بسم الله الرحمن الرحیم

بنام او که قلم وقدم ،فکر و ذهن ،زبان وبیان از اوست

معلم انسان اوست،

اول و آخر اوست

ودیگر هیچ.

دانشگاه پیام نور

دانشکده علوم پایه

مرکز تهران

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

رشته علوم جانوری

گروه علمی زیست شناسی

تاثیر سلول های بنیادی ژله وارتون بند ناف در ترمیم عصب سیاتیک موش صحرایی

مریم شیرمحمدی

اساتید راهنما:

دکتر مهرداد بختیاری

دکتر سهیلا ابراهیمی وسطی کلایی

استاد مشاور:

دکتر پریسا کریشچی خیابانی

خرداد ۱۳۹۰

تقدیم به پدر و مادرم

ایکاش بودند تا امروز لبخندشان را می دیدم.

تقدیم به همسر عزیزتر از جانم

کاش بتوانم ذره ای از محبت هایت را جبران کنم.

تقدیم به تک گل باغ زندگیم درسا

به خاطر تمام نبودن هایم

تقدیم به استاد ارجمندم دکتر مهرداد بختیاری

که همچون پدر برایم عزیز است

تقدیم به نسیم عزیزم

وتمام کسانی که دوستشان دارم...

حرفی برای سپاس و ستایش

- آنقدر زیادند کسانی که دوستشان دارم وآنقدر زیادند کسانی که در زندگی به آنها مدیون هستم که نمی دانم از کجا و چگونه آغاز کنم.
- با سپاس از استاد ارجمندم جناب آقای دکتر مهرداد بختیاری به عنوان استاد راهنما که در این راه از بزرگواری ها و راهنمایی ارزشمندایشان برخوردار بوده ام.
- از سرکار خانم دکتر سهیلا ابراهیمی که به عنوان استاد راهنمادر این پروژه صبورانه مرا یاری نمودند، نهایت تشکر و قدردانی را دارم.
- از خانم دکتر پریسا کریشچی خیابانی به عنوان استاد مشاور ممنون وسپاسگزارم.
- از آقای دکتر منصوری به خاطر کمکهای فراوانشان بینهایت متشکرم.
- از مدیر محترم گروه زیست شناسی خانم دکتر سیما نصری که همواره سخت‌گیری‌های بجای‌شان دانشجویان علوم جانوری را متفاوت از بقیه ساخته است کمال تشکر را دارم.
- از آقای دکتر جغتایی مدیر گروه آناتومی به خاطر همکاریشان کمال تشکر را دارم.
- از همکاری صمیمانه گروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی ایران(تهران) که در انجام این تحقیق نهایت همکاری را داشته اند تشکر و قدردانی می کنم.
- از زحمات دلسوزانه کارشناس محترم گروه زیست شناسی سرکار خانم مرادی بسیار متشکرم.
- از آقایان دکتر پیرحاجتی،دکتر مرزبان، دکتر ابوطالب، دکتر زربخش که همواره راهنمایم بودند کمال تشکر را دارم.
- از همکاری خانم چوبین کارشناس آزمایشگاه گروه آناتومی بسیار سپاسگزارم.
- از خانواده عزیزم به خصوص برادرانم و همسرانشان و خواهر عزیزم که در تمام مدت تحصیل یاریم کردند متشکرم امیدوارم همواره شاد و پیروز باشند.

چکیده

آسیب اعصاب محیطی معمولا" باعث فقدان عملکرد اعصاب حسی، حرکتی وخودکار میشود. محققان بسیاری بر روی پیوند سلولهای بنیادی برای ترمیم آسیب اعصاب محیطی تمرکز کرده اند.

هدف از این تحقیق تاثیر پیوند سلول های بنیادی ماتریکس بند ناف در بهبود حرکتی و رژنراسیون آکسونی در مدل تجربی ضایعه عصب سیاتیک موش های صحرائی مورد بررسی قرار میگیرد.

