دانشکده دامپزشکی

پایان نامه دکترای حرفه‌ای دامپزشکی

شماره ثبت: ۴۳۱

استحصال و شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی اسب

به کوشش:

فائزه علی‌پور

استادان راهنما:

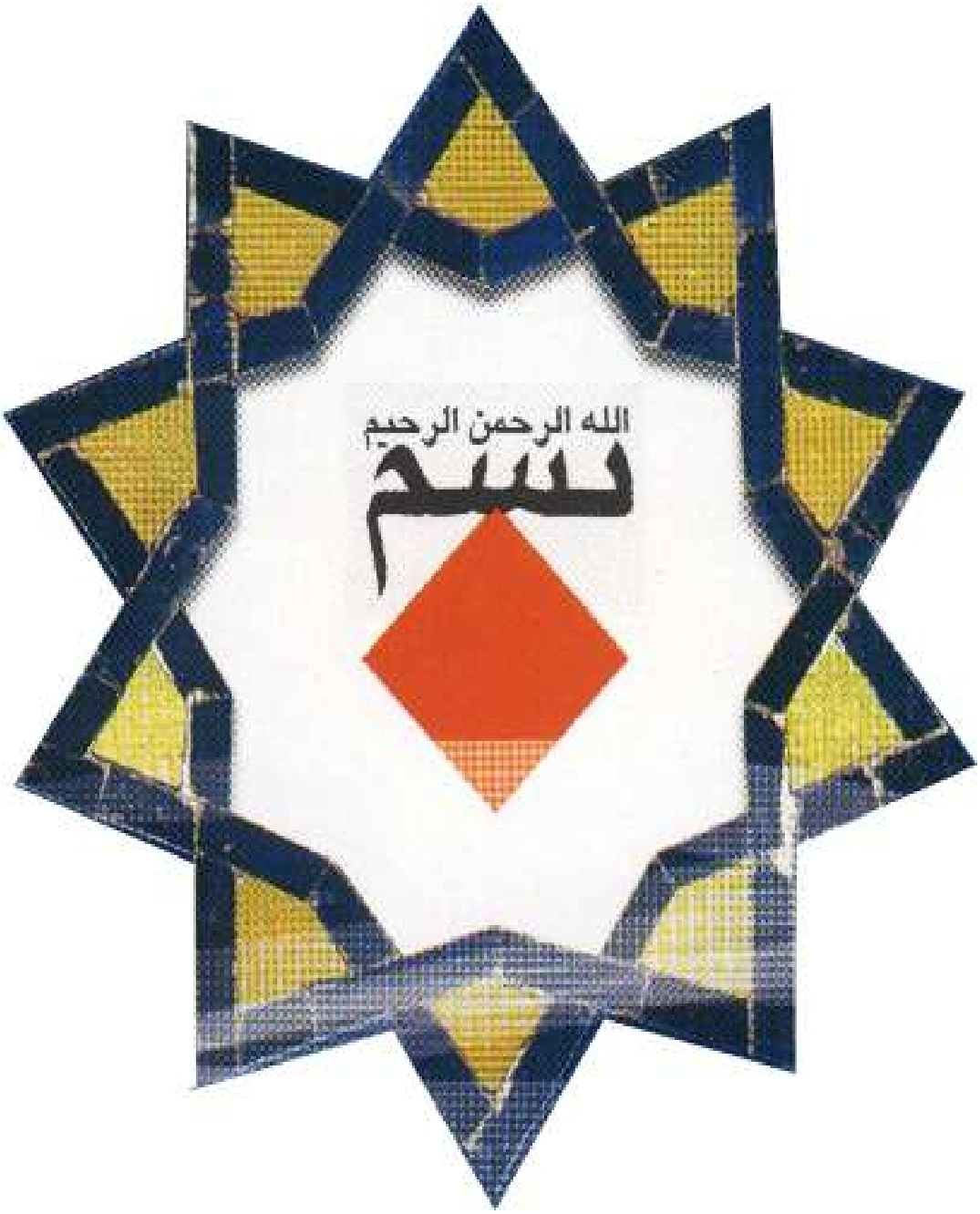
دکتر عباس ابویسانی

دکتر حسین کاظمی مهرجردی

استاد مشاور:

