دانشگاه تربیت معلم تهران

دانشکده علوم پایه

پایان‌نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

رشته زیست‌شناسی

گرایش سلولی-تکوینی جانوری

عنوان

بررسی اثر تمایزی مایع زجاجیه روی سلولهای بنیادی مشتق شده از مایع آمنیوتیک

استاد راهنما

دکتر هما محسنی کوچصفهانی

استاد مشاور

دکتر محمد نبیونی

نگارنده

نسیم اسلامی

شهریور ۹۰

تقدیر و تشکر

سپاس و حمد بی حد ایزد را سزد که بنی‌آدم را صاحب علم و قلم نمود تا کرامتی درخور یابند و درود فراوان نثار صاحبان فضل و معرفت که روشنی بخش عرصه گیتی شدند.

اکنون که در سایه الطاف الهی این کار پژوهشی به پایان رسید بر خود لازم می‌دانم که از تمامی اساتید گرامی و دوستان عزیزی که در تهیه و تدوین این رساله مرا یاری کردند تشکر نمایم.

- استاد ارجمندم سرکار خانم دکتر هما محسنی کوچصفهانی که با تقبل راهنمایی و نظارت در مراحل مختلف این کار تحقیقاتی مرا مرهون لطف خویش نمودند.
- استاد گرامی جناب آقای دکتر محمد نبیونی که در طول انجام این کار تحقیقاتی امکانات لازم را فراهم آوردند و با قبول مشاورت پایان نامه بر من منت نهادند.
- اساتید گرانقدرم جناب آقای دکتر کاظم پریور، بزرگ دانشمند جهان اسلام و سرکار خانم دکتر مهناز آذرنیا که در طول دوره کارشناسی ارشد افتخار شاگردی ایشان را داشتم و زحمت داوری را تقبل فرمودند.
- استاد محترم سرکار خانم دکتر شهربانو عریان که در طول دوره کارشناسی ارشد از راهنمایی‌های ایشان بهره بردم.
- همه دوستان عزیزم در دانشگاه تربیت معلم و همراهان دلسوزم خانم پریسا غیبی و خدیجه بهره‌بر که در طول انجام این کار تحقیقاتی همواره همراه و یاریگر من بودند.
- پدر و مادر بزرگوارم و برادر مهربانم که در تمام دوران زندگی لحظه به لحظه پشتیبان و یاریگر من بوده‌اند و با حمایت‌ها و دلگرمی‌هایشان مرا در انجام این کار پژوهشی یاری نمودند.
- همسر عزیزم که مشوق من در به اتمام رساندن این کار پژوهشی بودند.