در این مطالعه پس از جدا سازی و کشت سلولهای بنیادی ژله وارتون بند ناف انسان از ۲۵ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰گرم) استفاده شد. حیوانات بصورت تصادفی به سه گروه کنترل(n=۵)، شاهد(n=۱۰) و گروه درمانی(n=۱۰) تقسیم گردیدند. در هر سه گروه موش ها به کمک تزریق داخل صفاقی کتامین(Ketamine) ۱۰۰ میلی گرم برای هر کیلوگرم وزن و گزیلازین (Xylazine) ۲۰ میلی گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن بیهوش شدند. پس از برش پوست و کنار زدن عضلات عصب سیاتیک نمایان گردید. در گروه کنترل بدون هیچ عملی مجدداً محل جراحی دوخته شد و حیوانات به قفس برگردانده شدند. در گروه شاهد و گروه درمانی عصب سیاتیک قطع شده، سپس اپی نوریوم دو انتهای پروگزیمال و دیستال عصب قطع شده با استفاده از نخ بخیه نایلونی(شماره ۰-۱۰) بهم بخیه زده شد. در گروه درمانی پس از بخیه زدن اپی نوریوم عصب سیاتیک ۷۰۰/۰۰۰ سلول بنیادی بندناف(در مرحله پاساژ سوم) در محل بخیه به داخل اپی نوریوم عصب تزریق گردید. پس از ۱۲ هفته به منظور ارزیابی میزان بهبود حرکتی تست رفتاری foot pirnt انجام شده و از عضله گاسترکنمیوس نوار عصب-عضله گرفته شد. در پایان با تهیه نمونه های بافتی از عصب ترمیم شده تعداد آکسون ها شمارش گردیده و جهت تایید حضور و زنده بودن سلول های بنیادی به دو موش بطور جداگانه سلول های نشاندارشده تزریق و سپس نمونه های بافتی با میکروسکوپ فلورسنت بررسی شد. نتایج حاصل از تست رفتاری footprint تفاوت معنی داری در میزان ارزیابی عملکردی عصب سیاتیک(SFI) بین گروه شاهد و گروه درمانی در سطح(p< ۰/۰۵) نشان داده شد. اگرچه تعداد اکسون ها در گروه درمانی(۳۲۵) بصورت معنی داری در سطح(p< ۰/۰۵) بالاتر از گروه شاهد(۲۳۹.۶) بود و همچنین تعداد آنها بالاتر از گروه کنترل(۲۸۳.۳) بود. مقایسه EMG بین گروه های مختلف نشان داد که میانگین رتبه ها در گروه درمانی در مقایسه با گروه شاهد بهبود حرکتی بهتری پیدا می کند و از نظر آماری نیز بصورت معنی دار

و در سطح (p< ۰/۰۵) بالاتر می باشد، هر چند هنوز نسبت به گروه کنترل رتبه پایین تری دارند.طبق نتایج بدست آمده به نظر می رسد استفاده از سلول های بنیادی ژله وارتون بندناف در ترمیم اعصاب محیطی مفید بوده و این روش در مقایسه با روش پیوند عصب موفق تر باشد.

واژه های کلیدی: ژله وارتون، عصب سیاتیک، سلول بنیادی، بندناف

فهرست مطالب

مقدمه..... ۱

فصل اول - بیان مسئله تحقیق..... ٤

۱-۱. تبار سلولی..... ۵

۱-۲. سلول های بنیادی..... ۵

۱-۲-۱. منشا سلول‌های جنینی..... ٦

۱-۳. سلول های بنیادی مشتق از بندناف..... ۸

۱-٤. تاریخچه سلول های بنیادی بند ناف..... ۱۱

۱-۵. کاربردهای بالینی سلول‌های بنیادی ۱۲

۱-۵-۱. انفارکتهای قلبی ۱۲

۱-۵-۲. ترمیم لوزلمعده (پانکراس) و ترشح انسولین..... ۱۳

۱-٦. ساختمان اعصاب محیطی..... ۱۳

۱-۷. اتیولوژی صدمات وارده بر اعصاب محیطی..... ۱۵

۱-۷-۱. تقسیم بندی آسیب‌های وارده بر اعصاب محیطی..... ۱۵

۱-۷-۱-۱. آسیب نورآپراکسیا در اعصاب محیطی..... ۱٦

۱-۷-۱-۲. آسیب اکسونوتمزیز در اعصاب محیطی..... ۱۷

۱-۷-۱-۳. آسیب نوروتمزیز در اعصاب محیطی..... ۱۹

۱-۸. ترمیم آسیب اعصاب محیطی..... ۱۹

فصل دوم- مروری بر مطالعات گذشته..... ۲٤

۲-۱. ترمیم ضایعات ناشی از آسیب اعصاب محیطی..... ۲۵

۲-۱-۱. اتوگرافت عصبی ۲٦

۲-۲. نقش بیان ژنی در طی رشد نوریت و ترمیم عصب..... ۲۷

۲-۳. سلول‌های موثر در روند ترمیم عصب..... ۲۷

۲-٤. نقش پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی در ترمیم عصب..... ۲۸