دکتر حسام دهقانی

مهر ماه ۱۳۹۱


بسم الله الرحمن الرحيم

تعهدنامه

اینجانب **فائزه علی‌پور** دوره دکتری حرفه‌ای ، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه **فردوسی مشهد**، عنوان پایان‌نامه: **استحصال وشناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی اسب** تحت راهنمایی **آقای دکتر عباس ابویسانی و آقای دکتر حسین کاظمی مهرجردی** متعهد می‌شوم:

- تحقیقات در این پایان‌نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان‌نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد و مقالات مستخرج با نام «دانشگاه فردوسی مشهد» و یا «Ferdowsi University of Mashhad» به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان‌نامه تأثیرگذار بوده‌اند در مقالات مستخرج از رساله رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان‌نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان‌نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است، اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است.

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم‌افزارها و تجهیزات ساخته شده) متعلق به دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان‌نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی‌باشد.

به نام خدا

گواهی اعضای کمیته ی پایان نامه

استحصال وشناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی اسب

به کوشش:

فائزه علی‌پور

پایان نامه

ارائه شده به تحصیلات تکمیلی دانشگاه فردوسی مشهد به عنوان بخشی از فعالیت‌های تحصیلی لازم جهت اخذ درجه دکتری حرفه‌ای دامپزشکی

در رشته دامپزشکی

از دانشگاه فردوسی مشهد

جمهوری اسلامی ایران

ارزیابی کمیته ی پایان نامه، با درجه: عالی و نمره: ۱۹/۷۵

استاد راهنما: دکتر عباس ابویسانی (استادیار گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد)

استاد راهنما: دکتر حسین کاظمی مهرجردی (استادیار گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد)

استاد مشاور: دکتر حسام دهقانی (دانشیار گروه بیوتکنولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد)

داور پایان‌نامه: دکتر کامران سرداری (دانشیارگروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد)

داور پایان‌نامه: دکتر احمدرضا بهرامی (دانشیار گروه آموزشی زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد)

این پایان نامه را تقدیم می کنم به :

پدر و مادر عزیز، مهربان، دلسوز و فداکارم

به پاس عاطفه سرشار و گرمای امید بخش وجودشان که در این سردترین روزگاران بهترین پشتیبان است

به پاس قلب های بزرگشان که فریادرس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گراید

و به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند.

و

خواهرهای مهربان، شوهر خواهرهای بزرگوار و خواهرزاده های نازنینم

که همواره موفقیتشان آرزوی قلبی من است.

سپاس پروردگار دو عالم را، که بزرگترین امید و یاور در لحظات زندگی ست.

با تشکر فراوان از اساتید محترم جناب آقای دکتر عباس ابویسانی و جناب آقای دکتر حسین کاظمی مهرجردی که در تمام مراحل تحقیق مدیون مساعدت و راهنمایی های ایشان هستم. همچنین استاد بزرگوار جناب آقای دکتر حسام دهقانی که به عنوان مشاور این تحقیق از تجربیات ارزشمندشان نهایت استفاده را برده ام.

و با سپاس فراوان از اساتید بزرگوار جناب آقای دکتر کامران سرداری و جناب آقای دکتر احمدرضا بهرامی که قبول زحمت نموده و داوری این پایان نامه را به عهده گرفتند.

قدردان زحمات تمام اساتید بزرگوارم طی دوران تحصیل در دانشکده دامپزشکی هستم.

با تشکر از اساتید ارجمند جناب آقای دکتر **احمدرضا محمدنیا** و جناب آقای **دکتر بهروز فتحی** که راهنما و مشوق من در طول تحصیل بوده اند و از تجربیات ارزنده ایشان در طی دوران تحصیل بهره های فراوان برده ام.

