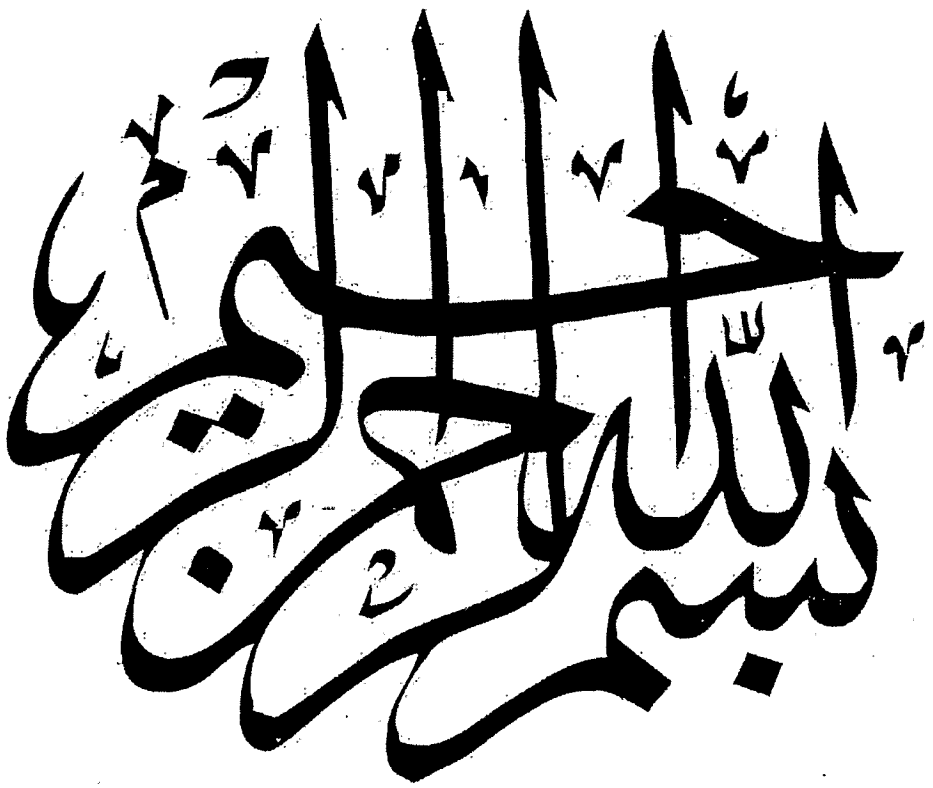

١٠٣٤٩١

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد رشته خون شناسی
و بانک خون

عنوان:

بررسی اثر همزمان IL11 و TPO در تمایز سلولهای بنیادی جنینی موش به رده مگاکاریوسیتی

نگارش:
محمد قربانی

استاد راهنما:
دکتر مسعود سلیمانی

استاد مشاور:
دکتر سعید کاویانی

۱۳۸۷ /۷/ ۱۷

تیر ۱۳۸۷

۱۰۲۴۳۱

به نام خالق مهدی(عج)

اثر پیش روی، آموخته هایی در حد بضاعت ناچیز نگارنده، از دریای بیکران ولی نعمتان بیشمار است؛ که هر چند از فرط کثرت، ذکر نامشان مقدور نیست، لیک طلایه دارانشان را از فرط حدت نقش شان، یارای گریز از حمد نمی باشد:

آقای دکتر مسعود سلیمانی

آقای دکتر سعید کاویانی

گرانمایگانی که این شاگرد کوچک، خود را وامدارشان می بیند و سپاس الطافشان را فرض می گیرد.

همچنین از اساتید محترم گروه هماتولوژی جناب آقای دکتر پورفتح اله، دکتر آبرون و دکتر نوروزی نیا کمال تشکر را دارم.

و نیز از آقای امیر آتشی، آقای محمود حریریان، آقای مهدی پریان و تمام همکلاسیهای عزیزم و دانشجویان گروه هماتولوژی و سر کار خانم رهنمایی تشکر و قدردانی می کنم. توفیق رفیقشان باد.

اگر قابل تقدیم باشد

ابتدا به رسم ادب تقدیم می کنم به سرور ادب عالم
حضرت عباس ابن علی (ع)

وآنگاه تقدیم به:

پدر ومادر فداکارم؛

که گوهر جوانی و عمر خویش را به پای فرزندانشان
ریختند و همه عمر وامدار مهربانی ومحبت آنان هستم.

همسر، برادران و خواهران گرامیم

که همواره در طول مدت تحصیل دلسوزانه مشوق من
بوده اند.

رضایتشان همه آرزوی من است.

فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان‌نامه کارشناسی ارشد»

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد آقای محمد قربانی رشته: هماتولوژی گرایش:
تقدیم می‌شود. اینجانبان نسخهٔ نهائی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوی بررسی و تأیید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجهٔ کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنیم.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

دکتر مسعود سلیمانی (استاد راهنما)

دکتر سعید کاویانی (استاد مشاور)

دکتر سعید آبرون (استاد ناظر)

دکتر امیرزاده (استاد ناظر)

دکتر مهرداد نوروزی نیا (نماینده تحصیلات تکمیلی)

دستورالعمل حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیات علمی، دانشجویان، دانش آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی که با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده ۱- حقوق مادی و معنوی پایان نامه‌ها / رساله‌های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هرگونه بهره‌برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین‌نامه‌ها و دستورالعمل‌های مصوب دانشگاه باشد.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما مسئول مکاتبات مقاله باشد..

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان نامه / رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و بر اساس آئین نامه های مصوب انجام می‌شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸۴/۴/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم الاجرا است و هرگونه تخلف از مفاد این دستورالعمل، از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری می شود.

نام و نام خانوادگی: محمد قربانی

امضاء

آیین نامه چاپ پایان نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس ، مبین بخشی از فعالیتهای علمی- پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگا ه،دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان نامه(رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به (دفتر نشر آثار علمی) دانشگاه اطلاع دهد.

ماده۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند:

کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده در رشته هماتولوژی است که در سا ل ۸۷ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای دکت مسعود سلیمانی و مشاوره جناب آقای دکتر سعید کاویانی از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه ، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به دفتر (نشر آثار علمی) دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر درمعرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ : در صورت عدم رعایت ماده۳ ،۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده رابه عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدر س، تأدیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسار ت، دانشگاه می تواندخسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه ، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فرو ش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب محمد قربانی دانشجوی رشته هماتولوژی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق وضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: محمد قربانی

تاریخ و امضا: ۸۷ / ۵ / ۷

چکیده

سلولهای بنیادی جنینی، سلولهای مفیدی برای آینده طب ترمیمی و مطالعات بیولوژی تکوینی می باشند. این سلولهای نامیرا از توده داخلی جنین قبل از لانه گزینی به دست می آیند و قدرت تمایز به انواع سلولها را دارند. اگرچه ظرفیت تمایز آنها در in vitro همانند in vivo نیست، اما سلولهای خونی را به راحتی می توان از سلولهای بنیادی جنینی به روشهای مختلف به دست آورد. تمایز سلولهای بنیادی جنینی در شرایط کشت، سیستم آزمایشی را برای بررسی اثرات فرضی فاکتورهای رشد و عوامل محیطی جهت خونسازی فراهم می کند. رده مگاکاریوسیتی نیز یکی از ردههای خونساز می باشد. این رده کمتر از یک درصد سلولهای مغز استخوان را تشکیل می دهد. تولید مگاکاریوسیتها توسط یکسری از فاکتورهای رشد کنترل می شود. اما با وجود آگاهیهای اخیر در زمینه تولید مگاکاریوسیتها، هنوز مکانیسمهای مربوط به این فرایند به میزان زیادی ناشناخته است. یک مانع اصلی برای انجام این موضوع مشکلات مربوط به تکثیر و تمایز جمعیت مگاکاریوسیتی برای مطالعه بیولوژی سلولی وملکولی این رده می باشد. سلولهای بنیادی جنینی با دارا بودن ویژگیهای ذکر شده منبع مناسبی جهت تحقیقات پایه ای و بیولوژی این رده می باشند. تمایز سلولهای بنیادی جنینی به رده مگاکاریوسیتی از هم کشتی سلولهای استرومائی مغز استخوان در مطالعات متعددی مورد بررسی قرار گرفته است که دارای معایبی چون احتمال انتقال آلودگی از لایه تغذیه کننده به سلولهای بنیادی و همچنین ترشح فاکتورهای نامشخص از این لایه در ایجاد تمایز ناخواسته و ایجاد تغییرات ژنتیکی در سلولهای بنیادی جنینی می باشد. در این تحقیق ضمن حذف لایه پشتیبان در فرایند تمایز سلولهای بنیادی جنینی به رده مگاکاریوسیتی نقش سه فاکتور رشد TPO, 1L3, 1L11 مورد ارزیابی قرار گرفت.

در این مطالعه از سلولهای بنیادی جنینی موش رده R1 به روش قطره گذاری آویزان اجسام شبه جنینی حاصل شد و سپس اجسام شبه جنینی در گروهای مختلف آزمون شامل(TPO)، (TPO, IL11)، (TPO, 1L3)، (TPO, 1L3, IL11)، (IL11)، (1L3, IL11)،(1L3) و یک گروه هم به عنوان کنترل منفی آزمایش بدون فاکتور رشد تمایز داده شدند. اثبات تمایز بوسیله آزمون سنجش کلونی، رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی ملکول CD41 و آزمون RT-PCR برای بیان ژن PF4 صورت گرفت. برای مقایسه گروههای مختلف تمایزی RT-PCR به صورت نیمه کمی انجام شد و جهت مقایسه نیمه کمی محصولات PCR از ژن B2M جهت نرمال کردن مقادیر به دست آمده از بیان ژن PF4 در گروههای مختلف تمایزی استفاده گردید.