۲-۵. نقش فاکتورهای نوروتروفیک در ترمیم عصبی..... ۲۹

۲-٦. استفاده از روش‌های مهندسی بافت در ترمیم اعصاب محیطی..... ۳۰

۲-۷. استفاده از سلول‌های بنیادی در ترمیم عصب..... ۳۲

۲-۷-۱. سلول ها ی بنیادی پوست و مو..... ۳۲
۲-۷-۲. سلول های بنیادی مغز استخوان ۳۳
۲-۷-۳. سلول های بنیادی چربی..... ۳۳
۲-۷-٤. استفاده از سلول های بنیادی بند ناف در ترمیم قلب ۳٤
فصل سوم- مواد و روش ها..... ۳۵
۳-۱. دستگاه ها و مواد مورد استفاده در تحقیق..... ۳٦
۳-۲. محیط و محلولهای مورد نیاز برای کشت..... ۳۷
۳-۲-۱. طرزتهیه محیط کشت..... ۳۷
۳-۲-۲. غنی سازی محیط کشت..... ۳۷
۳-۲-۳. طرز تهیه محلول بافر فسفاتی(PBS)..... ۳۸
۳-۳. تهیه بندناف و آماده سازی آن..... ۳۸
۳-۳-۱. جداسازی سلول‌های بنیادی از ژله وارتون بندناف..... ٤۱
۳-۳-۲. پاساژ سلولی..... ٤۱
۳-۳-۳. انجماد سلولی..... ٤۲
۳-۳-٤. ذوب سلولی..... ٤۳
۳-٤. بررسی آنزیم آلکالین فسفاتاز در سلول‌های بنیادی مشتق از بندناف..... ٤۳
۳-٤-۱. طرز تهیه بافر تریس۰.۰۵ مولار..... ٤۳
۳-٤-۲. تهیه محلول انکوباسیون A..... ٤٤
۳-٤-۳. تهیه محلول انکوباسیون B..... ٤٤
۳-۵. تمایز سلول‌های مزانشیمی ژله وارتون بندناف به سلول‌های چربی..... ٤٤
۳-٦. نشان‌دار کردن سلول‌های مزانشیمی..... ٤۵
۳-۷. فلوسیتومتری..... ٤۵
۳-۸. حیوانات مورد استفاده..... ٤٦
۳-۸-۱. گروه بندی حیوانات..... ٤٦
۳-۸-۲. روش جراحی..... ٤۷
۳-۹. تست فوت پرینت..... ٤۸
۳-۱۰. گرفتن نوار عصب عضله (EMG)..... ٤۹

۳-۱۱. تهیه برش‌های بافتی..... ۵۰
۳-۱۱-۱. تهیه تترا اکسید اسمیوم..... ۵۱
۳-۱۱-۲. شمارش اکسونی ۵۲
۳-۱۲. ایمنو هیستوشیمی: بررسی حضور سلول‌های مزانشیمی در محل ضایعه ۵۲
۳-۱۲-۱.تهیه 2xssc ۵۴
۳-۱۳. انالیز آماری ۵۴
فصل چهارم- نتایج..... ۵۵
٤-۱. نتایج کشت سلولی..... ٥٦
٤-۲. نتایج مربوط به رنگ آمیزی الکاین فسفاتاز ۵۷
٤-۳. نتایج حاصل از تمایز به چربی..... ۵۸
٤-٤.نتایج فلوسایتومتری..... ۵۹
٤-۵. نتایج foot print..... ۵۹
٤-٦. نتایج الکتروفیزیولوژیکی ٦۱
٤-۷. نتایج حاصل از شمارش آکسونها ٦۸
٤-۸. نتایج ایمنوهیستوشیمی..... ۷۱
فصل پنجم- بحث..... ۷۳
نتیجه گیری..... ۸۰
پیشنهادات..... ۸۱
منابع و ماخذ..... ۸۲