تقدیم به

پدر و مادر

بزرگوارم

برادر و همسر

مهربانم

فهرست

چکیده..... 1

فصل اول 2

مقدمه 2

۱-۱-سلول های بنیادی 3

۱-۱-۱-تقسیم بندی سلول های بنیادی بر اساس توان تمایزی و برگشت پذیری 4

۱-۱-۲-تقسیم بندی سلول های بنیادی بر اساس منشاء..... 5

۱-۱-۳- سلولهای بنیادی مزانشیمی 6

۱-۲-مایع آمنیوتیک..... 7

۱-۲-۱- سلولهای موجود در مایع آمنیوتیک..... 8

۱-۲-۲- سلولهای بنیادی مزانشیمی مایع آمنیوتیک 9

۱-۳-فاکتور رونویسی Oct4..... 11

۱-۴-رشد و نمو چشم... 12

۱-٤-۱- رشد و نمو عدسی چشم..... 13

۱-٤-۲- زجاجیه..... 20

۱-٤-۳-کریستالینها در چشم..... 21

۱-٤-۳-۱-آلفا کریستالینها..... 22

۱-٤-۳-۲-عملکرد آلفا کریستالینها 24

۱-٤-۳-۳-اعمال β- و γ- Crystalline : 27

۱-۵- مطالعات قبلی انجام شده در مورد تمایز سلولهای فیبری عدسی چشم..... 28

۱-۶- ضرورت و اهداف تحقیق 31

فصل دوم 33

مواد و روشها..... 33

۲-۱- آماده کردن حیوان آزمایشگاهی 34

۲-۲- وسایل لازم 34

۲-۳- مواد لازم..... 36

۲-۴-جداسازی سلولهای بنیادی مایع آمنیوتیک..... 38

۲-۵-کشت سلولهای بنیادی مایع آمنیوتیک 39
۲-۵-۱-تهیه محلولهای مورد نیاز 39
۲-۵-۱-۱- تهیه محیط کشت DMEM 39
۲-۵-۱-۲- تهیه FBS 39
۲-۵-۱-۳- محلول تریپسین- EDTA 39
۲-۵-۱-٤-نحوه تهیه بافر فسفات 40
۲-۵-۱-۵- کشت اولیه سلولهای بنیادی مایع آمنیوتیک 40
۲-۶-پاساژ سلولهای بنیادی مایع آمنیوتیک 40
۲-۷- شناسایی سلولهای بنیادی مزانشیمی در محیط کشت 41
۲-۷-۱- تهیه محلولهای مورد نیاز 41
۲-۷-۱-۱- تهیه بافر BSA ۰/۱ و ۰/۲ درصد 41
۲-۷-۱-۲- تهیه محلول مسدود کننده Tween /PBS۰/۱ % 41
۲-۷-۱-۳- تهیه محلول رنگ Hoechst 42
۲-۷-۲- بررسی بیان ژن Oct4 در سلولهای بنیادی مزانشیمی مایع آمنیوتیک به روش ایمنوسیتوشیمی 42
۲-۷-۳-بررسی بیان Oct4 ، CD29، CD90، CD45، CD31 به روش فلوسیتومتری 43
۲-۷-۳-۱-آماده سازی نمونه ها برای بررسی مارکرهای CD29، CD90، CD45، CD31 که در سطح سلول قرار دارند 43
۲-۷-۳-۲-آماده سازی نمونهها برای بررسی مارکرهای داخل سلولی Oct4 44
۲-۸- شمارش سلولی 45
۲-۹- انجماد سلولها 46
۲-۱۰-ذوب کردن سلولها 46
۲-۱۱- روش تهیه زجاجیه 47
۲-۱۲- بررسی تأثیر زجاجیه بر روی تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی مایع آمنیوتیک 48
۲-۱۲-۱- کشت سلولهای بنیادی مایع آمنیوتیک همراه با زجاجیه و بدون زجاجیه به مدت ١٤ روز 48
۲-۱۲-۲- کشت سلولهای بنیادی همراه با زجاجیه و بدون زجاجیه به مدت ۲۱ روز 48
۲-۱۳- بررسی بیان ژنهای آلفا کریستالینها به روش ایمنوسیتوشیمی 49
فصل سوم 51
۳-۱-کشت اولیه مایع آمنیوتیک 52

۳-۲-کشت سلولهای بنیادی مایع آمنیوتیک..... 52
۳-۳- شناسایی سلولهای بنیادی مایع آمنیوتیک با استفاده از مارکر Oct4 به روش ایمنوسیتوشیمی..... 55
۳-۴- نتایج بررسی بیان مارکرهای Oct4، CD29، CD90، CD31و CD45 در سلولهای بنیادی مزانشیمی مایع آمنیوتیک به روش فلوسیتومتری 57
۳-۴- کشت سلولهای بنیادی همراه با مایع زجاجیه به مدت ۱۴ روز 59
۳-۵- کشت سلولهای بنیادی همراه با مایع زجاجیه به مدت ۲۱ روز 59
۳-۶- بررسی بیان ژنهای کریستالین با استفاده از تکنیک ایمنوسیتوشیمی در گروههای تیمار شده به مدت ۱۴ روز..... 64
۳-۷- بررسی بیان ژنهای کریستالین با استفاده از تکنیک ایمنوسیتوشیمی در گروههای تیمار شده به مدت ۲۱ روز..... 64
فصل چهارم..... 66
تفسیر نتایج حاصله و اهمیت آنها 67
پیشنهادات..... 73
منابع..... 74
چکیده انگلیسی.....89

Tarbiat Moalem University

Faculty Of Science

Department Of Biology

M.Sc Thesis

Title

Survey Of The Differential Effect Of Vitreous Humor On The Stem Cells Derived From Amniotic Fluid