نتایج آزمون سنجش کلونی تمایز به رده خونساز را نشان داد. رنگ آمیزی ملکول CD41 مشخص نمود که سلولهای متمایز شده این مارکر سطح سلولی را بیان می کنند و نتایج حاصل از RT-PCR نیمه کمی نشان داد که در گروههایی که از TPO و IL3 بطور جداگانه استفاده گردیده بود، از نظر آماری تفاوتی در تمایزبه رده مگاکاریوسیتی مشاهده نمی گردد، در گروههایی که TPO و IL3 بصورت توأم استفاده گردید بیشترین تمایز دیده شد، در گروهی که IL11 به تنهایی قرار داشت کمترین تمایز مشاهده گردید و در استفاده از IL11 بصورت توأم با TPO یا IL3 افزایش تمایزی مشاهده نگردید (P< ۰/۰۵).

در مجموع نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که سلولهای بنیادی جنینی در غیاب لایه پشتیبان و با القاء جهت دار فاکتورهای رشد به رده مگاکاریوسیتی تمایز می یابند و می توانند به عنوان راهکاری مناسب جهت مطالعات پایه ای و بیولوژی عمیقتر و همچنین به عنوان یک گزینه مناسب جهت مطالعات طب ترمیمی در مدل حیوانی در آینده مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: سلولهای بنیادی جنینی، رده مگاکاریوستی، TPO، IL3، IL11

فهرست مطالب

عنوان ..... صفحه

فصل ۱ ..... ۱

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۲- سلولهای بنیادی جنینی ۳

۱-۲-۱- خصوصیات و ویژگی‌های سلول‌های بنیادی جنینی ۳

۱-۲-۲- سلول‌های بنیادی چند ظرفیتی در جنین موش ۴

۱-۲-۳- ویژگی‌های سلول‌های بنیادی جنینی و جداسازی آنها از جنین موش ۷

۱-۲-۴- اصول تولید و تکثیر سلول‌های بنیادی جنینی ۱۰

۱-۲-۴-۱- لایه پشتیبان ۱۱

۱-۲-۴-۱-۱- لایه پشتیبان از جنس فیبروبلاست اولیه جنین موش ۱۲

۱-۲-۴-۱-۲- لایه پشتیبان از جنس فیبروبلاست STO ۱۲

۱-۲-۴-۱-۳- لایه پشتیبان از جنس سلول‌های اپی‌تلیال لوله فالوپ ۱۳

۱-۲-۴-۲- عوامل دخیل در مهار فرآیند تمایز سلول‌های بنیادی ۱۳

۱-۲-۴-۲-۱- اهمیت فاکتورهای DIA/LIF در مهار تمایز ۱۴

۱-۲-۴-۲-۲- عملکرد و نقش DIA/LIF در in vivo ۱۵

۱-۲-۵- کاربردهای سلول‌های بنیادی جنینی ۱۸

۱-۲-۵-۱- بکارگیری سلول‌های بنیادی جنینی در تولید حیوانات ترانس ژن ۱۸

۱-۲-۵-۲- بکارگیری سلول‌های بنیادی در سلول درمانی ۱۹

۱-۲-۵-۳- تولید موش با استفاده از تکنیک نوترکیبی همسان ۲۰

۱-۲-۵-۴- استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی برای شناسایی ژن‌های جدیدی که نقش تنظیمی دارند. ۲۱

