دانشگاه اراک

دانشکده علوم - گروه زیست شناسی

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

تحت عنوان:

بررسی اثرات کلرید کادمیوم بر توانایی زیستی و مورفولوژی سلولهای بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت

پژوهشگر :

حسن سلیمانی

اساتید راهنما :

دکتر محمد حسین آبنوسی

دکتر ملک سلیمانی مهرنجانی

استاد مشاور :

دکتر مجید مهدیه نجف آبادی

آذر ۱۳۹۰

فصل اول (مقدمه)

۱-۱. سلول‌های بنیادی ۲
۱-۱-۱.تعریف سلول های بنیادی ۲
۱-۱-۲. ویژگی های سلول بنیادی ۳
تقسیم متقارن ۳
تقسیم نامتقارن ۳
۱-۱-۳. رده بندی سلول‌های بنیادی براساس پتانسیل تمایزی آن ها ۴
۱-۱-۳-۱. همه توان ۴
۱-۱-۳-۲.پرتوان ۴
۱-۱-۳-۳.چند توان ۴
۱-۱-۴. رده بندی و منابع سلولهای بنیادی ۴
۱-۱-۴-۱. سلول‌های بنیادی جنینی ۵
۱-۱-۴-۲. سلول زاینده جنینی ۶
۱-۱-۴-۳. سلول بنیادی رویانی ۶
۱-۱-۴-۴. سلول بنیادی بند ناف ۷
۱-۱-۴-۵.**سلول های بنیادی بالغ** ۸
۱-۱-۴-۵-۱. سلول های بنیادی هماتوپویتیک (مغز استخوان و خون محیطی) ۸
۱-۱-۴-۵-۲. سلول های بنیادی مزانشیم (استرومای مغز استخوان) ۸
۱-۲. بافت مغز استخوان ۹
۱-۲-۱. سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان ۱۰
۱-۲-۱-۱.تاریخچه ۱۰
۱-۲-۱-۲.کنام سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان ۱۱
۱-۲-۱-۳.مورفولوژی سلول های بنیادی مزانشیم ۱۲
۱-۲-۱-۴. منابع سلول های بنیادی مزانشیم ۱۳
۱-۲-۱-۵.رشد و گسترش سلول های بنیادی مزانشیم ۱۴
۱-۲-۱-۶. پتانسیل تمایزی چنددودمانه سلول های بنیادی مزانشیم ۱۴
۱-۳. تکثیر و توانایی زیستی سلول ۱۷
۱-۳-۱. توانایی زیستی ۱۸
۱-۳-۲. روش های سنجش توانایی زیستی و تکثیر سلول ها ۱۹
۱-۴. مرگ سلول ۲۰
۱-۴-۱. مورفولوژی آپوپتوزیس (مرگ برنامه ریزی شده سلول) ۲۰
۱-۴-۲.روش های مطالعه آپوپتوزیس در سلول های منفرد ۲۱
۱-۴-۲-۱. سنجش های که از رنگ کردن DNA و یا سلول استفاده می شود ۲۳
۱- دفع رنگ ۲۳

آزمایش دفع رنگ تریپان بلو ۲۳

۲. تغییرات مورفولوژیک ۲۴
۲-۲-۴-۱.آزمون کامت ۲۴
۵-۱. کلسیم درون سلولی ۲۵
۱-۵-۱. ارتباط استرس اکسیداتیو با سیگنال کلسیم درون سلولی و آپوپتوزیس ۲۶
۲-۵-۱. کلسیم و آپوپتوزیس ۲۷
۶-۱. عنصر کادمیوم ۲۸
۱-۶-۱. ویژگیهای کادمیوم ۲۸
۲-۶-۱. پراکنش کادمیوم ۲۸
۳-۶-۱.کاربردهای تکنولوژیکی ۲۹
۴-۶-۱. تاریخچه سمیت کادمیوم ۲۹
۵-۶-۱.راههای ورود و اندام های تحت تاثیر ۳۰
۶-۶-۱. اثرات کادمیوم بر مکانیسم های سلولی و ملکولی ۳۲
۷-۶-۱. مکانیسم های کارسینوژن بودن کادمیوم ۳۲
۱- ۷-۶-۱. ناهنجاری در بیان ژن ۳۳
ژنهای پاسخ سریع (IEGs)..... ۳۳
ژنهای پاسخ استرس..... ۳۳
فاکتورهای رونویسی..... ۳۳
فاکتورهای ترجمه..... ۳۴
۲-۷-۶-۱. کادمیوم و استرس اکسیداتیو..... ۳۴
۳-۷-۶-۱. مهار ترمیم آسیب های DNA..... ۳۶
۴-۷-۶-۱. تخریب E - کادهرین..... ۳۷
۸-۶-۱.کادمیوم و مسیرهای هدایت سیگنال های سلولی..... ۳۷
۹-۶-۱.کادمیوم و مرگ سلولی ۳۸
۷-۱. مروری بر مطالعات گذشته ۳۹
۸-۱. هدف مطالعه..... ۴۲
فصل دوم (مواد و روش‌ها)
۱-۲. انتخاب حیوان..... ۴۴
۲-۲. جدا سازی وکشت سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان..... ۴۴
۳-۲. اجرای پاساژ ۴۶
۴-۲.اثبات مزانشیمی بودن سلول‌های استخراج شده ۴۷
۱-۴-۲. تمایز به استخوان..... ۴۷
۲-۴-۲. مراحل رنگ آمیزی آلیزارین رد s ۴۷
۵-۲. بررسی توان زیستی سلول‌ها (دز فایندینگ)..... ۴۸
بررسی حیات سلولی به کمک تریپان بلو..... ۴۸
مراحل تست رنگ آمیزی با تریپان بلو..... ۴۸
۶-۲. بررسی حیات سلول بر پایه‌ی رنگ سنجی (MTT)..... ۵۰
۱-۶-۲. مراحل سنجش تترازولیوم..... ۵۰