Supervisor

Dr. Homa Mohseni kouchesfehani

Advisor

Dr. Mohammad Nabiuni

Prepared By

Nasim Eslami

August 2011

چکیده

سلولهای بنیادی مزانشیمی سلولهایی تمایز نیافته با قدرت تکثیر بالا هستند که توانایی تمایز به رده های مشتق شده از بافت های مزودرمی و غیر مزودرمی را دارا هستند.یکی از منابع مناسب برای جداسازی این سلولها مایع آمنیوتیک است. سلولهای بنیادی مزانشیمی موجود در مایع امنیوتیک سلولهای چند توانی هستند با قدرت خودنوزایی و تکثیر بالا که فاکتور Oct4 را بیان میکنند. این سلول‌ها توانایی تمایز به انواعی از سلولهای هر سه لایه زاینده مانند سلولهای استخوانی ، چربی ، عضلانی، عصبی ، اندوتلیالی و کبدی را در مجاورت محیط های تمایزی ویژه دارا هستند. یکی از محیط هایی که میتواند جهت تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی مورد استفاده قرار گیرد مایع زجاجیه است که با تحریک بیان کریستالین‌ها باعث تخصص یابی ساختاری آنها به سلولهای فیبری عدسی می‌گردند. در سلول‌های عدسی چشم مهره‌داران سه نوع پروتئین آلفا، بتا و گاما کریستالین وجود دارد. آلفا کریستالین‌ها پروتئین‌های عمده سلول‌های فیبری عدسی چشم هستند که به دو گروه عمده αA و αB کریستالین تقسیم‌بندی می‌شوند. در این مطالعه سلول های بنیادی مزانشیمی از مایع آمنیوتیک موش های ماده باردار بر اساس خاصیت چسبندگی این سلول‌ها به سطح ظروف کشت جداسازی شده و در محیط کشت DMEM به همراه FBS و آنتی بیو تیک کشت داده شدند. سلول‌های جداسازی شده پس از پاساژ اول جهت بررسی بیان Oct4 و مارکرهای سلول های مزانشیمی مورد مطالعه قرار گرفتند. این سلول‌ها از نظر مورفولوژی شبیه به فیبروبلاست بودند. بیان فاکتور Oct4 که یک فاکتور اختصاصی سلول‌های بنیادی است در این سلول‌ها به روش ایمنوسیتوشیمی مورد تایید قرار گرفت.همچنین مزانشیمی بودن این سلول‌ها باببررسی بیان مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی به روش فلوسیتومتری نشان داده شد. جهت القای تمایز سلول های پاساژ3 در محیط کشت حاوی FBS و آنتی‌بیوتیک و مایع زجاجیه گرفته شده از چشم گاو به مدت 14 و 21 روز کشت داده شدند. بیان آلفا کریستالین‌ها در سلول‌های تحت تیمار به روش ایمنوسیتوشیمی ارزیابی شد. بررسی ایمنوسیتوشیمی سلول‌های تحت تیمار نشان داد که سلول‌های تحت تیمار در محیط حاوی 40% مایع زجاجیه، آلفا کریستالین‌ها را بیان کردند و به سمت سلول‌های فیبری عدسی تمایز پیدا کردند. یافته های حاصل از این کار تحقیقاتی نشان داد که سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مایع آمنیوتیک موش Oct4 و CD29 را بیان می‌کنند اما CD45، CD31و CD90 را بیان نمی کنند و در in vitro می‌توان با مایع زجاجیه تمایز این سلول‌ها را در جهت تشکیل سلول های فیبری عدسی چشم تحریک کرد.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، مایع آمنیوتیک، مایع زجاجیه، کریستالین‌ها، سلول‌های فیبری عدسی چشم.

فصل اول

مقدمه

1-1-سلول های بنیادی

سلول های بنیادی سلول های تمایزنیافته با قدرت تکثیر و خود نوزایی[1] بالاو ایجاد انواع سلول های تمایز یافته تحت تاثیر سیگنال های بیولوژیکی اختصاصی هستند که در اکثر موجودات پرسلولی یافت می شوند(Becker et al, 1963; Siminovitch et al, 1963). خود نوزایی، به معنای مجموع تکثیر و حفظ توان تکوینی برای تمایز به انواع دیگر سلول ها است.سلول های بنیادی در مراحل مختلف تکوین قرار دارند و به همین علت درجات متفاوتی از خود نوزایی را نشان می دهند. در دوره بلوغ سلول‌های بنیادی و سلول‌های پیش‌ساز[2] برای بدن نقش یک سیستم ترمیم‌کننده را بازی می‌کنند و با جایگزین کردن سلول‌های تخصص یافته، چرخه ترمیم بافت‌ها را حفظ می‌کنند. معمولا برای سلول‌های بنیادی خصوصیاتی در نظر گرفته می‌شود که برخی از آن‌ها عبارتند از:

- جمعیت کمی از سلول‌های یک بافت را به خود اختصاص می‌دهند.
- از نظر فراساختاری تخصص نیافته هستند و دارای نسبت هسته به سیتوپلاسمی بالا و اندامک‌های کمی هستند.
- چند توان هستند و می‌توانند به چند سلول تبدیل شوند.
- از آن‌جائیکه این سلول‌ها، جمعیت سلولی کمی را به خود اختصاص می‌دهند و تقسیمات سلولی کمی دارند، تامین سلول‌های یک بافت توسط آن‌ها معمولا با دخالت حد واسط‌هایی به نام سلول‌های پیش‌ساز همراه است.
- معمولاً عمر بیشتری نسبت به سایر سلول‌های یک بافت دارند.
- وضعیت این سلول‌ها به شدت توسط محیط کنترل می‌شود(Miller et al, 1993).

امروزه می‌توان با تمایز این سلول‌ها به سلول‌های تخصص یافته بافت‌های مختلف، از این سلول‌ها در سلول‌درمانی استفاده کرد (Tuch, 2006).

[1] Self-renewal
[2] progenitor cells

1-1-1-تقسیم بندی سلول های بنیادی بر اساس توان تمایزی و برگشت پذیری

Wagers و Weissman در سال 2004 سلول‌های بنیادی را بر اساس توان تمایزی و برگشت پذیری آن‌ها به 4 چهار گروه تقسیم بندی نمودند:

1) همه توان[1]: این سلول ها می توانند همه سلول ها اعم از سلول های فرد و سلول های خارج جنینی (جفت) را بسازند. مانند بلاستومرهای یک جنین دوسلولی که هر سلول آن می تواند یک فرد کامل را بسازد.