۱-۲-۶- جداسازی و تکثیر سلول‌های بنیادی جنینی از گونه‌های مختلف ۲۳

۱-۲-۷- محیط کشت سلول‌های بنیادی جنینی ۲۵

۱-۳- ساخت مگاکاریوسیت (Megakaryocytopoiesis) ۲۷

۱-۳-۱- مراحل رشد مگاکاریوسیت ۲۷

۱-۳-۱-۱- سلولهای اجدادی مگاکاریوسیت ۲۸

۱-۳-۱-۲- مگاکاریوسیتهای نابالغ (پرومگاریوبلاستها) ۲۹

۱-۳-۱-۳- مگاکاریوسیتهای بالغ ۳۰

۱-۳-۲- نمای میکروسکوپ نوری مگاکاریوسیتها ۳۱

۱-۳-۳- غشای سطحی مگاکاریوسیت ۳۲

۱-۳-۳-۱- سیستم غشایی مرزی ۳۲

۱-۳-۳-۲- گلیکوپروتئین‌های پلاکتی ۳۲
۱-۳-۴- سایتوکاینهای فعال کننده ساخت مگاکاریوسیت ۳۳
۱-۴- تمایز سلولهای بنیادی جنینی ۳۷
۱-۴-۱- تمایز به رده خونساز در in vivo ۳۸
۱-۴-۲- تمایز به رده خونساز در in vitro ۴۱
۱-۵- مروری بر مطالعات انجام گرفته ۴۴
۱-۵-۱- جداسازی و تکثیر سلولهای بنیادی جنینی از جنین پستانداران ۴۴
۱-۵-۲- مطالعات صورت گرفته در ارتباط با انتقال سلولهای بنیادی به germ line و ایجاد حیوان کایمرا ۴۶
۱-۵-۳- مطالعات انجام گرفته در ارتباط با کاربرد سلولهای بنیادی جنینی در سلول درمانی و ژن درمانی ۴۷
۱-۵-۴- تاریخچه تمایز سلولهای بنیادی ۴۸
۱-۵-۴-۱- تمایز به سلولهای غیر خونساز ۴۸
۱-۵-۴-۲- تمایز به سلولهای خونساز ۴۹

فصل ۲ ..... ۵۲
۲-۱- مواد، وسایل و دستگاهها ۵۳
۲-۱-۱- مواد ۵۳
۲-۱-۲- وسایل آزمایشگاهی مورد نیاز ۵۴
۲-۲- مقدمه ۵۶
۲-۳- روش ها ۵۶
۲-۳-۱- محلولها و بافرهای مورد نیاز ۵۶
۲-۳-۱-۱- طرز تهیه محیط کشت IMDM ۵۶
۲-۳-۱-۲- روش تهیه PBS بدون کلسیم و منیزیم ۵۷
۲-۳-۱-۳- محلول تریپسین ـ EDTA ۵۷
۲-۳-۱-۴- طرز تهیه بافر PBS حاوی EDTA ۵۸
۲-۳-۱-۵- تهیه و آماده سازی فاکتورهای رشد ۵۸
۲-۳-۱-۵-۱- تهیه stock فاکتور رشد TPO ۵۹
۲-۳-۱-۵-۲- تهیه stock فاکتور رشد IL-3 ..... ۵۹
۲-۳-۱-۵-۳- تهیه stock فاکتور رشد IL-11 ..... ۵۹
۲-۴- تعیین درصد زنده بودن سلولها ۶۰
۲-۴-۱- روش تهیه رنگ تریپان بلو ۶۰
۲-۵- تهیه لایه پشتیبان ۶۰
۲-۵-۱- جداسازی فیبروبلاست جنینی موشی ۶۰
۲-۵-۲- تهیه لایه پشتیبان از فیبروبلاست جنینی موش ۶۲
۲-۵-۲-۱- استفاده از میتومایسین C ۶۲

۲-۵-۲-۲- استفاده از اشعه گاما..... ۶۳
۲-۶- از انجماد خارج کردن سلولهای منجمد..... ۶۳
۲-۷- پاساژ سلول های بنیادی جنینی..... ۶۴
۲-۸- کشت وتکثیر سلولهای بنیادی جنینی..... ۶۴
۲-۸-۱- علائم تمایز در سلولهای بنیادی جنینی..... ۶۵
۲-۹- انجماد سلولهای بنیادی جنینی..... ۶۶
۲-۱۰- تمایز سلولهای بنیادی جنینی موشی به رده مگاکاریوسیتی..... ۶۶
۲-۱۰-۱- تشکیل اجسام شبه جنینی..... ۶۷
۲-۱۰-۲- القاء تمایز جهت دار سلولهای بنیادی جنینی به رده مگاکاریوسیتی توسط فاکتورهای رشد ۶۷
۲-۱۱- آزمون سنجش کلونی..... ۶۹
۲-۱۱-۱- مواد و وسایل مورد نیاز..... ۶۹
۲-۱۱-۲- روش انجام سنجش کلونی..... ۶۹
۲-۱۱-۳- رنگ آمیزی بنزیدین..... ۷۱
۲-۱۱-۳-۱- روش رنگ آمیزی بنزیدین..... ۷۱
۲-۱۱-۳-۲- روش تهیه رنگ بنزیدین..... ۷۱
۲-۱۲- رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس مارکر $CD_{۴۱}$..... ۷۱
۲-۱۲-۱- تهیه لام سیتواسپین..... ۷۱
۲-۱۲-۲- تهیه محلول پارافرمالدئید ۴ ٪ با pH : ۷-۷/۵..... ۷۲
۲-۱۲-۳- رنگ آمیزی مارکر $CD_{۴۱}$..... ۷۲
۲-۱۳- شستشوی وسایل مورد نیاز..... ۷۳
۲-۱۴- استخراج RNA..... ۷۳
۲-۱۴-۱- فرایند حذف RNase..... ۷۴
۲-۱۴-۲- استخراج RNA از سلولهای تمایز یافته..... ۷۵
۲-۱۵- واکنش پلیمراز معکوس (RT)..... ۷۶
۲-۱۶- فرایندPCR..... ۷۷
۲-۱۶-۱- مواد و وسایل دخیل در PCR و ویژگی های آنها..... ۷۷
۲-۱۶-۱-۱- محلول بافری PCR با غلظت ۱۰X..... ۷۷
۲-۱۶-۱-۲-$MgCl_2$..... ۷۸
۲-۱۶-۱-۳- نوکلئوتید تری فسفات ها (dNTPs)..... ۷۹
۲-۱۶-۱-۴- آنزیم DNA پلیمراز Taq..... ۷۹
۲-۱۶-۲- بهینه سازی PCR مربوط به هر ژن به صورت منحصر به فرد..... ۸۰
۲-۱۶-۲-۱- الکتروفورز محصولات PCR..... ۸۱
۲-۱۶-۲-۲- رنگ آمیزی ژل..... ۸۲
۲-۱۶-۲-۳- اپتیمایز کردن درجه حرارت هیبرید شدن پرایمرها با DNA الگو..... ۸۲
۲-۱۶-۲-۴- اپتیمایز کردن تعداد سیکل‌ها در فاز نمایی..... ۸۳
۲-۱۷-RT-PCR نیمه کمی برای تعیین میزان نسخه برداری ژن PF4 در گروههای مورد مقایسه..... ۸۳