۲-۶-۲. ترسیم منحنی استاندارد با استفاده از سنجش تترازولیوم ۵۱
۲-۷. انتخاب دز و زمان تیمار ۵۲
۲-۸. روش انجام تست PDN ۵۳
۲-۹. بررسی تغییرات مورفولوژیکی با استفاده از رنگ آمیزی فلورسنس ۵۳
مراحل رنگ آمیزی با هوخست و اکریدین اورانژ ۵۳
۲-۱۰. مراحل آزمون کامت ۵۵
۲-۱۰-۱. آماده سازی لام‌ها ۵۵
۲-۱۰-۲. لیز کردن سلول‌ها ۵۵
۲-۱۰-۳. تیمار قلیایی سلول‌ها ۵۵
۲-۱۰-۴. الکتروفورز سلول‌ها ۵۶
۲-۱۰-۵. خنثی سازی و تثبیت ۵۶
۲-۱۰-۶. رنگ آمیزی ۵۶
۲-۱۰-۷. بررسی میکروسکوپی و عکس برداری ۵۷
۲-۱۱. بررسی میزان رسوب کلسیم با استفاده از کیت کلسیم به روش رنگ سنجی ۵۷
فصل سوم (نتایج)
الف: نتایج مرحله استخراج سلول ها و انتخاب دُز موثر ۶۰
۳-۱. رشد و تکثیر سلول های بنیادی مزانشیم ۶۰
۳-۲. نتیجه بررسی ویژگی مزانشیمی سلول های استخراج شده با کمک فرایند تمایز به استخوان ۶۱
۳-۳. اثر کادمیوم کلراید بر توانایی زیستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت(مطالعه‌ی در فایندینگ) ۶۲
توانایی زیستی سلول های مزانشیم بر پایه جذب تریپان بلو ۶۲
بررسی حیات سلولی بر پایه‌ی رنگ سنجی (MTT) ۶۵
۳-۳. انتخاب دُز موثر ۶۷
ب: نتایج اثر دُزهای انتخابی کادمیوم کلراید بر توانایی تعداد دو برابرشدگی جمعیت سلولی، مورفولوژی و میزان کلسیم داخل سلولی ۶۸
۱- محاسبه تعداد دو برابر شدگی جمعیت سلول ها ۶۸
۲- بررسی تغییرات مورفولوژیک با استفاده از رنگ آمیزی فلورسنس ۷۰
۳-۵.آزمون کامت ۷۴
۳-۶.سنجش کلسیم درون سلولی ۷۶
فصل چهارم (بحث ونتیجه گیری) ۷۸
اثر کلرید کادمیوم بر توانایی زیستی سلول ها ۷۹
اثر کلرید کادمیوم بر مورفولوژی، شکستگی هسته و میزان کلسیم سلول ها ۸۲
فصل پنجم (پیوست‌ها)
۵-۱. روش تهیه محیط کشت ۸۷
۵-۲. تهیه‌ی فسفات بافر سالین PBS^- ۸۷
۵-۳. تهیه‌ی فسفات بافر سالین مثبت PBS^+ ۸۸
۵-۴. روش تهیه محیط تمایزی استئوژنیک ۸۸

۵-۵. آماده سازی آلیزارین رد ۸۹
۵-۶. روش تهیه محلول تریپان بلو۰/۴ درصد ۸۹
۵-۷. روش تهیه‌ی محلول MTT ۸۹
۵-۸. روش تهیه‌ی محلول آگارز با نقطه‌ی ذوب معمولی ۸۹
۵-۹. روش تهیه محلول آگارز با نقطه ذوب پائین ۸۹
۵-۱۰. محلول لیز کننده ۹۰
۵-۱۱. بافر الکتروفورز ۹۰
۵-۱۲. بافر خنثی ۹۰
۵-۱۳. جدول کامل نتایج تریپان بلو ۹۱
۱۴- جدول کامل نتایج MTT ۹۲
فصل ششم (منابع و مآخذ) ۹۳

چکیده

کادمیوم یکی از آلاینده صنعتی، شایع در محیط زیست است که توسط آژانس بین المللی سرطان (IARC) به عنوان عامل کارسینوژن گروه یک انسان طبقه بندی شده است. انسان ها به طور عمده از طریق خوردن غذا یا آب آلوده شده و تنفس دود سیگار، مستعد پذیرش یون سمی کادمیوم هستند.