از استاد عزیز جناب آقای **دکتر علی میرشاهی** که در انجام مراحل علمی پایان نامه کمک فراوانی به من نمودند، کمال تشکر را دارم.

برای دوستان خوبم در **ورودی ۸۵** زیباترین ها را به پاس لحظه های شیرین و خاطرات قشنگ با هم بودنمان آرزو می کنم.

سپاس فراوان از دوستان خوبم آقای **مهندس مرتضی زاهدی** و آقای **مهندس میلاد شادمان** به پاس همراهی و کمک های بی دریغ شان در انجام مراحل علمی و تدوین پایان نامه.

چکیده

به کوشش:

فائزه علی پور

استحصال و شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی اسب

در دهه اخیر، جداسازی انواع سلول‌های بنیادی و استفاده از آن‌ها در طب ترمیمی پزشکی و دامپزشکی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. بافت چربی حیوانات بالغ و از جمله اسب به عنوان یک منبع بالقوه از سلول های بنیادی مزانشیمی می‌باشد که می‌توانند در مهندسی بافت و درمان بیماری‌های اسکلتی-عضلانی در دامپزشکی مورد استفاده قرار گیرند. هدف این مطالعه، جداسازی، کشت و شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی اسب بود. بدین منظور، از سه مادیان ۳ تا ۱۰ ساله نمونه چربی از ناحیه قاعده دم حیوان به روش جراحی اخذ شد و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل گردید، عملیات جداسازی سلول‌ها با استفاده از هضم مکانیکی و آنزیمی (کلازناز) انجام شد و سلول‌ها در محیط کشت مناسب نگهداری شده و در زمان مطلوب پاساژ داده شدند. پس از رسیدن به پاساژ سوم، با استفاده از روش رونویسی معکوس- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (RT-PCR) بیان مارکرهای سطحی از قبیل CD29، CD34، CD44 و CD90 مورد بررسی قرار گرفت و همچنین سلول‌ها در معرض محیط‌های القا کننده تمایز به بافت‌های غضروف، استخوان و چربی قرار گرفتند.

نتایج مطالعه ریخت‌شناسی سلول‌ها نشان داد که سلول‌ها شبیه فیبروبلاست بوده و به ته فلاسک می چسبند. همچنین بر اساس نتایج حاصل از واکنش RT-PCR، بیان مارکرهای CD29، CD44 و CD90 و عدم بیان مارکر CD34 در این سلول‌ها مورد تایید قرار گرفت. قرار دادن سلول‌ها در محیط‌های القایی سبب تمایز آنها به غضروف، استخوان و چربی گردید. مجموع نتایج موید این نکته بود که سلول‌های جدا از نوع بنیادی مزانشیمی می‌باشند. امید است بتوان در آینده از این سلول‌ها در طب ترمیمی اسب استفاده نمود.

فهرست مطالب

استحصال و شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی اسب

مقدمه ۱

فصل اول: مروری بر تحقیقات انجام شده

۱-۱- تعریف سلول‌های بنیادی ۴

۱-۲- انواع سلول‌های بنیادی ۴

۱-۲-۱- سلول‌های بنیادی جنینی ۵

۱-۲-۲- سلول‌های بنیادی بند ناف ۵

۱-۲-۳- سلول‌های بنیادی بالغین ۶

۱-۲-۳-۱- سلول‌های بنیادی خون ساز ۶

۱-۲-۳-۲- سلول‌های بنیادی اپیتلیال ۶

۱-۲-۳-۳- سلول‌های بنیادی نورونی ۷

۱-۲-۳-۴- سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۷

۱-۲-۳-۵- سلول‌های بنیادی مختص سایر بافت‌ها ۸

۱-۳- خصوصیات سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۸

۱-۳-۱- خصوصیات سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط خارج از بدن ۹