فهرست اشکال

شکل ۱-۱. تقسیم بندی سلول های بنیادی با توجه به منشا بافتی آنها.....۸
شکل ۱-۲. بافت پیوندی موکوسی بندناف انسان.....۹
شکل ۱-۳. ساختمان عصب محیطی.....۱٤
شکل ۳-۱. بندناف در داخل پتری‌دیش. ۳۹
شکل ۳-۲. برش بندناف به قطعات ۵-۳ سانتی متری. ٤۰
شکل ۳-۳. ایجاد برش طولی بر روی هر قطعه.....٤۰
شکل ۳-۴. شریان و وریدهای خارج شده از بند ناف.....٤۰
شکل ۳-۵. تبدیل ژله به قطعات بسیار ریز.....٤۱
شکل ۳-۶. فلاسکهای حاوی سلول.....٤۲
شکل ۳-۷. پدیدار شدن عصب سیاتیک موش(سمت چپ) و جداسازی آن از بافتهای اطراف.....۴۷
شکل ۳-۸ قطع عصب سیاتیک. ٤۸
شکل ۳-۹. مرحله گرفتن تست عصب وعضله.....۵۰
شکل۴-۱. سلول های بنیادی ژله وارتون بند ناف کشت داده شده.....۵٦
شکل۴-۲. بیان آلکالین فسفاتاز در کلونی متشکله از سلولهای ماتریکس بند ناف.....۵۷
شکل۴-۳. سلول های تمایز یافته به چربی.....۵۸
شکل۴-۴. سلول های چربی رنگ آمیزی شده با Oil Red ۵۸
شکل۴-۵. تصاویر مربوط به فلوسایتومتری.....۵۹
شکل٤-٦. جای پای موش ها در گروه شاهد را نشان می دهد ٦۰
شکل۴-۷. جای پای موش ها در گروه درمانی را نشان می دهد ٦۰
شکل٤-۸. مقطع عرضی عصب سیاتیک در گروه کنترل،نمایی از اکسون ها.....۶۹
شکل۴-۹. مقطع عرضی از عصب سیاتیک در گروه شاهد.....۶۹
شکل۴-۱۰. مقطع عرضی از عصب سیاتیک ترمیم شده در گروه دریافت کننده سلول.....۷۰
شکل۴-۱۱. مقطع عصب در تست ایمنوهیستوشیمی کروه کنترل منفی. ۷۱
شکل۴-۱۲. مقطع عصب در تست ایمنوهیستوشیمی سلول های بنیادی ژله وارتون.....۷۲

فهرست نمودارها

نمودار۴-۱. مقایسه Foot Print بین دو گروه درمانی وشاهد..... ٦١
نمودار٤-٢. EMG در گروه کنترل..... ٦٣
نمودار٤-٣. EMG در گروه شاهد استفاده از کپ در ناحیه پروگسیمال..... ٦٣
نمودار٤-٤. EMG در گروه شاهد با استفاده از کپ در ناحیه دیستال..... ٦٤
نمودار٤-٥. EMG سوزنی گروه شاهد در ناحیه پرکسیمال..... ٦٤
نمودار٤-٦. EMG سوزنی گروه شاهد در ناحیه دیستال..... ٦٥
نمودار٤-٧. EMG در گروه دریافت کننده سلول با استفاده از کپ درناحیه پروکسیمال..... ٦٥
نمودار٤-٨. EMG در گروه دریافت کننده سلول با استفاده از کپ درناحیه دیستال..... ٦٦
نمودار٤-٩. EMG سوزنی گروه دریافت کننده سلول در ناحیه پروکسیمال..... ٦٦
نمودار٤-١٠. EMG سوزنی گروه دریافت کننده سلول در ناحیه دیستال..... ٦٧
نمودار٤-١١. نمودار میانگین رتبه ها ی متغیر EMG در گروه های مورد مطالعه..... ٦٨
نمودار۴-۱۲. نمودار میانگین تعداد آکسونها در گروه های مورد مطالعه..... ٧٠

فهرست جداول

جدول ۱-۱. نقسیم بندی آسیبهای وارده بر اعصاب محیطی. ۱٦
جدول ٤-۱. مقادیر میانگین رتبه های متغیر EMG در دو گروه Anstomos و Cell.....۶۲
جدول ٤-۲. مقادیر آماره آزمون و p- مقدار برای متغیر EMG.....٦۷