به منظور بررسی اثرات سمی این آلاینده، سلول های بنیادی مزانشیمی با توان خود نوسازی و قابلیت تمایز به انواع سلول ها می تواند به عنوان مدلی مناسب قرار گیرند. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثر دزهای مختلف کلرید کادمیوم (۰ تا ۵۰ میکرومولار) طی زمان های ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت بر توانایی زیستی سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت و تاثیر دزهای ۱۵ و۴۵ میکرومولار در زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت بر توانایی تکثیر، مورفولوژی، مرگ سلولی و تغییرات غلظت کلسیم درون سلولی، این رده سلولی می باشد.

در این مطالعه پس از بررسی توان زیستی با رنگ آمیزی تریپان بلو و تست MTT، از محاسبه تعداد دو برابر شدگی جمعیتی(PDN) جهت بررسی توان تکثیر، رنگ آمیزی فلورسنت (هوخست و آکریدین اورنژ) برای مورفولوژی، آزمون کامت برای اندازه گیری میزان آسیب DNA و سنجش کلسیم درون سلولی برای بررسی تغییرات غلظت کلسیم استفاده گردید.

نتایج نشان داد که کلرید کادمیوم در یک اثر وابسته به دز بصورت معنی داری ($P<0/05$) منجر به کاهش توانایی زیستی، و میزان دو برابرشدگی جمعیت این رده سلولی می‌شود. علاوه بر آن تغییرات مورفولوژیکی شامل متراکم و قطعه قطعه شدن هسته، تخریب غشاء و چروکیدگی سیتوپلاسم، مشاهده شد. آزمون کامت نیز نشان داد که کلرید کادمیوم موجب ایجاد شکستگی در DNA سلول ها، و همچنین موجب افزایش غلظت کلسیم درون سلولی به صورت وابسته به دز و زمان می شود.

نتیجه گیری: این نتایج ایجاد آپوپتوزیس توسط کادمیوم را با افزایش غلظت کلسیم درون سلولی پیشنهاد می کند.

فصل اول

مقدمه

۱-۱. سلول های بنیادی

۱-۱-۱. تعریف سلول های بنیادی

سلول‌های بنیادی سلول‌هایی تمایزنیافته ای هستند که تقسیم میتوزی فعالی داشته و با تکثیر خود سلولهای تمایز نیافته ای دیگری و یا سلولهای دختری را که، از طریق سیگنالهای خارجی و یا داخلی تمایز پیدا خواهند کرد را تولید می کنند.[۱]. به طور اساسی یک سلول بنیادی، تا زمانی که سیگنالی را جهت تکامل به یک سلول تخصصی دریافت نکند، به صورت غیر متعهد[1] باقی می ماند. سلول های بنیادی ویژگی های قابل توجهی را برای تکامل به انواعی از سلول ها در بدن انسان دارا هستند. به گونه ای که در یک جنین ۳ تا ۵ روزه که بلاستوسیست نامیده می شود، در بافتهای در حال تکوین سلولهای بنیادی ،انواع سلولهای تخصص یافته ای که بافتهای مختلف جنین را می سازند تولید می کنند. در افراد بالغ نیز ،این سلولها، برای آن دسته از سلولهای بدن که به دلیل فرسودگی طبیعی و یا آسیب ها، از دست می روند جایگزین ایجاد می کنند. بهترین مثال سلول های بنیادی بالغ، سلول های بنیادی خون ساز[2] مغز استخوان می باشد که تخصص نیافته بوده و توانایی تخصص یافتن به سلول های خونی نظیر سلول های خونی سفید و قرمز را دارد[۲].

امروزه سلول های بنیادی از جنین های لانه گزینی نشده، فتوس[3]، بند ناف و بافت های بالغ جداسازی شده اند و تحت شرایط ویژه، این سلول های تمایز نیافته می توانند پر توان[4] (با قابلیت تبدیل به سلول هایی از همه سه لایه زاینده یعنی اکتودرم ، مزودرم و اندودرم) یا چند توان[5] (با توانایی تبدیل به تعداد محدودی از انواع سلولی تخصص یافته) باشند[۳].

1- Uncommitted
2- Hematopoietic stem cells
3- Fetuses
4- Pluripotent
5- Multipotent

۲-۱-۱. ویژگی های سلول بنیادی

سلول های بنیادی به عنوان یک هویت سلولی با دو ویژگی اصلی تعریف شده اند:

۱- خود تجدیدی [۱] (تولید سلولهای بنیادی دختری با پتانسیل نهانی یکسان)

۲- توانایی تمایز[۲] به یک یا تعداد بیشتری از نسل های سلولی [۴].

خود تجدیدی سلول های بنیادی از دو راه امکان پذیر است:

تقسیم متقارن: تقسیم متقارن، فرآیندی است که طی آن، دوسلول دختری حاصل، یا خصوصیات سلول مادری خود راحفظ می کنند یا هردو به سلول پیش ساز تبدیل می شوند.

تقسیم نامتقارن: در این نوع تقسیم هر سلول بنیادی به یک سلول بنیادی و یک سلول پیش ساز[۳] تقسیم می شود. سلول بنیادی حاصل از تقسیم ، جمعیت سلول های بنیادی را حفظ کرده و سلول پیش ساز ، با فراهم شدن شرایط تمایز ، متمایز می شود . بنابراین هیچ تغییری در تعداد کل سلولهای بنیادی حاصل نمی شود[۵ ،۶].

