیه محیط تمایزی استئوژنیک ۱۱۷
۵-۵. آماده سازی آلیزارین رد.....۱۱۸
۵-۶. روش تهیه محلول تریپان بلو۰/۴ درصد ۱۱۸

۵-۷. روش تهیه‌ی محلول MTT ۱۱۸
۵-۸. روش تهیه کریستال ویولت ۱۱۸
۵-۹. آماده سازی بافر PBS/T ۱۱۸
۵-۱۰. روش تهیه‌ی محلول آگارز با نقطه‌ی ذوب معمولی ۱۱۹
۵-۱۱. روش تهیه محلول آگارز با نقطه ذوب پائین ۱۱۹
۵-۱۲. محلول لیز کننده ۱۱۹
۵-۱۳. بافر الکتروفورز ۱۲۰
۵-۱۴. بافر خنثی ۱۲۰
۵-۱۵. آماده سازی پارافرمالدهید ۴٪ ۱۲۰
۵-۱۶. روش تهیه محلول تریتون X-100 در سدیم سیترات ۱۲۰
۵-۱۷. روش تهیه‌ی محلول DAB ۱۲۱
۵-۱۸. بافر استخراج آنزیم آلکالین فسفاتاز ۱۲۱
۵-۱۹. روش لاوری ۱۲۱
۵-۱۹-۱. تهیه‌ی نمودار استاندارد برای آزمایش لاوری ۱۲۱
۵-۱۹-۲. روش تهیه‌ی محلول BSA ۱۲۲
۵-۱۹-۳. روش تهیه‌ی محلول کمپلکس ۱۲۲
فصل ششم (منابع و مآخذ)

فهرست اشکال

شکل۱-۱. تصویر شماتیک از توانایی خودنوزایی و پتانسیل تمایز در سلول های بنیادی ۳
شکل۱-۲. تصویر شماتیک از سلول‌های بنیادی جنینی ۶
شکل۱-۳. تصویر شماتیک از فیبروبلاست‌های غیرفعال ساکن در بافت که به سمت بافت‌های در حال ترمیم پراکنده می‌شوند. ۹
شکل۱-۴. تصویر سلول بنیادی مزانشیم ۱۱
شکل۱-۵. تصویر شماتیک توانایی تمایز سلول های بنیادی مزانشیم به استئوبلاست ۱۳
شکل۱-۶. تصویر شماتیک تشکیل استئوبلاست ها از سلول های بنیادی مزانشیم ۱۶
شکل۱-۷. تصویر شماتیک دو نوع سلول بنیادی در مغز استخوان ۱۸
شکل۱-۸. ساختار مولکولی دگزامتازون ۱۹
شکل۱-۹. تصویر شماتیک از آزاد شدن Wnt از شبکه آندوپلاسمی ۲۱
شکل۱-۱۰. تصویر شماتیک از مکانیسم مسیر سیگنال‌دهی کانونیکال-بتا کاتنین ۲۲
شکل۱-۱۱. توانایی تمایز سلول های بنیادی مزانشیم به استئوبلاست و کندروسیت ۲۴
شکل۱-۱۲. تصویر شماتیک مرگ سلولی از نوع نکروزیس ۲۵
شکل۱-۱۳. تصویر شماتیک مرگ سلولی از نوع آپوپتوزیس ۲۷
شکل۱-۱۴. تصویر شماتیک از به هم پیوستن مسیرهای داخلی و خارجی شرکت کننده در ایجاد آپوپتوزیس ۲۹
شکل۱-۱۵. ساختار شیمیایی سدیم آرسنیت ۳۱
شکل۱-۱۶. آرسنیک در سلول باعث فعال شدن یکسری از آنزیم‌های متعلق به گروه کاسپازها می شود ۳۶
شکل۱-۱۷. آرسنیت باعث آزاد شدن سیتوکروم c از میتوکندری می شود ۳۷
شکل۱-۱۸. تاثیر آرسنیت بر روی مسیر سیگنالی Wnt/β-Catenin ۳۸
شکل۲-۱. نمایی از لام نئوبار ۴۵
شکل۲-۲. ساختار آلیزارین ردS ۴۷
شکل۲-۳ ساختار تریپان بلو ۴۷
شکل۲-۴. تغییر ساختار رنگ تترازولیوم بر اثر آنزیم های میتوکندریایی و تولید بلور فورمازان ۵۰
شکل۲-۵. مراحل انجام تست MTT ۵۰
شکل۲-۶. تمایز کلونی‌های حاصل از سلول‌های مزانشیم به رده‌های دیگرسلولی ۵۳
شکل۲-۷. ساختار کریستال ویولت ۵۴
شکل۲-۸. ساختار رنگ فلورسنت هوخست ۵۶