مقدمه

قطع عصب و روش ترمیم آن از دیر باز مورد توجه دانشمندان بوده است. طبق نوشته های موجود ابن سینا اولین فردی بود که دو سر عصب قطع شده را بخیه نمود. والر تعریف کلاسیک تحلیل یا دژنرسانس آکسون را ارایه نمود و نتیجه گرفت که برای ارزیابی حسی و حرکتی، دو سر قطع شده عصب را باید به هم متصل نمود و اگر فاصله بین آنها زیاد باشد، باید از اتوگرفت عصب یا عروق خونی (ورید) استفاده شود. پیوند اتوگرفت بطور کلی به عنوان روش طلایی برای ترمیم شکاف عصبی بکار می رود،ولی برداشتن عصب از ناحیه دهنده ایده ال نبوده وممکن است سبب اختلال حسی در نواحی از پوست بیمار شود،همچنین ترمیم عملکردی کامل براین اساس نادر است و ناحیه دهنده مناسب محدود است. در سال ۱۶۰۸ کوششهای اولیه برای ترمیم عصب انجام گرفت. تکنیکهای میکرو جراحی در سال ۱۹۶۰ ابداع شد. تحقیقات نشان می دهد که در ترمیم عصب مدیان به روش اتوگرفت در ناحیه مچ دست کمتر از۱ تا ۳ درصد بهبودی حسی نرمال در ۳ تا ۵ سال بعد از ترمیم بدست می آید. بهبود حرکتی نتایج بهتری نسبت به حسی دارد، به طوری که کمتر از ۲۵ درصد بیماران بهبودی حرکتی طبیعی را بعد از ترمیم به دست می آورند. در ترمیم عصب مدیان در نواحی پروگزیمال (بالای ساعد یا بازو) هیچ بیماری به طور کامل حس طبیعی را به دست نمی آورد و کمتر از ۲ درصد بهبودی کامل حرکتی دارند.برای بیشتر از یک قرن تحقیقات زیادی برای یاقتن روشهای ترمیم ضایعات اعصاب محیطی انجام گرفته است. در روند رژنراسیون عصب، فاکتور های مختلفی مثل سن، نوع ضایعه و اندازه شکاف بین دو انتهای بریده عصب روی نتایج عملکردی ترمیم اعصاب محیطی تاثیر دارند. صدمات اعصاب محیطی به کرات و توسط آسیبهای ناشی از ورزش، تصادفات جاده ای، زایمان، فشار، کشیدگی و له شدگی اعصاب اتفاق افتاده و یکی از علل عمده ناتوانی افراد است. ضایعات ایجاد شده در سیستم اعصاب محیطی موجب اختلال در توانایی حرکتی عضلات، حس لامسه و نوروپاتی می شوند. درمان ضایعات وارد شده بر سیستم عصبی مستلزم ترمیم بافت عصبی است. در طی دو قرن گذشته از روش های مختلفی جهت ترمیم عصب استفاده شده است. یکی از مسائل اصلی در درمان ضایعات عصبی هدایت اکسون در حال ترمیم در مسیر صحیح است. به همین دلیل در گذشته از استخوان، لوله های فلزی و عروق خونی برای هدایت اکسونهای

در حال ترمیم به طرف انتهای مسیر استفاده می شده است .ضایعات سیستم اعصاب محیطی در سه طبقه تروماتیک، غیر تروماتیک و عوارض ناشی از جراحی دسته بندی می شوند. با رشد زندگی ماشینی و بالا رفتن آمار تصادفات، ضایعات ناشی از آسیب سیستم اعصاب محیطی رو به افزایش است. با وجود پیشرفت های چشمگیری که در علوم پزشکی و توانبخشی ایجاد شده هنوز امکان ترمیم ضایعات عصبی ایجاد نگردیده است طوریکه از میان بیش از ۲۵۰۰۰۰ بیمار مبتلا به ضایعات تروماتیک اعصاب محیطی در آمریکا فقط ۱۵٪ قابل درمان با روشهای درمانی رایج هستند.

اغلب ضایعات تروماتیک در اثر تصادف با وسایل موتوری، صدمات ناشی از اسلحه، شکستگی، پاره شدگی و یا صدمات سوراخ کننده بوجود می آیند. آسیب های غیر تروماتیک اغلب به دلیل فشار بر اعصاب محیطی و چسبندگی ایجادمی شوند. یکی از شایعترین این نوع ضایعات سندرم تونل کارپال است. مهمترین علت ایجاد این سندرم وجود فشار دائمی بر عصب مدیان اولنار است. ترمیم ضایعات غیر تروماتیک در مقایسه با ضایعات تروماتیک بهتر صورت می گیرد ولی اغلب بیماران از درد،کاهش قدرت عضلانی و محدودیت در انجام فعالیت های روزمره خود از چندین هفته تا چند ماه پس از جراحی رنج میبرند. آسیب های ناشی از جراحی بدنبال برخی از اعمال جراحی غیر قابل اجتناب ایجاد می شود. بعنوان مثال از میان افرادی که در آمریکا برای برداشت تومورهای پروستات تحت عمل پروستاتکتومی قرار می گیرند، بیش از ۲۶۰۰۰۰ بیمار از آسیب عصب کاورنوس رنج می برند.

امروزه مشخص شده است که حضور برخی مواد شیمیایی موسوم به عوامل نوروتروفیک در اطراف محل ضایعه سبب تقویت رشد آکسون و هدایت آن در مسیر صحیح می گردد. از این عوامل می توان به فاکتور رشد عصب(NGF[1])،فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF[2])، و فاکتور نوروتروفیک سیلیاری(CNTF[3]) اشاره نمود. یکی از روش های جدید برای ترمیم ضایعات عصبی استفاده از سلول های مختلف نظیر سلول های شوان و سلول های بنیادی در محل ضایعه است. سلول های بنیادی توانایی تکثیر داشته و بسته به نوع فاکتورهای رشدی و القایی موجود در محیط