۱-۳-۱-۱- خود نوزایی ۹

۱-۳-۱-۲- تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۱۰

۱-۳-۱-۲-۱-مکانیسم احتمالی تمایز ۱۱
۱-۳-۱-۲-۲- تنظیم تمایز ۱۲
۱-۴- خصوصیات سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی ۱۲
۱-۵- کاربرد سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۱۴
۱-۵-۱-کاربرد سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی ۱۴
۱-۵-۲- کاربرد سلول‌های بنیادی مزانشیمی در درمان اختلالات اندام حرکتی ۱۵
۱-۶- ویژگی ایمونولوژیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۱۷
۱-۷- شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی اسب ۱۸
۱-۷-۱-شاخصه‌های ظاهری (مورفولوژی) ۲۰
۱-۷-۲- شاخصه‌های ایمونوفنوتیپی ۲۰
۱-۷-۲-۱- بیان ژن در سطح MRNA و رابطه بین بیان نشانگرها در سطح MRNA و پروتئین ۲۰
۱-۷-۲-۲ عملکرد مولکول‌های خوشه تمایزی (CD) ۲۲
۱-۸- خصوصیات پیشنهادی برای شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی اسب ۲۴

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱- حیوانات مورد مطالعه ۲۷
۲-۲- مواد مورد استفاده ۲۷
۲-۳- اخذ نمونه چربی ۲۸
۲-۴- جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۲۹
۲-۴-۱- هضم مکانیکی و آنزیمی ۲۹
۲-۵- طرز تهیه محیط کشت DMEM ۳۱
۲-۶- انجماد سلولی ۳۲

۲-۷- بررسی وضعیت رشد سلولی ۳۲
۲-۸- بررسی توانایی تشکیل کلونی (CFU) ۳۳
۲-۹- بررسی پتانسیل تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دودمان‌های مزانشیمی ۳۳
۲-۹-۱- تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استخوان ۳۴
۲-۹-۱-۱- رنگ‌آمیزی آلیزارین رد ۳۵
۲-۹-۲- تمایزسلول‌های بنیادی مزانشیمی به چربی ۳۶
۲-۹-۲-۱- رنگ‌آمیزی با اویل رد ۳۷
۲-۹-۳- تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به غضروف ۳۸
۲-۱۰-۳- محاسبه مضاعف شدن سلولی ۳۸
۲-۱۱- آزمایش RT-PCR ۳۹
۲-۱۱-۱- مراحل استخراج RNA ۳۹
۲-۱۱-۲- مراحل ساخت CDNA ۴۱
۲-۱۱-۳- مراحل انجام PCR ۴۱
۲-۱۱-۳-۱- طراحی پرایمرها ۴۱
۲-۱۱-۳-۲- رقیق سازی پرایمرها ۴۲
۲-۱۱-۳-۳- تهیه محلول مستر میکس ۴۳
۲-۱۱-۳-۴-بررسی محصول PCR ۴۴

فصل سوم: نتایج

۳-۱- اخذ نمونه چربی و جداسازی سلول‌ها ۴۶
۳-۲- کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۴۶
۳-۳- تستCFU ۴۸
۳-۴- نمودار رشد سلولی ۴۹

۳-۵- مدت زمان مضاعف شدن سلول ۵۰
۳-۶- تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دودمان‌های مزانشیمی ۵۱
۳-۷- بررسی کمیت و کیفیت RNA استحصال شده از سلول‌های پاساژ سوم ۵۵
۳-۷-۱- نانودراپ ۵۵
۳-۸- بررسی محصولات حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ۵۵

فصل چهارم: بحث، نتیجه گیری و پیشنهادات

۴-۱- جداسازی سلول‌ها ۵۸
۴-۲-تمایز سلول‌ها به بافت‌های مختلف ۶۱
۴-۳- بیان نشانگرهای اختصاصی ۶۲
۴-۴- نتیجه گیری ۶۳
۴-۵- پیشنهادات ۶۴
منابع و مراجع ۶۵