شکل۲-۹. ساختار پروپیدیوم آیوداید ۵۶
شکل۲-۱۰. ساختار مولکولی آکریدین اورنژ ۵۷
شکل ۲-۱۱. نواحی شکستگی‌های DNA در آپوپتوزیس ۵۸
شکل۲-۱۲. مراحل تست کاسپاز ۶۰
شکل۲-۱۳. کیت کاسپاز مورد استفاده ۶۱
شکل۲-۱۴. مراحل آزمون کامت ۶۲
شکل۲-۱۵. ساختار مولکولی اتیدیوم برماید ۶۴
شکل۲-۱۶. تست تانل ۶۶
شکل۲-۱۷. غلظت های مشخص مورد استفاده در رسم منحنی استاندارد ۶۸
شکل۲-۱۸. استخراج رنگ آلیزارین رد به کمک اسیداستیک ۱۰ درصد ۶۹
شکل۳-۱. مراحل رشد سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت ۷۹
شکل۳-۲. رنگ آمیزی فلورسنس سلول بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت با رنگ هوخست ۸۶
شکل۳-۳. رنگ آمیزی آکریدین اورنژ سلول بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت ۸۷
شکل۳-۴. الکتروفورز DNA در ژل آگارز ۸۸
شکل۳-۵. تست کاسپاز ۸۹
شکل۳-۶. تست کامت ۹۰
شکل۳-۷. درجه بندی سلول ها بر اساس طول و اندازه کامت ۹۰
شکل۳-۸. تست تانل ۹۲
شکل۳-۹. ماتریکس رنگ آمیزی شده با آلیزارین رد در نمونه های استئوژنیک ۹۶
شکل۳-۱۰. رنگ آمیزی فلورسنس سلول بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت تمایز یافته به استئوبلاست با رنگ هوخست ۱۰۴
شکل۳-۱۱. رنگ آمیزی آکریدین اورنژ سلول بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت تمایز یافته به استئوبلاست ۱۰۵

فهرست جدول‌ها

جدول۲-۱. طرز تهیه محلول‌های استاندارد در تست سنجش کلسیم..... ۷۴
جدول۳-۱. مقایسه میانگین درصد توانایی زیستی سلول‌های مزانشیمی پس از تیمار با دزهای مختلف سدیم آرسنیت با روش رنگ آمیزی تریپان بلو و اثر متقابل زمان و دز..... ۸۰
جدول۳-۲. اثر متقابل دوز و زمان بر میانگین تعداد کلنی های..... ۸۲
جدول۳-۳. مقایسه میانگین تعداد کلنی های تشکیل شده توسط سلول های بنیادی مزانشیم..... ۸۲
جدول۳-۴. اثر متقابل دوز و زمان بر میانگین قطر کلنی های..... ۸۳
جدول۳-۵. مقایسه میانگین قطر کلنی های تشکیل شده توسط سلول های بنیادی مزانشیم..... ۸۴
جدول۳-۶. اثر متقابل دوز و زمان بر میانگین میزان دوبرابرشدگی جمعیت سلول های بنیادی مزانشیم..... ۸۴
جدول۳-۷. مقایسه میانگین تعداد دوبرابرشدگی جمعیت سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت..... ۸۵
جدول۳-۸. مقایسه میانگین قطر هسته در سلول‌های بنیادی مزانشیم..... ۸۶
جدول۳-۹. مقایسه میانگین درصد درجه آسیب وارد به DNA در سلول‌های مزانشیم مغز استخوان..... ۹۱
جدول۳-۱۰. اثر متقابل دوز و زمان بر میانگین میزان جذب نور مرئی در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط نمونه های استئوژنیک..... ۹۳
جدول۳-۱۱. مقایسه میانگین میزان جذب نور مرئی در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط نمونه های استئوژنیک تیمار شده با سدیم آرسنیت..... ۹۴
جدول۳-۱۲. اثر متقابل دوز و زمان بر میانگین میزان (میلی مولار) رنگ آلیزارین رد استخراج شده از نمونه های استئوژنیک..... ۹۴
جدول۳-۱۳. مقایسه میانگین میزان (میلی مولار) رنگ آلیزارین رد استخراج شده از نمونه های استئوژنیک تیمار شده با سدیم آرسنیت..... ۹۵
جدول۳-۱۴. اثر متقابل دوز و زمان بر میانگین میزان کلسیم (میلی گرم بر دسی لیتر) در نمونه های غیر استئوژنیک ۹۷
جدول۳-۱۵. مقایسه میانگین میزان کلسیم (میلی گرم بر دسی لیتر) در نمونه های غیر استئوژنیک تیمار شده با سدیم آرسنیت..... ۹۸
جدول۳-۱۶. اثر متقابل دوز و زمان بر میانگین میزان کلسیم (میلی گرم بر دسی لیتر) در نمونه های استئوژنیک تیمار شده با سدیم آرسنیت..... ۹۹