2) پر توان [2]: سلول هایی هستند که می توانند غالب یا همه سلول های فرد را بسازند. مثلا سلول های بنیادی جنینی می توانند تحت شرایط خاص یک فرد را بسازند ، ولی توانایی تولید سلول های خارج جنینی را ندارند. سلول های به دست آمده از گنادهای جنینی [3] که به آنها سلول های زاینده جنینی [4] گفته می شود(Shamblott et al, 1998) و سلول های تمایز نیافته کارسینومای جنینی[5] مشتق از تراتوکارسینوماها ، جزو دسته سلول های بنیادی پرتوان هستند(Solter et al, 1970).تراتوکارسینوماها، تومورهای تمایز یافته خوش خیم هستند که دارای جمعیت های تمایز نیافته زیادی می باشند.

3) چند توان[6]: این سلول ها تعداد محدودتری از انواع سلولها را ایجاد می کنند (مانند سلول های بنیادی واقع در بافت های بزرگسالان). عملکرد اولیه این سلول ها حفظ هومئوستازی در بافت ها و اندام ها می باشد. تعدادی از سلول های بنیادی بالغ توان تمایز به سلول های دیگر به غیر از بافتی که از آن منشاء گرفته اند را دارا هستند. سلول‌های بنیادی گرفته شده از ضمائم جنینی ماند سلول‌های بنیادی مایع آمنیوتیک و سلول‌های بنیادی بند ناف در این گروه قرار می‌گیرند.

[1] totipotent
[2] Pluripotent
[3] fetus
[4] Embryonic Germ Cells :EGs
[5] Embryonic Carcinoma Cells: ECs
[6] multipotent

1-1-2-تقسیم بندی سلول های بنیادی بر اساس منشاء

سلول‌های بنیادی را می‌توان بر اساس منشاء آن‌ها به دو گروه سلول‌های بنیادی جنینی و بالغ (بزرگسالان) تقسیم بندی نمود.

1)سلول های بنیادی جنینی: این سلول ها به طور معمول از توده سلولی داخلی[1] به دست می آیند ، خاصیت خودنوزایی طولانی مدت داشته و سلول های پرتوانی هستند که توانایی تمایز به انواع سلول های حاصل از سه لایه زاینده جنینی را دارند و همچنین قادر به تولید کولونی های سلولی مشابه خود هستند(Martin, 2003).

2) سلول های بنیادی بالغ : این سلول ها در بسیاری از بافت های تخصص یافته بدن مانند مغز، مغز استخوان، کبد، پوست، لوله گوارش، قرنیه و شبکیه چشم و حتی پالپ عاج دندان یافت می شوند (Smith, 2001). در بزرگسالان در هنگام جراحت و حتی در غیاب آن این سلول ها به طور مداوم فعال هستند. قبلا دانشمندان فکر می کردند که سلول های بنیادی بزرگسالان، تنها سلول های همان بافت را ایجاد می کنند، اما امروزه معتقدند که انعطاف پذیری این سلول ها بالا است و می توانند انواع دیگری از سلول ها را بسازند.

موفقیت هایی که در دهه های اخیر در مورد جداسازی سلول های بنیادی جنینی انسانی به دست آمده باعث شده که دانشمندان بتوانند از این سلول ها در درمان بیماریهای انسانی استفاده کنند(Thomson et al, 1998). اما استفاده از سلول های بنیادی جنینی در مطالعات زیستی و درمان بیماریها دارای مشکلات و محدودیت های اخلاقی است. همچنین نگهداری سلول های بنیادی جنینی در محیط in vitro مشکل است واین سلول ها نیازمند به لایه تغذیه کننده و یا سیتوکین های پر هزینه برای حفظ رشد خود هستند(Thomson et al, 1998). بعلاوه سلول های بنیادی جنینی با گذشت زمان در in vitro دچار تغییرات ژنتیکی و کروموزومی می شوند(Hanson & Caisander, 2005; Maitra et al, 2005). مهمترین نکته در مورد سلول های بنیادی جنینی این است که این سلول ها پس از پیوند در بدن انسان باعث ایجاد تراتوم می شوند و تا کنون دانشمندان موفق به حذف خطر ایجاد تراتوم های ناشی از پیوند در بدن انسان نشده اند(Fujikawa et al 2005).

[1] Inner Cell Mass:ICM

در مقایسه با سلول های بنیادی جنین ، استفاده از سلول های بنیادی بالغ مشکلات کمتری دارد. سلول های بنیادی بالغ توانایی تمایز به انواع مختلف سلول ها را دارا هستند، اما پتانسیل تمایزی سلول های بنیادی بالغ نسبت به سلول های بنیادی جنینی کمتر است. به این ترتیب سلول های بنیادی بالغ به عنوان منبعی جدید در سلول درمانی در نظر گرفته می شود. یکی از انواع سلول های بنیادی بالغ با کاربرد وسیع ، سلول های بنیادی مزانشیمی است.