۲-۱۷-۱- آنالیز نتایج با باند دنسیتومتر ۸۴
۲-۱۸- محلولها و بافر مورد نیاز در الکتروفورز ۸۴
۲-۱۸-۱- طرز تهیه بافر (۵۰ X) Tris – Acetic acid - EDTA (TAE) ۸۴
۲-۱۸-۲- طرز تهیه بافر (10X)Tris – Boric acid – EDTA (TBE) ۸۵
۲-۱۸-۳- طرز تهیه اتیدیوم بروماید (۱۰ mg/ml) ۸۵
۲-۱۸-۴- طرز تهیه Loading buffer ۸۶
۲-۱۹- آنالیز آماری ۸۶

فصل ۳ ..... ۸۷
۳-۱- تهیه لایه پشتیبان ۸۹
۳-۲- نگهداری سلولهای بنیادی جنینی در حالت تمایز نیافته ۸۹
۳-۳- نتایج مربوط به تشکیل اجسام شبه جنینی ۹۰
۳-۴- نتایج مربوط به ازمون سنجش کلونی ۹۰
۳-۵- نتایج مربوط به رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس ملکول CD41 ..... ۹۱
۳-۶- نتایج حاصل از استخراج RNA ۹۱
۳-۷- نتایج حاصل از بهینه سازی Multiplex PCR ۹۱
۳-۷-۱- نتایج حاصل از بهینه سازی دمای هیبرید شدن پرایمر با الگو در Multiplex PCR ۹۱
۳-۷-۲- نتایج حاصل از تعیین محدوده فاز نمایی ۹۲
۳-۸- نتایج حاصل از آنالیزهای آماری نتایجRT-PCR در گروههای مختلف ۹۳