مطالعات نشان داده است که خود تجدیدی سلول های بنیادی تحت تاثیر عوامل محیطی نیز می باشد. در واقع دخالت محیط اطراف، به عنوان عامل تعیین کننده تقسیم سلول بنیادی در نظر گرفته می شوند. بر این اساس، در وضعیت های محیطی خاص از قبیل آسیب یا صدمه ، یک سلول بنیادی ممکن است دو سلول دختری ایجاد کند که تحت شرایط محیطی ، یا به صورت سلول های بنیادی باقی می مانند یا متمایز می شوند[۵].

1-Self renewing
2- Differentation
3- Progenitor

۳-۱-۱. رده بندی سلول های بنیادی بر اساس پتانسیل تمایزی آن ها

سلولهای بنیادی را بر اساس توان تمایزی و برگشت پذیری آن ها، می توان به انواع ذیل تقسیم نمود:

۱-۳-۱-۱. همه توان[1]: سلولهای بنیادی نظیر سلولهای زاینده و سلولهای جنین اولیه که می توانند همه انواع سلولها را، در حین تکوین جنین ها نظیر سلول های فرد و بافتهای برون جنینی را بسازند[۱].

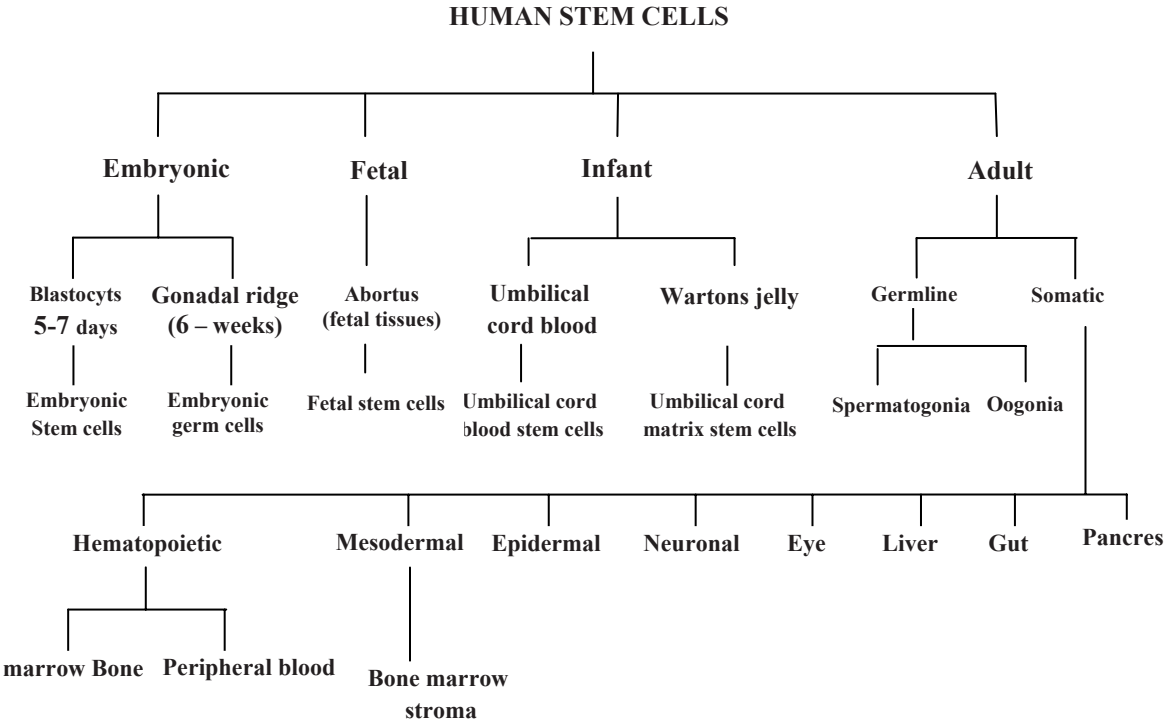
۲-۳-۱-۱. پرتوان[2] : سلول هایی هستند که می توانند بیشتر، اما نه همه سلول های فرد را بسازند. مثلاً سلول های بنیادی جنینی تحت شرایط خاص می توانند یک فرد را بسازند ولی قادر به ایجاد سلول های برون جنینی (جفت) نیستند. سلول هایی که از گنادهای جنینی به دست می آیند و به آن ها سلول های زاینده جنین[3] گفته می شود نیز جزو این دسته اند .

۳-۳-۱-۱. چند توان[4] : تعداد محدودتری از انواع سلول را ایجاد می کنند مانند سلول های بنیادی واقع در بافت های بزرگسالان [۷]، که شامل سلولهای بنیادی خون، سلول بنیادی عضله، سلول بنیادی فولیکول مو و.... می باشد[۷، ۸].

۴-۱-۱. رده بندی و منابع سلولهای بنیادی

سلول های بنیادی را می توان بر اساس منشاء آنها به چهار نوع (شکل ۱-۱) تقسیم بندی کرد، که هر کدام نیز به زیر گروه هائی تقسیم بندی می شود.

1-Totipotent
2- Pluripotent
3 -Embryonic germ cell;EG
4-Multipotent



شکل ۱-۱. رده بندی سلول های بنیادی انسان[۳].

در زیر به پنج رده از سلول های بنیادی اشاره می شود

۱. سلول های بنیادی جنینی **(Embryonic stem cells)**
۲. سلول های زاینده جنینی**(Embryonic germ cells)**
۳. سلول های بنیادی رویانی **(Fetal stem cells)**
۴. سلول های بنیادی بند ناف **(Umbilical cord stem cells)**
۵. سلول های بنیادی بالغ **(Adult stem cells)**[۱].