3-1-1- سلول‌های بنیادی مزانشیمی

سلول های بنیادی مزانشیمی به عنوان سلول های چند توانی در نظر گرفته می شوند که توانایی تمایز به سلول های بالغ بسیاری از بافت های بدن را دارا هستند. این سلول ها از نظر مورفولوژیکی دوکی و شبیه فیبروبلاست ها می باشند. سلول های بنیادی مزانشیمی اولین بار از مغز استخوان بالغ جداسازی شد ، که این جداسازی بر اساس خاصیت چسبندگی سلول های مزانشیمی به کف ظروف پلاستیکی ، برخلاف عدم چسبندگی سلول های هماتوپویتیک صورت پذیرفت که در حقیقت این روش جداسازی تا به امروز به عنوان روشی استاندارد برای جداسازی سلول های بنیادی مزانشیمی شناخته شده است و استفاده می گردد. سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان ، سلول های چند توانی هستند که توانایی تمایز به دود مان های مختلف مانند استخوانی ، کندروسیتی ، چربی و کاردیومیوسیتی را دارا هستند (Prockop, 1997) .سلول های بنیادی مزانشیمی بعدها در بسیاری از بافت های دیگر مانند گردش خون محیطی بالغ و جنین ، کبد جنین ، طحال جنین ، جفت ، بند ناف ، خون بند ناف ، غشای آمنیوتیک و مایع سینوویال شناسایی شد (Okita et al, 1983; Campagnoli et al, 2001; Hu et al 2003, Romanov et al, 2003; Bilic et al, 2004). میزان اندک سلول های بنیادی مزانشیمی موجود در مغز استخوان ،سختی گرفتن این سلول ها از مغز استخوان و کاهش پتانسیل تمایزی این سلول ها با افزایش سن، دانشمندان را مجبور به یافتن منابعی دیگر از سلول های بنیادی مزانشیمی کرده است (Stenderup et al, 2003).در مطالعات اخیری که انجام شده مایع آمنیوتیک به عنوان منبعی بسیار مناسب از سلول های بنیادی مزانشیمی معرفی شده است. مزایای استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مایع آمنیوتیک عبارت‌اند از:

- جدا کردن سلول‌های بنیادی از سایر منابع مانند مغز استخوان یک عمل تهاجمی و دردآور است و تعداد و توانایی تمایزی سلول‌های جداشده با افزایش سن کاهش می‌یابد (Roa & Matton, 2001).
- در مقایسه با سلول‌های بنیادی سایر منابع از جمله مغز استخوان، سلول‌های بنیادی مایع آمنیوتیک از قدرت تکثیر و توانایی تمایزی بالاتری برخوردارند (Nadri & soleimani, 2007).
- دسترسی به سلول‌های مایع آمنیوتیک آسان‌تر است و نیازمند صرف هزینه کمتری است.

1-2-مایع آمنیوتیک

مایع آمنیوتیک ، لایه محافظتی احاطه کننده جنین در حال تکوین است که حفاظت مکانیکی و مواد غذایی لازم جهت رشد جنین را فراهم می آورد و محتوی سلولهای مشتق شده از بافت های جنینی و خارج جنینی است(Fauza, 2004; Gosden, 1983). از این مایع برای تشخیص ناهنجاریهای جنینی قبل از تولد استفاده می شود. در اولین دوره بارداری بخش اعظم مایع آمنیوتیک در نتیجه انتقال فعال سدیم و کلرید از خلال غشای آمنیون و پوست جنین به همراه انتقال غیر فعال آب بوجود می آید(Brace & Resnik, 1999). در نیمه دوم بارداری ، قسمت بیشتر مایع آمنیوتیک حاصل ادرار جنین است. منبع دیگر مایع آمنیوتیک ، ترشحات مجرای تنفسی است(Olver & Strang, 1974; Mescher et al, 1975). همچنین ترشحات معده و روده جنین نقش اندکی در ترکیبات مایع آمنیوتیک دارد(Muller et al, 1994). به این ترتیب در نتیجه دینامیک این مایع ، سلول های موجود در مجاری ادراری ، تنفسی و گوارشی جنین می توانند وارد حفره آمنیون شوند(Godsen, 1983; Brace & Resnik, 1999; Hoehn & Salk, 1982) محتویات مایع آمنیوتیک در طول دوران بارداری به طرز قابل پیش بینی تغییر می کند.در انسان ، در اوایل بارداری تا هفته 24 به علت تراوش پلاسمای جنینی از طریق دسیدوآی مادری و یا پوست جنین قبل از کراتینه شدن ، مایع آمنیوتیک نسبت به خون جنین ایزوتونیک است(Albuquerque et al, 1999). پس از آن و تا انتهای دوره ، مایع آمنیوتیک نسبت به پلاسمای جنینی و مادری هیپوتونیک می شود(Lind, 1973). به این ترتیب به نظر می

رسد کلیه این تغییرات ایجاد شده در محتویات مایع آمنیوتیک در تنوع اشکال سلولی موجود در مایع نقش دارد(Torricelli et al, 1993; Bili et al, 2002).