فهرست تصاویر

تصویر ۲-۱- نحوه اخذ نمونه چربی از ناحیه قاعده دم اسب ۲۹

تصویر ۲-۲- پلت سلولی تشکیل شده در کف لوله..... ۳۰

تصویر ۲-۳- فلاسک‌های کشت اولیه سلول‌های جدا شده به کمک هضم مکانیکی و آنزیمی۳۱

تصویر ۲-۴- طریقه فیلتراسیون محیط کشت ۳۲

شکل ۲-۵- تصویر شماتیک نحوه کشت سلول‌های پاساژ ۳ برای تمایز به استخوان و چربی۳۴

تصویر ۲-۶- تصویر دستگاه نانودراپ..... ۴۰

تصویر ۳-۱- اولین سلول‌های چسبیده به کف فلاسک، ۴ روز پس از کشت اولیه..... ۴۷

تصویر ۳-۲- اولین کلونی‌های تشکیل شده در روز هفتم پس از کشت اولیه..... ۴۷

تصویر ۳-۳- تراکم سلولی در پایان پاساژ صفر. ۱۸ روز پس از کشت اولیه سلول ها..... ۴۸

تصویر ۳-۴- جمعیت یکنواخت از سلول‌های دوکی شکل و کشیده شبیه به فیبروبلاست در پاساژ دوم. ۴۸

تصویر ۳-۵- تجمع سلولی با ظاهر سلولی مکعبی در پاساژ صفر..... ۴۸

تصویر ۳-۶- پلیت مربوط به تست CFU پس از رنگ آمیزی کریستال ویوله..... ۴۹

تصویر ۳-۷-۱- سلول‌های تحت تمایز به استخوان قبل از رنگ آمیزی با آلیزارین رد..... ۵۲

تصویر ۳-۷-۲- سلول‌های تحت تمایز به استخوان پس از رنگ آمیزی آلیزارین رد ۵۲

تصویر ۳-۷-۳- سلول‌های تحت تیمار محیط کنترل پس از رنگ آمیزی با آلیزارین رد..... ۵۲

تصویر ۳-۸-۱- سلول‌های تحت تیمار با محیط القا کننده چربی قبل از رنگ آمیزی با اویل رد ۵۳

تصویر ۳-۸-۲- سلول‌های تحت تیمار با محیط القا کننده چربی پس از رنگ آمیزی با اویل رد ۵۳

تصویر ۳-۸-۳- سلول‌های تحت تیمار محیط کنترل که با اویل رد رنگ آمیزی شده ۵۳

تصویر ۳-۹-۱- توده حاصل از سلول‌های کشت داده شده تحت تیمار محیط القا کننده غضروف قبل از تهیه مقطع جهت رنگ آمیزی ۵۴

تصویر ۳-۹-۲- رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین سلول‌های تمایز یافته به غضروف ۵۴

تصویر ۳-۹-۳- رنگ آمیزی تولوئیدن بلو سلول‌های تمایز یافته به غضروف ۵۴

تصویر ۳-۱۰- باند حاصل از راندن RNA استخراج شده بر روی ژل ۵۵

تصویر ۳-۱۱- الکتروفورز محصولات تکثیر cDNA با پرایمرهای اختصاصی CD29, CD34, CD44, CD90 ..... ۵۶

فهرست جداول

جدول ۲-۱- مراحل و مقادیر مورد نیاز برای ساخت cDNA..... ۴۱

جدول ۲-۲- اطلاعات مربوط به پرایمرها و Accession Number هریک از آن‌ها ۴۲

جدول ۲-۳- اجزاء مورد نیاز برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز..... ۴۳

جدول ۲-۴- سیکل‌های دمایی مربوط به واکنش زنجیره ای پلیمراز..... ۴۴

جدول ۳-۱- میزان مضاعف شدن سلول‌ها در روز و مدت زمان (برحسب ساعت) مضاعف شدن سلول‌ها ۵۱

فهرست نمودار ها

نمودار ۳- ۱- نمودار رشد سلولی سه نمونه مورد مطالعه..... ۵۰

«مقدمه»

« مقدمه »