۱-۴-۱-۱. سلول های بنیادی جنینی

در پستانداران، اووسیت لقاح یافته، شامل زیگوت دو سلولی، چهار سلولی، هشت سلولی و مورولا که در واقع حاصل تسهیم جنین اولیه هستند، مثال هایی از سلول های همه توان می باشند، که قابلیت تشکیل یک ارگانیسم کامل را دارند. گواه همه توان بودن این سلول ها،

دو قلوهای همسانی هستند که با از هم جدا کردن جنین اولیه در in vitro توسط micromanipulation ایجاد می شوند[۳].

توده سلولی داخلی[۱] (ICM) در بلاستوسیست ۵ تا ۶ روزه انسان، منبعی از سلول های پر توان جنینی (hESCs) است. در طی تکامل جنینی، ICM به دو لایه سلولی متمایز یافته شامل اپی- بلاست[۲] و هیپوبلاست[۳] تکوین می یابد. هیپوبلاست کیسه زرده را تشکیل داده که در آینده دستگاه گوارش را در انسان بوجود می آورد و اپی بلاست به لایه های زاینده اولیه (اکتودرم، مزودرم و اندودرم) تمایز می یابد[۳].

۲-۴-۱-۱. سلول های زاینده جنینی

سلول های زاینده اولیه[۴] یا پیش ساز های سلولی زاینده دیپلوئید، پیش از ارتباط نزدیک با سلول های سوماتیک گنادها برای مدت کوتاهی در جنین وجود داشته و سپس به عنوان سلولهای زاینده متعهد می شوند. سلول های زاینده جنینی انسان(hEGCs)[۵] نیز سلول های بنیادی هستند که از سلول های زاینده اولیه ستیغ گنادی[۶] در جنین ۵ تا ۹ هفته ای منشاء گرفته، که این سلول ها پر توان بوده و قادرند سلول های سه لایه جنینی را ایجاد کنند[۳].

۳-۴-۱-۱. سلول های بنیادی رویانی

سلول های بنیادی رویانی از انواع سلولی اولیه هستند که در اندام های جنین یافت می شوند. سلول های بنیادی تاج عصبی، سلول های بنیادی هماتوپویتیک جنینی و پیش

1- Inner cell mass (ICM)
2- Epiblast
3- Hypoblast
4- Primordial germ cells
5- Human embryonic germ cells (hEGCs)
6- Gonadal ridge

سازهای جزایر پانکراسی از جنین های سقط شده[1] جداسازی شده اند. سلول های بنیادی تاج عصبی که در مغز جنین یافت می شوند، به سلول های گلیال و نورون تمایز داده شده اند. خون جنینی، جفت و بند ناف نیز منابعی غنی از سلول های بنیادی هماتوپویتیک هستند[۳].

۴-۴-۱-۱. سلول های بنیادی بند ناف

خون بند ناف واجد سلول های بنیادی بوده و به نظر می رسد محتوای سلولی آن از سلول های مغز استخوان و خون محیطی بالغ کاملاً متمایز می باشد. تعداد سلول های بنیادی هماتوپویتیک خون بند ناف برابر یا بیش از سلول های مغز استخوان بوده و قادرند در محیط in vitro کلونی هایی را تشکیل دهند. این سلول ها نیاز به فاکتورهای رشد متفاوتی داشته و تلومرهای بلندی دارند که آنها را قادر می سازد تا پاساژهای متعددی را تحمل نمایند.

خون بند ناف، قابلیت پیوند کمتری در مقایسه با مغز استخوان نشان می دهد که احتمالا به دلیل افزایش سطح اینترلوکین -۱۰[2] تولید شده توسط این سلول ها و یا کاهش بیان بتا- ۲-میکروگلوبولین[3] می باشد. بیشتر توجهات به سلول های بنیادی خون بند ناف به دلیل قابلیت ذخیره آن در استفاده های بعدی در جهت درمان می باشد. ماتریکس خون بند ناف را ماتریکس ژله وارتون[4] نیز می نامند که شامل سلول های بنیادی بالقوه بوده و منبع مهمی جهت استخراج سلول های بنیادی مزانشیم بحساب می آید[۳].

1- Abortuses embryos
2- Interlukin-10
3- Beta-2- microglobulin
4- wharton’s jelly

۵-۴-۱-۱. سلول های بنیادی بالغ

سلول های بنیادی بالغ شامل سلول های بنیادی هماتوپویتیک (مغز استخوان و خون محیطی)، سلول های بنیادی مزانشیم (استرومای مغز استخوان[۱])، سلول های بنیادی روده، سلول های بنیادی کبد، سلول های بنیادی غضروف و استخوان، سلول های بنیادی اپیدرمال (پوست و مو)، سلول های بنیادی عصبی، سلول های بنیادی پانکراسی و سلول های بنیادی چشم می شوند (شکل۱-۱) که از بین این سلول ها دو نوع آنها شامل سلول های بنیادی هماتوپویتیک و سلول های بنیادی مزانشیم به تفصیل توضیح داده می شود.