جدول۳-۱۷. مقایسه میانگین میزان کلسیم (میلی گرم بر دسی لیتر) در نمونه های استئوژنیک تیمار شده با سدیم آرسنیت ۱۰۰
جدول۳-۱۸. اثر متقابل دوز و زمان بر میانگین میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز(U/L) در نمونه های غیر استئوژنیک تیمار شده با سدیم آرسنیت ۱۰۱
جدول۳-۱۹. مقایسه میانگین میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز(U/L) در نمونه های غیر استئوژنیک تیمار شده با سدیم آرسنیت ۱۰۲
جدول۳-۲۰. اثر متقابل دوز و زمان بر میانگین میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز(U/L) در نمونه های استئوژنیک تیمار شده با سدیم آرسنیت ۱۰۲
جدول۳-۲۱. مقایسه میانگین میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز(U/L) در نمونه های استئوژنیک تیمار شده با سدیم آرسنیت ۱۰۳
جدول۳-۲۲. مقایسه میانگین قطر هسته های رنگ آمیزی شده با رنگ هوخست در نمونه های استئوژنیک ۱۰۴
جدول۵-۱. ترکیبات محیط تمایزی استئوژنیک ۱۱۷

فهرست نمودارها

نمودار۲-۱. نمودار استانداردMTT ۵۱
نمودار۲-۲. نمودار غلظت های مشخص از رنگ آلیزارین رد ۶۹
نمودار۲-۳. نمودار گراف استاندارد آلکالین فسفاتاز ۷۴

فصل اول

مقدمه

و مروری بر مطالعات گذشته

مقدمه

۱-۱. سلول های بنیادی

سلول بنیادی، سلولی است که توانایی تقسیم[1] را به مدت نامحدودی اغلب در تمام طول دوران زندگی جاندار دارد. این سلول ها را می‌توان از جنین قبل از مرحله لانه‌گزینی، خون بند ناف و یا بافت‌های افراد بزرگسال به‌دست آورد که به ترتیب به آن سلول های بنیادی جنینی، سلول‌های بنیادی بند ناف و یا سلول های بنیادی بزرگسالان می‌گویند. از نظر پتانسیل تکثیر و تمایز، سلول های بنیادی با منشاءهای مختلف، متفاوت هستند به طوری که این پتانسیل‌ها از سلول های بنیادی جنینی به سلول های بنیادی بزرگسالان کاهش می‌یابد. سلول‌های بنیادی در شرایط و تحت سیگنال‌های مناسب قادر به تمایز به انواع سلول های تخصص یافته بدن جاندار از جمله سلول های قلبی و سلول های پوست و سلول های عصبی و ... می‌باشند (۱).