فصل ۴ ..... ۱۰۸
۴-۱- بحث ۱۰۹
۴-۲- پیشنهادها ۱۱۸

فهرست منابع ۱۱۹

فهرست شکل‌ها

عنوان ..... صفحه

شکل (۱-۱) : تکامل سلولی مگاکاریوسیت ۲۸

شکل (۱-۲) : تکامل سلولهای بنیادی جنینی از مسیر همانژیوبلاست ۴۰

شکل (۱-۳) : سه پروتکل مورد استفاده در تمایز سلولهای بنیادی جنینی ۴۱

شکل (۳-۱) : لایه تغذیه کننده از فیبروبلاست موشی ۹۸

شکل (۳-۲) : کلونی سلولهای بنیادی جنینی در حالت تمایز نیافته ۹۸

شکل (۳-۳) : جسم شبه جنینی ایجاد شده توسط روش قطره آویزان ۹۹

شکل (۳-۴) : کلونی ایجاد شده در آزمون سنجش کلونی ۹۹

شکل(۳-۵) : رنگ آمیزی بنزیدین کلونی ایجاد شده در آزمون سنجش کلونی ۱۰۰

شکل (۳-۶) : سلولهای رنگ شده با رنگ آمیزی anti CD41 ..... ۱۰۰

شکل (۳-۷) : PCR گرادیان دمائی ۱۰۱

شکل (۳-۸) : گرادیان سیکل برای ژن PF4 ..... ۱۰۲

شکل (۳-۹) : گرادیان سیکل برای ژن B2m ۱۰۲

شکل (۳-۱۰) : Multiplex PCR برای دو ژن PF4 و B2m ۱۰۳

شکل (۳-۱۱) : صفحه عمل مربوط به نرم افزار دانسیتومتری(۱) ۱۰۴

شکل (۳-۱۲) : صفحه عمل مربوط به نرم افزار دانسیتومتری(۲) ۱۰۵

شکل (۳-۱۳) : نمودار مربوط به مقایسه نتایج بدست آمده از آنالیز تیمارها ۱۰۶

شکل (۳-۱۴) : نمودار مربوط به مقایسه میانگین بیان نسبی PF4 در تیمارها ۱۰۷

فهرست جدول‌ها

عنوان ..... صفحه

جدول (۱-۱) : انواع سلولهای مشتق شده از سلولهای بنیادی در in vitro ۳۷

جدول (۱-۲) : شاخصه های ژنتیکی مربوط به ردههای خونساز در in vivo ۳۹

جدول (۳-۱) : تعداد کلونی های شمارش شده توسط آزمون سنجش کلونی ۹۴

جدول (۳-۲) : مشخصات پرایمرهای مورد استفاده درRT-PCR ۹۵

جدول (۳-۳) : نتایج بدست آمده از آنالیز نسبی توسط باند دانسیتومتری ۹۶

جدول (۳-۴) : بررسی آماری تیمارهای مختلف با آزمون ASD ۹۷

فصل اول

مقدمه

و مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱- مقدمه

رده مگاکاریوسیتی یکی از رده های سلولهای خونساز در مغز استخوان می باشد. با وجود اطلاعات موجود در فهم پروسه تولید مگاکاریوسیتها، تا حدود زیادی مکانیسمهای سلولی و ملکولی این فرایند ناشناخته مانده است. درصد بسیار پائین این رده خونساز در مغز استخوان (کمتر از ۰/۰۶ سلولهای مغز استخوان، $CD41^+$ هستند) و مشکلات مربوط به تکثیر و تمایز جمعیت مگاکاریوسیتی از سلولهای $CD34^+$ (به علت محدودیت در تهیه تعداد کافی و تکثیر این سلولها در محیط کشت) مانع فهم بهتر مکانیسمهای سلولی و ملکولی تولید رده مگاکاریوسیتی شده است. سلولهای بنیادی جنینی با داشتن ویژگیهای زیر منبع خوبی هستند تا به این رده تمایز یابند:

۱) توانائی تکثیر و نگهداری جمعیت خالصی از سلولهای بنیادی جنینی تمایز نیافته برای مدت زمان طولانی در محیط کشت

۲) این سلولها چند ظرفیتی بوده و این توانائی را دارند که در شرایط مناسب به هر سه لایه زاینده هم در in vivo و هم در in vitro تمایز یابند. این تمایز در in vivo بوسیله تشکیل تراتوما[1] و در in vitro با تشکیل اجسام شبه جنینی[2] مشخص می گردد.

غالبا تمایز سلولهای بنیادی جنینی در گذشته با سیستم هم کشتی با سلولهای استرومائی بوده است. به دلیل وجود معایبی که در این سیستم می باشد، محققان در سالهای اخیر سعی کرده اند که لایه پشتیبان یا تغذیه کننده را حذف کنند. این معایب شامل انتقال عفونت از سلولهای لایه تغذیه کننده به سلولهای بنیادی تمایز یافته، ترشح فاکتورهای نامشخص از این لایه تغذیه کننده در ایجاد تمایز ناخواسته و عدم شناسائی مکانیسمهای دخیل در تمایز می باشد. با این تصور که در آینده از مشتقات سلولهای بنیادی جنینی (مانند گلبولهای قرمز و پلاکتها) برای پیوند و سلول درمانی استفاده خواهد شد و همچنین برای فهم بهتر مکانیسمهای سلولی و ملکولی (مانند بررسی اثر فاکتورهای رشد

[1] Teratoma
[2] Embryoid body

در تمایز سلولهای بنیادی جنینی) حذف کردن یا به حداقل رساندن استفاده از لایه تغذیه کننده ضروری می باشد.

۱-۲- سلولهای بنیادی جنینی

۱-۲-۱- خصوصیات و ویژگی‌های سلول‌های بنیادی جنینی

فرآیند رشد و نمو جنینی نیاز به همکاری و هماهنگی بین انواع مختلفی از جمعیت‌های سلولی اختصاصی دارد که همگی از یک سلول پایه‌ای و اصلی یعنی سلول تخم بارور شده مشتق می‌شوند.