[1] -Nerve growth factor
[2] -Brain derived neurotrophic factor
[3] -Ciliary neurotrophic factor

اطرافشان می توانند به گروه های سلولی مختلفی تمایز یافته و بافت جدیدی را در محل ضایعه ایجاد نمایند. علاوه بر این شواهدی دال بر ترشح فاکتورهای نوروتروفیک توسط سلول های بنیادی وجود دارد. سلول های بنیادی مزانشیمی را میتوان از منابع مختلفی نظیر مغز قرمز استخوان، خون بندناف و ژله وارتون بندناف تهیه نمود. ژله وارتون(بافت پیوندی موکوسی اطراف شریان ها و ورید نافی) منبع خوبی جهت تهیه سلول های بنیادی مزا نشیمی است. از آنجا که سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از ژله وارتون جزء محتویات بند ناف هستند، در موارد ایمونولوژیکی شبیه بند ناف عمل کرده و تمایلی به رد شدن توسط سیستم ایمنی ندارند. از اینرو این سلولهای بنیادی کاندیدای جدیدی برای پیوند سلولی در درمان ضایعات عصبی می باشند. جفت و بند ناف منابع قابل دسترس وپایان ناپذیری از سلولهای بنیادی هستند. در سال ۲۰۰۳ میلادی mitchel و همکارانش موفق به شناسایی و کشت سلولهای بنیادی مزانشیمی ژله وارتون بندناف انسان شدند. این سلولهای بنیادی از توان تکثیر فوق العاده ای بر خور دار بوده و در طی ۷۰ تقسیمات متوالی فرایند پیری در آنها رخ نمی دهد. این گروه از سلولهای بنیادی از نظر توانایی تمایز به سلولهای بنیادی جنینی شبیه بوده ولی مشابه با سلولهای بنیادی بالغین تومور ایجاد نمیکنند. .نشان داده شده که سلولهای بنیادی بند ناف مولکولهای نوروتروفیکی مثل BDNF،NGF و CNTF را ساخته و ترشح می کنند. با توجه به اینکه این مولکول ها سبب تقویت رشد اکسون می شوند، این امکان وجود دارد که بتوان از این سلول ها جهت ترمیم ضایعات عصبی استفاده نمود. به همین منظور در تحقیق حاضر ابتدا سلولهای بنیادی مزانشیمی از ژله وارتون بند ناف انسان جدا گردیده، سپس از آنها جهت ترمیم عصب سیاتیک قطع شده در موش های آزمایشگاهی استفاده شد، زیرا عصب سیاتیک موش صحرایی بزرگترین عصب محیطی است که قطر متوسط آن در حیوان بالغ ۱/۵ میلی متر است و غالبا در کارهای تحقیقاتی مورد استفاده قرار می گیرد.

فصل اول

بیان مسئله تحقیق

۱-۱. تبار سلولی

در برخی حیوانات به خصوص در نماتودها از هر سلول جنینی همیشه سلول‌های یکسانی به وجود می‌آیند. اما در بیشتر حیوانات به خصوص مهره‌داران ارتباطات تباری ساده وجود نداشته و عموماً برای رسیدن به سرنوشت نهایی، تعدادی از سلولها مرده، جابجا شده و یا تحت تاثیر سلول‌های همسایه قرار می گیرند. بعبارت دیگر تغییراتی که یک سلول جنینی جهت تعیین سرنوشت خود متحمل می گردد به نوعی تحت تاثیر سلول‌های همسایه بوده و ربطی به ماهیت سلول‌های اجدادی سلول ندارد. علاوه بر این در برخی از بافت‌ها برای حفظ سلامت بافت، بصورت مداوم سلول های جدید جایگزین سلول‌های مرده و از دست رفته می‌شوند. سلول‌های خونی، سلول‌های اپیدرمی پوست و سلول‌های پوششی روده مثالی از سلول های با نیمه عمر کوتاه بوده که بصورت مداوم تا پایان عمر جاندار تجدید می گردند. در مقایسه با این سلول‌ها برخی دیگر از سلول‌ها مانند سلول‌های عدسی چشم و سلول‌های عصبی در مغزهرگز دوباره ساخته نمی شوند. وجود سلول‌های بنیادی در بافت‌های قابل ترمیم عامل اصلی ایجاد توانایی تجدید سلول‌ها در این بافت‌هاست. سلول‌های بنیادی تقسیم شده سلول‌های دختری را ایجاد می کنند که می‌توانند تمایز یافته سلول‌های مختلف دیگر را ایجاد کرده و یا تکثیر شده سلول‌های بنیادی بیشتری را بسازند (J.B.Gurdaon،۱۹۹۹)