۱-۱-۱.خصوصیات سلول های بنیادی:

برای آن‌که بتوانیم سلولی را جزء سلول‌های بنیادی قرار دهیم لازم است آن سلول دو خصوصیت زیر را داشته باشد:

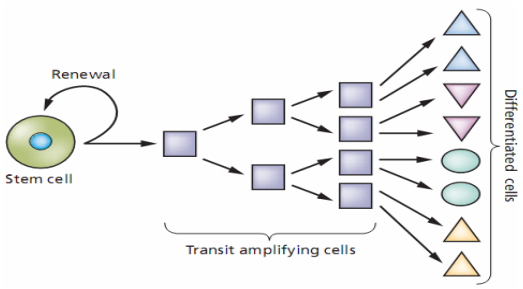
۱-۱-۱-۱.خودنوزایی[2]

سلول های بنیادی قادرند در عین تمایز نیافتگی [3]، چندین بار سیکل تقسیم سلولی را انجام داده و چندین کپی از خود را به‌وجود آورند.

[1]-Self replicate
[2]- Self renewal
[3]- Undidderentiated state

۱-۱-۱-۲.پتانسیل تمایز[1]

همان‌طور که اشاره شد سلول های بنیادی قادر به تمایز به انواع سلول های تمایز یافته از جمله سلول‌های قلبی، عصبی و ... می‌باشند(۲).(شکل ۱-۱)



شکل ۱-۱. تصویر توانایی خودنوزایی و پتانسیل تمایز را در سلول های بنیادی نشان می‌دهد(۲).

انسان و سایر پستانداران بالغ[2] بیش از ۲۰۰ نوع سلول از جمله سلول عصبی، ماهیچه‌ای، پوست، سلول های خونی دارند. همه این سلول ها از یک سلول همه‌توان[3] به نام سلول زیگوت[4] و یا سلول تخم لقاح یافته[5] مشتق شده‌اند(۱). معمولا سلول های بنیادی ابتدا یک نوع سلول حدواسط[6] را بوجود می‌آورند که به آن سلول پیش‌ساز[7] گفته می‌شود. این سلول نسبت به سلول بنیادی اولیه تمایز یافته‌تر است که در نهایت تقسیم می‌شود و به سلول های تمایز یافته تبدیل می‌شود(۱).

[1]- potency
[2]-Adult Mammals
[3]-Totipotent
[4]-Zygote
[5]-Fertilized Egg
[6]-The intermediate Cell
[7]-precursor=progenitor cell

۱-۱-۲. پلاستیسیتی سلول های بنیادی:

توانایی تبدیل سلول از یک رده سلولی به رده سلولی جدید را تغییرپذیری(پلاستیسیتی) می‌نامند. به عنوان مثال سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان($BMSc_s$) قادر به تمایز به سلول های استئوبلاست ،کندروسیت و آدیپوسیت هستند(۳). قدرت پلاستیسیتی در سلول های بنیادی با توجه به منبع استخراج آن‌ها متفاوت است، به طوری‌که سلول های بنیادی جنینی پلاستیسیتی بیشتری نسبت به سلول های بنیادی بالغین دارد.(۱)

۱-۱-۳. انواع سلول های بنیادی:

۱-۱-۳-۱. تقسیم بندی براساس توان تمایز:

براساس توان تمایز ، سلول های بنیادی را می توان به انواع زیر تقسیم نمود:

۱-همه‌توان[1]: سلولی که بتواند همه رده های سلولی اعم از سلول های بدن فرد و سلول های برون جنینی(جفت) را بسازند را سلولی همه توان می‌نامند. مانند بلاستومرهای یک جنین دو-سلولی که هر سلول آن می‌تواند به یک فرد کامل تبدیل شود.

۲-پرتوان[2]: سلولی که قادر است اغلب یا همه سلول های بدن فرد را بسازد را پرتوان می‌نامند. مثلاً سلول های بنیادی جنینی تحت شرایط خاص می‌توانند تمام سلول‌های بدن یک فرد را بسازند، ولی قادر به ایجاد سلول های برون جنینی (جفت) نیستند. سلول هایی که از گنادهای

[1]-Totipotent(Omnipotent)
[2]-Pluripotent