۱-۵-۴-۱-۱. سلول های بنیادی هماتوپویتیک [۲](مغز استخوان و خون محیطی)

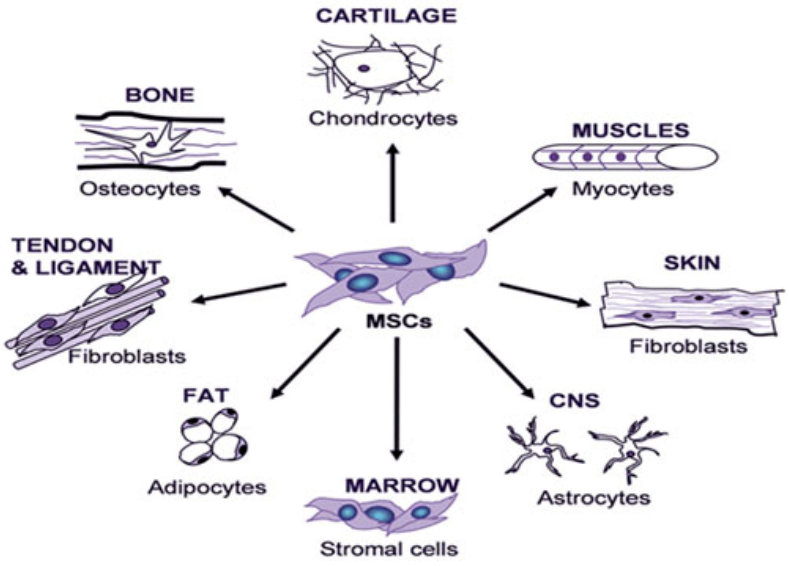
مغز استخوان دارای سلول های بنیادی با منشا مزانشیمی و هماتوپویتیکی است. سلول های بنیادی هماتوپویتیک سلول های خون سازی[۳] بوده که تولید و حفظ سلول های بنیادی خون و تکثیر و تمایز آن ها به سلول های خون محیطی را به عهده دارد. سلول بنیادی هماتوپویتیک در مراحل اولیه جنین از مزودرم مشتق شده و در محل های خون سازی ویژه ای در جنین قرار می گیرند. این محل ها شامل مغز استخوان، کبد و کیسه زرده می باشد. سلول های بنیادی مغز استخوان به دلیل چندتوان بودن انعطاف پذیر بوده و می توانند به بسیاری از انواع سلول ها در شرایط in vitro وin vivo تمایز یابند[۳].

۲-۵-۴-۱-۱. سلول های بنیادی مزانشیم (استرومای مغز استخوان)

سلول های بنیادی مزانشیم[۴] (MSCs)، پس از تولد در استرومای غیر هماتوپویتیک مغز استخوان یافت می شوند. بافت استرومای مغز استخوان دارای جمعیتی هتروژن از سلول ها

1-bone marrow stroma
2-Hematopoietic stem cells
3-hematopoiesis
4-Mesenchymal stem cells

از قبیل سلول های رتیکولار[1]، آدیپوسیت ها، سلول های استئوژنیک، سلول های عضله صاف، سلول های اندوتلیال و ماکروفاژها می باشد. علاوه بر استرومای مغزاستخوان، MSCs را می توان از استخوان، چربی و پوست نیز به دست آورد. MSCs سلول هایی چندتوان هستند که قابلیت تمایز به غضروف، استخوان، عضله ،تاندون، لیگامان وچربی را دارند(شکل ۲-۱). اخیراً شواهدی مبنی بر وجود سلول های نایابی در کشت MSCs به دست آمده است، که این سلول های چندتوان، نه تنها به بافت های مزودرمی تبدیل شده، بلکه قابلیت ایجاد بافت های اندودرمی را نیز دارند. این سلول ها را، سلول پیش ساز بالغ چند توان (MAPC)[2] می نامند[۳].



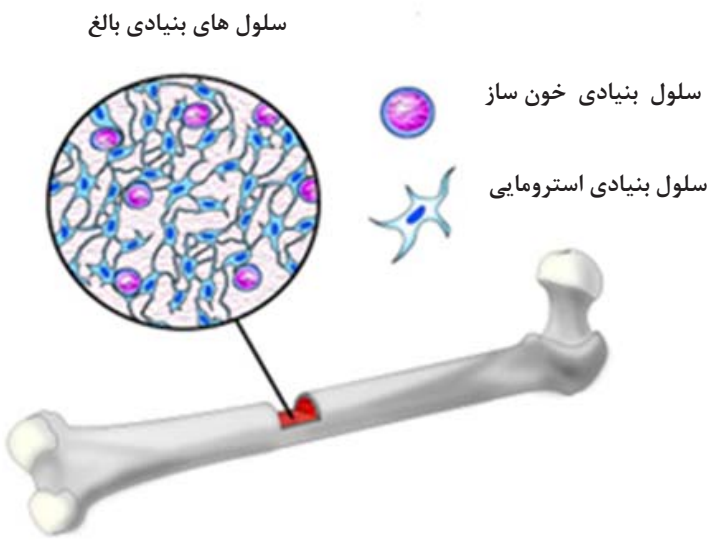
شکل۲-۱. سلول MSC و پتانسیل تمایزی آن

۲-۱. بافت مغز استخوان

حفره مرکزی استخوان های دراز و فاصله میان میله های استخوان اسفنجی، جایگاه بافت، ژلاتینی و نرمی است که مغز استخوان نامیده می شود و حاوی سلول هایی بنیادی می باشد. مغز استخوان حدود ۵ درصد از کل وزن بدن را تشکیل می دهد و مسئول تشکیل سلول های