در پستانداران اولین تقسیمات سلولی که در سلول تخم بارور شده اتفاق می‌افتد باعث تولید جمعیتی از سلول‌های یکسان می‌شود که تحت عنوان بلاستومر[1] شناخته می‌شوند. هر یک از این سلول‌ها این توانایی بالقوه را در خود دارند تا همه انواع بافت‌های یک موجود زنده را ایجاد نمایند. بعدها ارتباطات و تبادلات اطلاعاتی در درون جنین و یا تقابلی که ما بین جنین و محیط پیرامون آن صورت می‌گیرد باعث رشد و نمو و ایجاد تنوع سلولی می‌گردد.[۱] اندام زائی[2] که لازمه چنین تقابلی است با یک هماهنگی دقیق مکانی و زمانی زودگذر صورت پذیرفته و تعداد سلول‌های موجود در قسمت مختلف به صورت بسیار دقیقی تنظیم می‌گردد. با وجود این برخلاف نظر رایج، جنین پستانداران در مراحل اولیه خود انعطاف پذیری بیشتری از جنین موجودات پست نشان می‌دهد. به عنوان مثال، چندین جنین موش را قبل از لانه گزینی[3] در رحم، می‌توان با هم ادغام نمود که علی‌رغم این کار ما شاهد بوجود آمدن یک جنین با اندازه طبیعی و زنده خواهیم بود. برعکس این امکان هم وجود دارد که با استفاده از اشعه و دارو جمعیت زیادی از سلول‌های موجود در بلاستوسیست موش را تخریب نمود که علی‌رغم این عمل، باز جنین قادر خواهد بود که خود را با شرایط جدید وفق داده و سلول‌های از دست داده را بازسازی نموده و جنین طبیعی و زنده را ایجاد نماید. این ماهیت جالب

[1] Blastomers
[2] Organization
[3] Pre - implantation

توجه فرصتی را به جنین پستانداران می‌دهد تا هر نوع آسیب و صدمه‌ای را تحمل نموده و قادر به ترمیم آن باشد. داشتن چنین توانایی و قدرت تنظیمی وابسته به حضور دو عامل زیر است:

۱) حضور سلول‌های بنیادی چند ظرفیتی با این ویژگی که سرنوشت آنها می‌تواند مورد برنامه‌ریزی مجدد قرار گیرد.

۲) وجود سیستم‌های پیام رسانی قابل انعطاف که عامل ارتباطات مابین بافت‌های مختلف جنینی بوده و نقش میانجی‌گری را به عهده داشته، و از همه مهمتر توانایی تعدیل رفتار سلول‌های بنیادی را نیز دارند.

۱-۲-۲- سلول‌های بنیادی چند ظرفیتی در جنین موش

اولین مرحله در فرآیند جنین‌زائی[1] پستانداران، ایجاد بافت‌های خارج جنینی و همچنین بسط و گسترش سلول‌های بنیادی چند ظرفیتی می‌باشد.

این فرآیند با یکسری تقسیمات دوتایی همراه است که در مرحله پدیده تمایز به صورت نشانه‌ای غیرقابل برگشت از توانایی‌های تکاملی بروز می‌نماید. شاهد این مدعی عمدتاً از یک سری آزمایشات جالبی بدست آمده که در آنها توانایی و تعامل جمعیت‌های سلولی مختلف در بوجود آوردن بافت گوناگون در موش‌های کایمرا[2] مورد بررسی قرار گرفته است (این موش‌ها خود حاصل از ادغام سلول‌های جنینی با نژادهای ژنتیکی مختلف هستند) [۲]. بنابراین در ابتدائی‌ترین مرحله رشد و نمو دو نوع سلول مجزا از هم بوجود می‌آیند که دارای تفاوت‌های مرفولوژی هستند. این سلول‌ها عبارتند از توده داخل سلول[3] و تروفواکتودرم[4].

با تحقیقات صورت گرفته مشخص شده که توده داخل سلولی (ICM) توانایی ایجاد کل جنین و همچنین بافت‌های خارج جنینی را به استثنای تروفوبلاست داراست، (تروفوبلاست یکی از

---

[1] Embryogenesis
[2] chimaeras
[3] Inner cell mass
[4] Trophoectoderm

قسمت‌های جنینی جفت است). ولی در عوض سلول‌های تروفواکتودرم تنها توانایی ایجاد تروفوبلاست را دارند. دومین فرآیند تمایزی نیز قبل از لانه گزینی جفت در رحم روی داده و طی آن سلول‌های توده داخلی به دو قسم تقسیم می‌شوند که تحت عنوان اندودرم اولیه[1] و اپی‌بلاست[2] نامیده می‌شوند. این مرحله از رشد و نمو، پتانسیل تمایزی بیشتری نسبت به مرحله قبل داشته و سلول‌ها تمایز بیشتری حاصل کرده‌اند، آنچنان که سلول‌های پیش‌ساز اندودرم اولیه به اندودرم کیسه زرده احشایی[3] و جداری[4] متمایز می‌شوند، در حالیکه مشتقات اپی‌بلاست در تمام بافت‌ها به استثنای تروفوبلاست و اندودرم خارج جنین یافت می‌شوند. سلسله مراتب موجود در فرآیند رشد و نمو، بدون شک نمایانگر وجود یک برنامه‌ریزی طبیعی و دقیق برای عمل جنین‌زایی در موش می‌باشد. با وجود این، همچنانکه در بالا مورد بحث قرار گرفت، جنین اولیه پستانداران به صورت بارزی توانایی و قابلیت‌های انعطاف پذیری خارق‌العاده‌ای دارند [۲, ۳].