1-2-1- سلول‌های موجود در مایع آمنیوتیک

مایع آمنیوتیک شامل مجموعه ای هتروژن از انواع سلول های هر سه لایه زاینده است که نوع و ویژگی این سلولها با توجه به سن بارداری و پاتولوژی جنین متفاوت است(Torricelli et al, 1993; Bili et al, 2002). منشاء این سلول ها ، بخش مزانشیمی جفت و خود جنین است.مکانیسم تولید و جذب مایع آمنیوتیک درتعیین نوع سلول های موجود در این مایع نقش دارد. سلول های موجود در مایع آمنیوتیک را بر اساس شکل و خصوصیات تکثیری می توان به انواع زیر تقسیم بندی کرد(Milunsky, 1979):

1) سلول های اپیتلیوئیدی
2) سلول های ویژه مایع آمنیوتیک
3) سلول های فیبروبلاستی

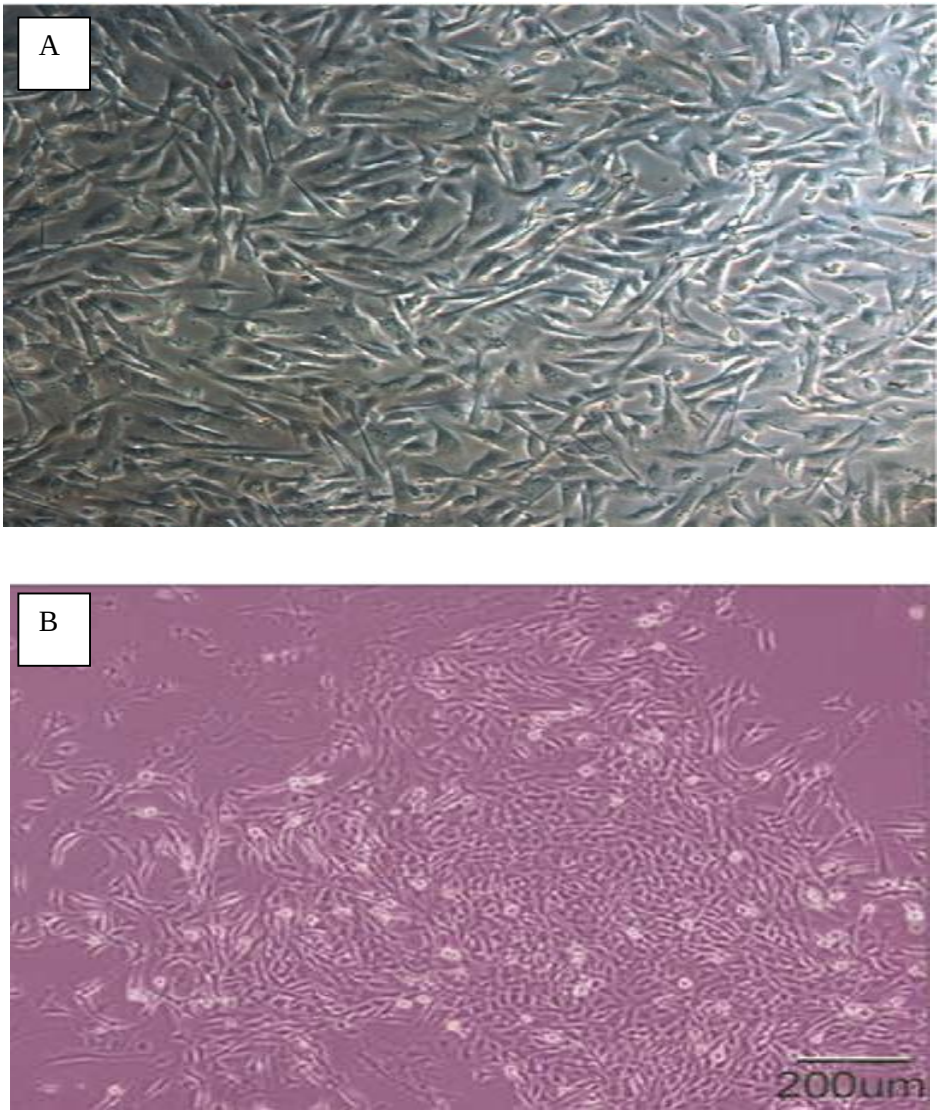
سلول های اپیتلیوئیدی و سلول های ویژه آمنیوتیک در اوایل کشت ظاهر می شوند، اما سلولهای فیبروبلاستی دیرتر ظاهر می شوند و با ادامه کشت سلول ها این سلول ها حفظ می شوند. هنوز منشاء قطعی انواع سلول های موجود در مایع آمنیوتیک مشخص نیست اما تصور می شود که سلول های اپیتلیوئیدی از پوست و ادرار جنین مشتق می شوند. سلول های مخصوص مایع آمنیوتیک به عنوان سلول های مشتق شده از غشاهای جنینی و تروفو بلاستی در نظر گرفته می شوند. این فرضیه که منشاء سلول های مخصوص آمنیوتیک را بافت تروفوبلاست جفت می داند توسط مطالعاتی حمایت می شود که بیان می کند این سلول ها استروژن ، گنادوتروپین کوریون انسانی و پروژسترون ترشح می کنند.گمان می رود که منشاء سلول های

فیبروبلاستی بافت های پیوندی و فیبروبلاست های درمی باشد(Godsen, 1983; Hoehn & salk, 1982; Milunsky, 1979; Prusa & Hengstschlager, 2002).