امروزه با پیشرفت طب دامپزشکی، گسترش روش‌های نوین درمانی، ظهور داروهای جدید و کاهش میزان وقوع بیماری‌های عفونی منجر به افزایش طول عمر مفید حیوانات شده است. با این وجود در بسیاری از بیماری‌ها از قبیل ضایعات نخاعی، تاندونی و عضلانی ساختارهای بافتی آسیب‌دیده به دلیل از دست رفت سلول‌ها و عدم جایگزینی آن‌ها قابل ترمیم نمی‌باشند و درمان با روش‌های معمول موجود امکان پذیر نمی‌باشد. لذا به منظور درمان این ضایعات و بازگرداندن عملکرد طبیعی اندام‌های آسیب‌دیده، در سال‌های اخیر طب ترمیمی[1] با کمک روش سلول درمانی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. از این رو، تلاش‌های زیادی در جهت شناسایی و دستیابی به سلول‌های با قابلیت ترمیم کنندگی بافتی انجام شده است.

پیشرفت‌های اخیر در زمینه تحقیقات سلول‌های بنیادی امیدهای تازه‌ای را در پزشکی و دامپزشکی در درمان بیماری‌ها و اختلالاتی که تا کنون درمان پذیر نبوده و یا با روش‌های درمانی موجود بهبود بالینی رضایت بخشی حاصل نمی‌شد، ایجاد کرده است. لذا جداسازی انواع سلول‌های بنیادی اعم از نوع جنینی و بالغین توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده و موفقیت‌های قابل توجهی را نیز به دنبال داشته است. با این وجود، در حال حاضر به دلایل متعددی از جمله خطر ایجاد تومور، استفاده بالینی از سلول‌های بنیادی جنینی در درمان بیماری‌های مختلف، علیرغم ویژگی‌های منحصر بفرد این دسته از سلول‌های بنیادی، به راحتی توصیه نشده و امکان‌پذیر نمی‌باشد هر چند که مواردی از درمان‌های موفق گزارش شده است. از طرف دیگر، شناسایی سلول‌های بنیادی بالغین در بافت‌ها و ارگان‌های مختلف انسان و گونه‌های مختلف دامی، این سلول‌ها را به عنوان منابع قابل توجهی از سلول‌های چندتوان و پیش‌ساز سلول‌های مختلف برای استفاده در درمان‌های سلولی و مهندسی بافت مطرح نموده است، چرا که استفاده از این سلول‌ها با خطرات کمتری مواجه است. خوشبختانه با پیشرفت‌های چشمگیری که در طی سال‌های اخیر در زمینه شناخت بیولوژی و تمایز سلول‌های بنیادی و همچنین ابداع روش-های برنامه‌ریزی مجدد سلولی حاصل شده است، به نظر می‌رسد که در آینده‌ای نزدیک شاهد ارائه روش‌های درمانی جدید و موثر در درمان بیماری‌های درمان ناپذیر و صعب‌العلاج در انسان و حیوانات بر اساس فناوری سلول های بنیادی باشیم. سلول‌های بنیادی مشتق از بافت‌های مختلف، به ویژه سلول‌های بنیادی مزانشیمی نوید بزرگی در درمان بیماری‌های ارتوپدی اسب است. ولی از آنجایی که ویژگی‌ها و خصوصیات کامل سلول‌های بنیادی اسب تا حدود زیادی ناشناخته باقی مانده است لذا علیرغم استفاده گسترده این سلول‌ها به صورت تجاری یا آزمایشی هنوز معتقدیم نیاز به درک بهتری از بیولوژی و مفاهیم پایه سلول‌های بنیادی در جهت توسعه کاربردی و ارزیابی مناسب کاربردهای بالینی در اسب مورد نیاز است.

[1] - Regenerative medicine

لذا در این مطالعه بر آن شدیم تا درابتدا سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی اسب را جدا نموده و شناسایی نماییم تا قدم‌های اولیه را در روش سلول درمانی بیماری‌های مختلف اسب اعم از ضایعات اسکلتی-عضلانی برداریم و علاوه بر صرفه‌جویی در هزینه‌های درمانی، شاهد بهبود مطلو

«فصل اول»

مروری بر تحقیقات انجام شده