توده داخل سلولی (ICM) را می‌توان از بلاستوسیست اولیه، با استفاده از اعمال immunosurgical و یا جراحی ظریف[5] جدا کرد.

توده داخل سلولی و اپی‌بلاست، بافت‌های چند ظرفیتی جنین اولیه را تشکیل می‌دهند که رده زایا[6] را در خود پرورش داده و تمام بافت‌های سوماتیک (پیکری) جنینی را در جای خود و به موقع به همراه تعدادی از بافت‌های خارج جنینی ایجاد می‌نمایند. چند ظرفیتی بودن و انعطاف پذیری رشد و نموی اپی بلاست در سراسر مرحله سیلندری تخم و حتی پس از لانه گزینی جنین در داخل رحم و تا شروع مرحله اندام‌زایی که حدوداً اواخر روز هشتم حاملگی اتفاق می‌افتد، حفظ می‌گردد.

مهمترین تظاهرات از انعطاف پذیری در سلول‌های بنیادی جنینی اولیه از تجربه‌ای مشابه زیر بدست آمده است. در این تجربه ثابت شده است که چنانچه ۸۰٪ از سلول‌های جنین گاسترولایی بوسیله عوامل تراتوژن و یا با بکارگیری میتومایسین C از طریق جفت، از بین برده شوند به شرطی که

---

[1] Primitive endoderm
[2] Epiblast
[3] Visceral
[4] parietal
[5] Micro surgical
[6] Germ line

این عمل قبل از مرحله اندام‌زایی انجام شود، جنین سالم و طبیعی شکل گرفته و این نشان دهنده وجود پتانسیلی واقعی بر سلول‌های بنیادی در تکثیر سریع و خود تکثیری[1] می‌باشد. چند ظرفیتی بودن و توانایی انعطاف پذیری سلول‌های اپی‌بلاست در ایجاد انواع مختلف سلول‌های تمایز یافته، پس از پیوند سلول‌های اپی‌بلاست در محل‌های نابجا[2] به اثبات رسیده است[۴]. تجارب نشان داده است که با پیوند سلول‌های اپی‌بلاست در مناطقی غیر از مناطق اصلی، جنین اولیه شکل گرفته است.[۵]

همچنین این ویژگی با توانایی ایجاد تراتوکارسینوما[3] از بافت اپی‌بلاست به خوبی نشان داده شده است. تراتوکارسینوما، توموری است که تمایز در آن صورت پذیرفته و به صورت خودبخود در غدد جنسی پستانداران خاصی ایجاد می‌شود. در ضمن می‌توان این نوع تومور را با پیوند نابجای جنین اولیه موش نیز ایجاد کرد[۶, ۷]. این تومورها ممکن است کاملاً تمایز یافته و خوش‌خیم[4] باشند و یا بدخیم[5]، که در هر حال دارای سلول‌های بنیادی هستند که تحت عنوان سلول‌های کارسینومای جنینی[6] شناخته می‌شوند. چنانچه پیوند نابجا از جنین ۸/۵ روزه صورت گیرد تنها شاهد بوجود آمدن تومورهای خوش‌خیم خواهیم بود، در حالی که تقریباً ۵۰٪ از پیوندهای نابجا از جنین ۶/۵ تا ۷/۵ روزه ایجاد تراتوکارسینوما بدخیم خواهند نمود[۸]. تراتوکارسینوما می‌تواند بوسیله اکثر نژادهای موش inbred ایجاد شود، اگر چه در مواردی برخی از فاکتورها و عوامل موجود در میزبان، توانایی تأثیر گذاری در نسبت رشد تومورهای بدخیم به خوش‌خیم را دارد.

به طور خلاصه، جنین اولیه موش حاوی جمعیتی از سلول‌های بنیادی است که این سلول‌ها تحت تأثیر پدیدهٔ تمایزی قرار می‌گیرند. این جمعیت سلولی به سرعت پس از لانه گزینی در رحم افزایش می‌یابند ولی توانایی این سلول‌ها برای تکثیر و ایجاد خود[7] در داخل جنین مدت کوتاهی ادامه دارد و پس از مرحله گاسترولایی سلول‌های بنیادی چند ظرفیتی دیده نخواهند شد. با وجود این دستکاری‌های ژنتیکی تجربی نشان می‌دهد که اولاً تودهٔ داخل سلولی و بافت اپی‌بلاست درجات بالائی

[1] Self renewal
[2] Ectopic site
[3] Teratocarcinoma
[4] Benign
[5] Malignant
[6] Embryonic carcinoma
[7] Self renewal