1-Reticular cells
2-Multipotent Adult Progenitor Cell(MAPC)

خونی و تحویل آن ها به سیستم گردش خون از پنج ماه پیش از تولد تا زمان مرگ می باشد. مغز استخوان همچنین یک ریزمحیط[1]، برای پروسه بلوغ لنفوسیت های B و بلوغ ابتدایی لنفوسیت های T را فراهم می آورد[۸]. در پستانداران بالغ، اندام اصلی جهت خون سازی مغز استخوان بوده و MSC نیز در استرومای مغز استخوان جای دارند(شکل ۳-۱)[۹].



شکل ۳-۱. سلول های بنیادی مغز استخوان

۱-۲-۱. سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان

۱-۱-۲-۱. تاریخچه

سلول های بنیادی مزانشیم واقع در مغز استخوان برای اولین بار توسط فردنستین[2]و پتراکوا [3] در سال ۱۹۶۶شناسایی شد. این محققین سلول های پیش ساز استخوان را از مغز استخوان موش صحرایی استخراج کردند، ولی اولین شواهد قطعی توسط فردنستین در اواسط سال ۱۹۷۰ ارائه شد . این محقق نمونه های مغز استخوان را در یک ظرف پلاستیکی کشت داد و پس از ۴ ساعت، سلول های غیرچسبنده را دور ریخت. در اصل این سلول های دور ریخته

1-microenvironment
2-Friedenstein
3- Petrakova

شده، سلول های رده خونساز بودند. او گزارش کرد که بخش کوچکی از سلول های چسبنده مغز استخوان از لحاظ ظاهر هتروژن بوده، که اتصالات محکمی با سطح دیش کشت برقرار می کنند. این سلول ها دوکی شکل بوده و تجمعاتی را تشکیل داده که این تجمعات به مدت ۴-۲ روز خاموش باقی مانده و پس از آن به سرعت تکثیر پیدا می کنند. این سلول ها پس از چندین بار پاساژ به صورت یکدست و دوکی ظاهر می شدند[۵].

مشاهدات ابتدایی فردنستین ، توسط چندین محقق به ویژه پیرسما[1] و همکاران سال ۱۹۸۰ تایید شد. این مطالعات نشان داد که سلول های جدا شده با روش فردنستین در اصل سلول های چندتوان بوده و قادرند به رده های استخوانی، غضروفی، چربی و حتی عضلانی متمایز شوند[۵].

۲-۱-۲-۱. کنام سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان

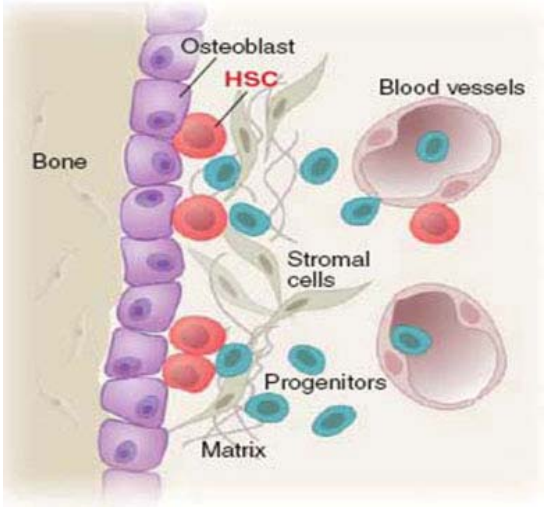
کنام یک سلول در حقیقت مجموعه ای از عوامل فیزیکی و شیمیایی است که سلول را احاطه می کنند[۱۰] .کنام سلول بنیادی محلی ویژه در بافت های بالغ است که سلول بنیادی در آن اسکان داشته و نقشی اساسی در تنظیم توان خود تجدیدی و تمایزی سلول های بنیادی بالغ ایفا می کند (شکل ۴-۱)[۱۰].

کنام سلول های مزانشیم در استخوان در حقیقت از سلول های پیش ساز استخوان تشکیل شده است. استروما و سلول های استرومایی همچنان که یک مکان فیزیکی را برای بلوغ سلول های خونی فراهم می نمایند ، طیف وسیعی از ترشحات و سیگنال هایی از سلول های مختلف را دارند که برای متعهد شدن ، تمایز و بلوغ سلول های خونساز مورد نیاز است. سلول های اندوتلیال، سلول های چربی، ماکروفاژها، سلول های رتیکولار، فیبروبلاست ها، سلول های پیش

1-Piersema

ساز استخوان، سلول های هماتوپویتیک و سلول های مشتق از آن ها هستند که این فضای فیزیکی را تشکیل می دهند[۷].

در بالغین، استئوبلاست (که مسئول استخوان سازی[1] است) و سلول های خونساز [2] (که مسئول خونسازی اند) با هم در ارتباط بوده و بین آنها یک ارتباط متقابل برقرار است. اخیراً معلوم شده است که گروهی از استئوبلاست ها، به عنوان یک جز کلیدی در کنام سلول های بنیادی خونساز عمل کرده (که کنام استئوبلاستی نامیده می شوند) و تعداد سلولهای خونساز را کنترل می کنند[۱۰]. سلول های بنیادی مزانشیم بخشی از سلول های موجود در استروما محسوب شده که جهت ایجاد سلول های پیش ساز استخوان متعهد شده و در کنام استئوبلاستی واقع می گردند.[۱۱].