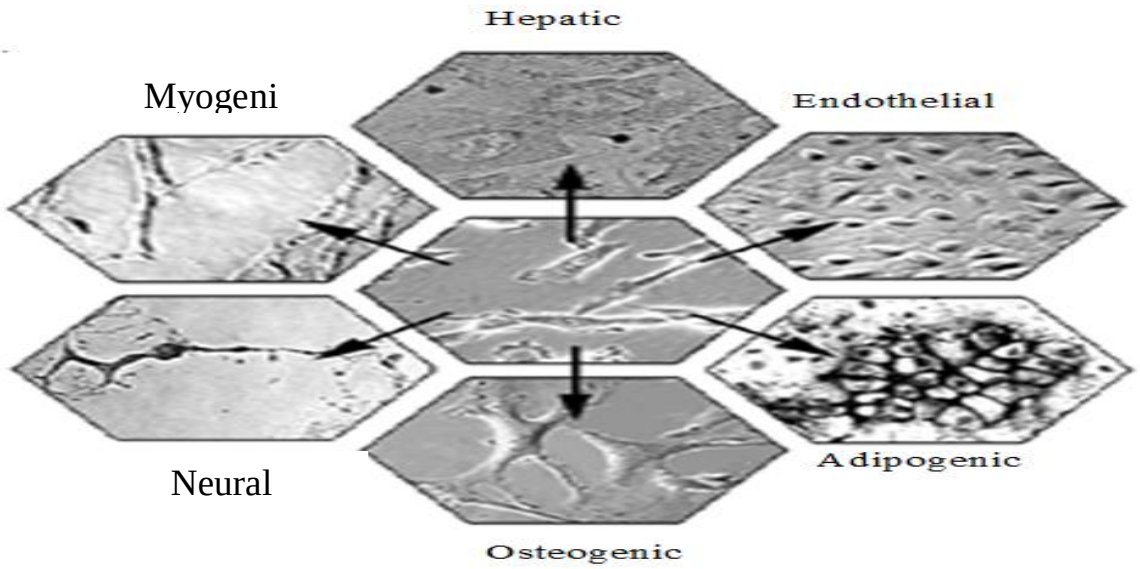
1-2-2- سلول‌های بنیادی مزانشیمی مایع آمنیوتیک

سلول های فیبروبلاستی مایع آمنیوتیک از نظر فنوتیپی و پتانسیل تمایزی تا حد زیادی شبیه سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان هستند(In't Anker et al, 2003).مشخص شده که سلول‌های بنیادی مشتق شده از مایع آمنیوتیک فنوتیپ هر دو نوع سلول‌های بنیادی بالغ و سلول‌های بنیادی جنینی را بیان می‌کنند(DeCoppi et al, 2007). به این ترتیب تصور می‌شود که سلول‌های مایع آمنیوتیک در مرحله‌ای حد واسط بین سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی بالغ باشند (Liu et al, 2009). این سلول‌ها در محیط کشت ظاهر فیبروبلاستی دارند(شکل 1-1)، دارای پتانسیل تکثیری بالایی هستند و فاکتور Oct4 را بیان می کنند. سلول‌های مایع آمنیوتیک انسانی می توانند به انواع سلول های هر سه لایه زاینده مانند سلول های چربی ، میوژنیک ، استخوانی ، اندوتلیالی ، عصبی و کبدی تمایز یابند (شکل2-1)(DeCoppi et al, 2007; You et al, 2008; Zheng et al, 2008). در مطالعاتی که در سال 2009 توسط Liu و همکارانش بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مایع‌آمنیوتیک موشی انجام شد نشان داده شد که این سلول‌ها توان تمایزی به سلول‌های چربی، استخوانی، ماهیچه-ای و عصبی را دارا هستند. اولین شواهد مبنی بر وجود جمعیتی ویژه از سلول‌ها در مایع آمنیوتیک توسط دو گروه تحقیقاتی در سال 2002و2003 بدست آمد(Prusa et al 2003; Pursa & Hengstschlager, 2002; In't Anker et al, 2003). این مطالعات نشان دادند که سلول‌های بنیادی مایع آمنیوتیک انسانی mRNA Oct4 را بیان کردند، برای مارکرهای مزانشیمی مانند CD90 ، CD105 ، CD73 ، CD166 مثبت و برای مارکرهای خونساز مانند CD45 ، CD34 ، CD14 منفی بودند(In't Anker et al, 2003; Prusa et al, 2003). مطالعات دیگری که در سال های 2007 توسط محققین دیگری انجام شد یافته های قبلی را تائید کرد و نشان داد که سلولهای بنیادی مایع آمنیوتیک توموروژنیک نیستند و توانایی دو برابر شدن تا بیش از 250 بار را با حفظ کاریوتیپ نرمال دارا هستند.(DeCoppi et al, 2007).در مطالعه‌ای که در سال 2007