۱-۲. سلول های بنیادی

سلول‌های بنیادی دو ویژگی اساسی یعنی توانایی تقسیم و تولید سلول‌هایی با خواص یکسان (خودنوزایی) و یا تولید انواع سلول‌های تمایز یافته را دارند (Smith.AG, ۲۰۰۱). محققین بر این باورند که سلول‌های بنیادی با درجات مختلفی از تعهد زندگی می‌کنند. برخی قادرند تنها انواع محدودی از سلول‌ها را ایجاد نمایندر صورتی که برخی دیگر می‌توانند نسل های مختلف سلولی را ایجاد نمایند. بر اساس توان تمایزی و برگشت پذیری سلول‌های دختر حاصل از تقسیم سلول‌های بنیادی، این سلول‌ها را به سه نوع همه‌توان[1]، پرتوان[2] و چندتوان[3] تقسیم می نمایند.

[1]- Totipotent
[2]- pluripotent
[3] -Multipotent

سلول‌های همه‌توان می‌توانند انواع سلول‌ها اعم از سلول‌های بدن جاندار و یا سلول‌های جفت را بسازند بعنوان مثال هر یک از بلاستومرهای جنین دو سلولی می‌تواند یک فرد کامل را بوجود آورد. سلول‌های پرتوان می‌توانند بیشتر و یا همه سلول‌های جاندار را بسازند. مثلاً سلول‌های بنیادی جنینی تحت شرایط خاص می‌توانند جاندار جدیدی را بسازند اما سلول‌های برون جنینی یا جفت را نمی-سازند. سلول‌های چندتوان مانند سلول‌های بنیادی موجود در بافت‌های بزرگسالان تعداد محدودتری از انواع سلول را ایجاد می‌کنند (Wagers.AJ,۲۰۰۴).

۱-۲-۱. منشا سلول‌های جنینی

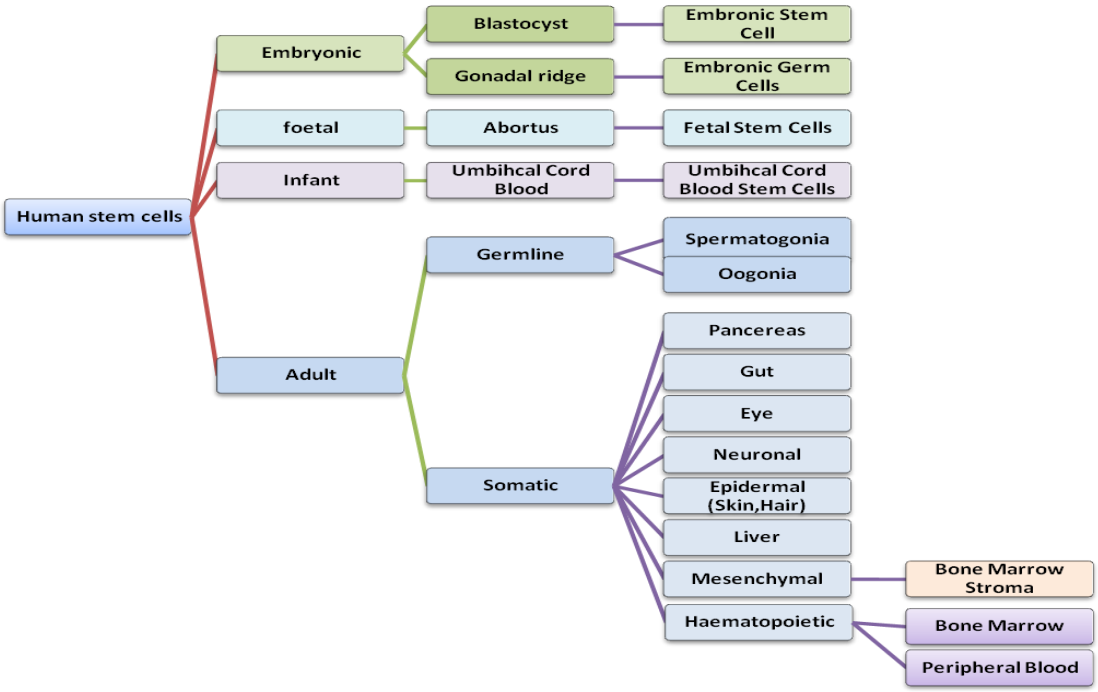
بطور کلی سلول‌های بنیادی دارای دو منشاء جنینی[1] و بزرگسال[2] هستند(شکل ۱-۱). سلول‌های بنیادی جنینی از توده سلولی داخلی جنین در مرحله بلاستوسیست به دست می آیند. یکی از ویژگی-های سلول‌های بنیادی جنینی این است که پتانسیل انجماد و ذوب مجدد داشته و به دنبال خروج از این شرایط قادر به تکثیر و تمایز به سلول‌های مزانشیمی می‌باشند(Barry.FP،۱۹۹۹). برخی از نشانگرهای سطحی این سلول‌ها عبارتند از مولکول‌های Stro 1، CD49 ، CD106 (ICAM -1) ، β_1 ،CD44 ، CD10 ، CD13 ، CD73 ، اینتگرین‌های CD29 و CD49 گیرنده‌های فاکتورهای رشدی نظیر فاکتور رشد شبه انسولینی نوع یک (IGF-1)، فاکتور رشد مشتق از پلاکت ها (PDGF[3])، فاکتور رشد عصب (NGF[4]) ، وفاکتور رشد اپیتلیالی (EGF[5]) (Matsui.Y،۱۹۹۰). با تمام تلاش های صورت گرفته در شناسایی انواع آنتی‌ژن های سلول‌های بنیادی، هنوز به طور حتم نمی‌توان اعلام کرد که حضور یا عدم حضور برخی از آنتی‌ژن‌های مشخص دلیلی بر بنیادی بودن این دسته از سلول‌ها باشد (P.Bianco،۱۹۹۹).