شکل ۴-۱. کنام سلول بنیادی مغز استخوان

۳-۱-۲-۱. مورفولوژی سلول های بنیادی مزانشیم

سلول های بنیادی مزانشیم ، سلول هایی با جسم سلولی کوچک و هسته ای گرد و بزرگ است که هستکی بارز و مشخص دارد. در سیتوپلاسم این سلول ها، دستگاه گلژی، شبکه آندوپلاسمی خشن ، میتوکندری و پلی ریبوزوم ها قابل شناسایی اند[۱۲, ۱۳] .

1-Osteogenesis
2- Hematopoietic cell

این سلول ها پس از یک فاز تاخیری[1] ابتدایی، به سرعت تقسیم شده و زمانی که این سلول ها در محیط کشت به تراکم بالا می رسند، وارد فاز ایستایی یا سکون[2] می شوند که مورفولوژی آن ها از حالت دوکی شکل[3] به سلول هایی بزرگ و پهن تبدیل می گردد. این سلول ها خاصیت چندتوانه شان را برای حداقل ۱۰-۶ بار پاساژ خوردن حفظ می کنند[۱۴]. سلول های بنیادی مزانشیم جدا شده از مغز استخوان جمعیتی متقارن و کلونی هایی دوکی شکل (تا همولوگی ۹۸درصد) را تشکیل می دهند[۱۵]. مطالعات پیشین نشان داده است کلونی های مشتق شده از سلول های منفرد از نظر مورفولوژیکی هتروژن بوده و شامل حداقل دو نوع سلول است : سلولهای دوکی شکل کوچک و سلول های مکعبی شکل و مسطح بزرگ که بر حسب پتانسیل تکثیری شان دارای توان خودنوسازی سریع و آهسته اند[۱۵]. در واقع تراکم اولیه در کشت این سلول ها نه تنها بر رشد MSCs ، بلکه بر مورفولوژی این سلول ها نیز تاثیر می گذارد. وقتی این سلول ها در تراکم پایین رشد کنند، عمدتاً دوکی شکل می شوند اما وقتی به تراکم بالا می رسند و در چندین لایه رشد می کنند ، مسطح شده و انتهای آن ها در هم فرو می رود[۱۵].

۴-۱-۲-۱. منابع سلول های بنیادی مزانشیم

منبع عمده MSC، مغز استخوان می باشد با این وجود تنها درصد کمی از سلول های موجود در مغز استخوان به این نوع سلول ها اختصاص دارد. Pitenger و همکاران نشان دادند که MSC تنها ۰/۰۰۱ تا ۰/۰۱ درصد از سلول های تک هسته ای جداشده، را تشکیل می دهند[۲۱].

1- Lag phase
2- Stationary phase
3- Spindle-like

وجود سلول های بنیادی مزانشیم علاوه بر مغز استخوان، در بافت هایی نظیر بافت چربی، پرده سینوویال[1]، عضله اسکلتی، درم، استخوان ترابکولار، بند ناف، ریه، پالپ دندان، مایع آمنیوتی، کبد جنینی، پرزهای کوریونی جفت[2] و حتی خون محیطی نیز گزارش شده است.

مقدار سلول های بنیادی با افزایش سن کاهش می یابد، بیشترین مقدار MSCs در نوزادان یافت می شود و سپس در طول دوره زندگی کاهش می یابند. بالاترین میزان MSCs رویانی در سه ماهه اول دیده شده و در طی سه ماهه دوم به حدود ۰/۰۰۰۱ درصد و در ادامه به ۰/۰۰۰۰۳ سلول های هسته دار در خون بند ناف می رسد[۲۰-۱۵].

۵-۱-۲-۱. رشد و گسترش سلول های بنیادی مزانشیم

رشد وگسترش MSCs در حالت in vitro با وقوع سه مرحله یا فاز ، مشابه سایر سلول های پیش ساز معلوم می گردد : فاز lag که حدود ۳-۴ روز طول می کشد و پس از آن فاز log (فاز گسترش سریع) آغاز می گردد و در نهایت با فاز سکون[3] محدود می شود. Prockop و همکاران در سال ۲۰۰۳ پیشنهاد دادند که تغییر بین این فازها با بیان ژن های Dickkopf-1(Dkk-1) و Wnt5 تنظیم می گردد [۱۵].

۶-۱-۲-۱. پتانسیل تمایزی چند دودمانه سلول های بنیادی مزانشیم

پتانسیل تمایزی چنددودمانه MSCs که از گونه های متفاوتی بدست آمده اند ، به طور وسیعی از زمان کشفشان در دهه ۱۹۶۰ در شرایط in vivo مورد مطالعه قرار گرفته است. توانایی MSCs در تمایز به انواع سلولی بافت همبند، آنها را به عنوان منبع سلولی مناسبی جهت استراتژی های ترمیم بافتی استخوان، غضروف و تاندون مطرح می کند[۲۲]. گزارش

1-Synovial membrane
2-Chorionic villii of placenta
3- Stationary