انجام شد مشخص شد که سلول‌های بنیادی مزانشمی مایع آمنیوتیک موشی سلولهایی با توانایی تکثیر و خودنوزایی بالا هستند که CD44 را بیان می‌کنند اما CD31، CD45 و CD90 را بیان نمی‌کنند(Nadri & Soleimani 2007). به این ترتیب این ویژگیهای سلولهای بنیادی مایع آمنیوتیک و روش آسان به دست آوردن آنها در مقایسه با سایر منابع سلول های بنیادی ، این سلولها را کاندید مناسبی جهت استفاده در درمان بیماریها کرده است.



شکل1-1- A: ظاهر فیبروبلاستی سلول‌های بنیادی مایع آمنیوتیک انسانی در محیط کشت(You et al 2008) .B: ظاهر فیبروبلاستی سلول‌های بنیادی مایع آمنیوتیک موشی در محیط کشت(Nadri & Soleimani 2007) (بزرگنمایی 100X).



شکل1-2 : سلول‌های جدا شده از مایع آمنیوتیک انسانی که توانایی تمایز به انواع سلول‌های ماهیچه‌ای، کبدی، اندوتلیالی، چربی، استخوانی و عصبی را دارا هستند (Decoppi et al, 2006).

1-3- فاکتور رونویسی Oct4

فاکتور رونویسی Oct4، مارکری برای سلول‌های بنیادی پرتوان است که اولین و فراوان‌ترین مارکر شناسایی شده در این سلول‌هاست. بیان این ژن در دوران جنینی به ترتیب به سلول‌های مورولا، توده سلولی داخلی، اپی‌بلاست و سلول‌های زاینده جنسی که سلول‌های پرتوان می‌باشند محدود می‌شود. بررسی‌های ایمنوسیتوشیمی، وسترن بلات و RT-PCR حضور این فاکتور را در سلول‌های بنیادی مایع آمنیوتیک تائید کرده است (Hengstchlager, 2005). این ژن در بافت‌های تمایز یافته بیان نمی‌شود و بیان آن محدود به سلول‌های پرتوان است. با بیان این ژن در این سلول‌ها، ورود به مسیرهای تمایز ی و تولید لایه‌های جنینی مهار شده و سلول‌ها با حالت پرتوان به تکثیر خود ادامه می‌دهندبه این ترتیب حضور Oct4 برای حفظ خودنوزایی و پرتوانی سلول‌ها و جلوگیری از ورود به مسیرهای تمایزی ضروری است (Hochedlinge et al 2005, Atlasi & Mowla 2007).

1-4- رشد و نمو چشم

سیستم بینایی از اجزای مهم بدن مهره‌داران است که برای ارتباط با محیط خارج از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. عامل مؤثر در دید بهتر ، سیستم متمرکز کننده مناسب نور است. اجزای عمده این سیستم عبارتند از قرنیه، عدسی و مایعات درون چشمی[1]. تشکیل چشم با ایجاد حباب بینایی[2] که نتیجه بیرون‌زدگی دیانسفالن[3] است آغاز می‌شود حباب بینایی سپس تبدیل به جام بینایی می‌شود. جام بینایی[4] به دو لایه و در دو مسیر مجزا تمایز می‌یابد. سلول‌های لایه خارجی پیگمان ملانین را تولید می‌کنند که نهایتاً شبکیه پیگمان‌دار[5] را به وجود می‌آورند. سلول‌های لایه داخلی به سرعت تکثیر می‌شوند و انواع سلول‌های گلیالی، گانگلیونی، اینترنورون و نورون‌های گیرنده نور را ایجاد می‌کنند که مجموعاً بخش عصبی شبکیه[6] را تشکیل می‌دهند. حباب بینایی ایجاد شده در محل برخورد با اکتودرم سری، تشکیل پلاکود عدسی[7] را القا می‌کند، که با فرورفتن این پلاکود به سمت داخل عدسی چشم تشکیل می‌شود. با جدا شدن عدسی چشم از اکتودرم و تماس عدسی با اکتودرم جدید در سطح خود، در نتیجه عمل القایی عدسی، بخش بعدی چشم یعنی قرنیه[8] از اکتودرم سطحی بوجود می‌آید (شکل 1-3)(Gilbert 2006, Northcutt 2005).

[1] intraocular
[2] Optic Vesicle
[3] Diencephalon
[4] Optic Cup
[5] Pigmented retina
[6] Neural Retina
[7] Lens Placode
[8] Cornea