---

[1]- Embryonic
[2]- Adult
[3]- Insulin-like growth factor
[4]- Platelet-derived growth factor
[5]- Epithelial growth factor

سلول‌های بنیادی بزرگسالان در بسیاری از بافت‌های تخصص یافته بدن مانند مغز، مغز استخوان، کبد، پوست، لوله‌گوارش، قرنیه، شبکیه چشم و پالپ دندان یافت می‌شوند (Smith.AG,۲۰۰۱). این سلول ها در بزرگسالان در هنگام جراحت و حتی در غیاب آن بطور مداوم فعال هستند. قبلاً دانشمندان فکر می کردند که سلول های بنیادی بزرگسالان، تنها سلول‌های همان بافت را ایجاد می-کنند، اما امروزه معتقدند انعطاف‌پذیری این سلول ها بیشتر بوده و این سلول‌ها می‌توانند به انواع دیگری از سلول‌ها تمایز یابند. برای مثال سلول‌های بنیادی بزرگسالان مشتق از مغز استخوان علاوه بر آن که می‌توانند سلول‌های خونی و ایمنی را بسازند قادرند به انواع دیگر از سلول‌ها نظیر سلول‌های ماهیچه اسکلتی، میکروگلیا و آستروگلیا در مغز و یا هپاتوسیت‌ها در کبد تمایز یابند(شکل۱-۱).
(Doyonnas.R,۲۰۰۴;Hermann.A,۲۰۰۴)

بیشتر بررسی‌ها در مورد سلولهای بنیادی روی سلول‌های سوماتیک انجام شده که در خون پستانداران و بافت عصبی و به طور واضح تر در معده و روده و همچنین پوست یافت می شوند. در سلول‌های بنیادی هموپویتیک (سلول های بنیادی مشتق از مغز استخوان و خون محیطی) شاخص CD34 در سطح سلول مشخص گردیده اما در خیلی از بافت ها سلول های بنیادی شاخص معینی ندارند (B.Gurdaon,۱۹۹۹).



شکل ۱-۱. تقسیم بندی سلول های بنیادی با توجه به منشا بافتی آنها(JHP Hui,et al۲۰۰۹)

ازآنجاکه سلول‌های مزانشیمی از منابع مختلفی غیر از مغز استخوان مثل استخوانهای ترابکولار، بافت چربی، کبد، عضلات اسکلتی، شش‌ها، دندان شیری و حتی بافت ژله وارتون بند ناف قابل دست یابی هستند،کنام[1] (مجموعه عوامل فیزیکی و شیمیایی که این سلول ها را احاطه می کند) این سلولها مختص به مغز استخوان نیست. البته هنوز مشخص نشده که آیا این سلول ها در بافت‌های مختلف کنام های متفاوتی را تجربه می کنند و یا اینکه در تمام بافت ها کنام‌های یکسانی را تجربه می‌نمایند (.Baksh.D,۲۰۰۴)

۱-۳. سلول های بنیادی مشتق از بندناف

در طی بارداری بندناف انسان پل ارتباطی بین مادر و جنین می باشد. وزن بندناف در انسان حدود ۴۰ گرم، بلندای آن ۶۰ تا ۶۵ سانتی‌متر و قطر آن حدود ۱/۵ سانتی متر است. این اندام از چند لایه سلول پوششی مکعبی پوشیده شده که احتمالاً از بافت پوششی آمنیونی مشتق شده‌اند. در قسمت داخلی

[1]- Niche