بسم الله الرحمن الرحيم

016743

دانشگاه تربیت‌مدرس
دانشکدهٔ علوم‌پزشکی

۱۳۸۱ /۱/ ۲۰

پایان‌نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته هماتولوژی

عنوان

جداسازی و تکثیر سلولهای بنیادی جنینی موش و کشت آنها بر سطح سلولهای استرومای مغز استخوان

ع ۱۱۳

نگارش

علی‌اکبر موثق‌پور اکبری

استاد راهنما

دکتر مژده صالح‌نیا

استاد مشاور

دکتر علی‌اکبر پورفتح‌ا...

تابستان ۱۳۸۰

ع ۱۱۳

«فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان‌نامه کارشناسی ارشد»

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد آقای علی‌اکبر موثق‌پور

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:

سرکار خانم دکتر صالح‌نیا(ستاد راهنما)

جناب آقای دکتر علی‌اکبر پورفتح‌اله (استاد مشاور)

جناب آقای دکتر فروزنده‌مقدم (نماینده تحصیلات تکمیلی)

جناب آقای دکتر مزدارانی (استاد ناظر)

سرکار خانم دکتر اوسطی آشتیانی (استاد ناظر)

تاریخ: .....
پیوست: .....

آیین‌نامهٔ چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس مبیّن بخشی از فعالیتهای علمی ـ پژوهشی دانشگاه است، بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

مادهٔ ۱. در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به مرکز نشر دانشگاه اطلاع دهد.

مادهٔ ۲. در صفحه سوم (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کنید:

«کتاب حاضر، حاصل پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد / در رشتهٔ **هماتولوژی** است. که در سال ۱۳۸۰ در دانشکدهٔ **علوم‌پزشکی** دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی سرکار خانم دکتر **مژده صالح‌نیا** و مشاورهٔ جناب آقای دکتر **علی‌اکبر پورفتح‌ا...** از آن دفاع شده است».

مادهٔ ۳. به منظور جبران بخشی از هزینه‌های نشریات دانشگاه تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اهدا کند، دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

مادهٔ ۴. در صورت عدم رعایت مادهٔ ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأدیه کند.

مادهٔ ۵. دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در مادهٔ ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

مادهٔ ۶. اینجانب **علی‌اکبر موثق‌پور اکبری** دانشجوی رشته **هماتولوژی** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام‌خانوادگی

تاریخ و امضاء

تقدیم به :

ذات باری‌تعالی که هرچه دارم مرهون الطاف اوست.

پدر و مادر مهربانم

که همیشه مشوقم بودند.

و

خواهران خوب و یگانه برادر عزیزم

که همواره مدیون محبت‌های ایشان هستم.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله، مراتب قدردانی و سپاس بی‌پایان خود را از کلیه اساتید و سایر افرادی که مرا در طول تحقیق حاضر یاری نموده‌اند، تقدیم می‌دارم:

بویژه:

- استاد بزرگوار، سرکار خانم دکتر مژده صالح‌نیا که راهنمایی پایان‌نامه را بر عهده داشتند.

- استاد ارجمند، جناب آقای دکتر علی‌اکبر پورفتح‌اله مدیریت محترم گروه هماتولوژی که زحمت مشاورهٔ پایان‌نامه را نیز به عهده داشتند.

- استاد گرامی، جناب آقای دکتر محمد مؤذنی، مدیر محترم گروه ایمنولوژی

- اساتید بزرگوار، جناب آقایان سعید کاویانی و مسعود سلیمانی، دکتر بهزاد پوپک، ناصر امیری‌زاده و سرکار خانم نادعلی

- اساتید محترم گروه، جناب آقایان دکتر فرهاد ذاکر، دکتر مرتضوی، دکتر محمودیان شوشتری، دکتر عباس حاجی فتحعلی و سرکار خانم دکتر اوسطی آشتیانی

- گروه هماتولوژی دانشگاه تربیت مدرس بویژه سرکار خانم اصغری

- گروه قارچ‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس بویژه جناب آقای یادگاری

- دوستان خوبم: عزیز محمودزاده، رضا فیضی، سیامک اکبری، حسن تکمه‌داشی، اصفر کیانی، مجید ترماحی اردستانی، رامین سعادتیان.

از زحمات سرکار خانم دباغی جهت انجام تایپ پایان‌نامه تشکر می‌کنم.

چکیده

هدف اصلی این تحقیق در درجهٔ اول جداسازی، کشت و تولید سلول‌های بنیادی جنینی برای اولین بار در ایران بوده و در مرحله بعدی کشت سلول‌های حاصله بر سطح استرومای مغز استخوان به منظور ارزیابی تمایز آنها به پیش‌ساز سلول‌های خونی در شرایط in vitro بوده است.

بدین منظور مقدار ۳۸۵ جنین در مرحله بلاستوسیست از موش‌های حامله نژاد NMRI تهیه شده و در محیط DMEM حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاو به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. ۲ تا ۴ روز پس از خروج جنین‌ها از زونا پلوسیدا سلول‌های توده داخل سلولی (Inner cell mass) تشکیل کلون داده که براساس مرفولوژی مورد شناسایی قرار گرفتند. پس از تریپسینه شدن، سلول‌های مذکور با دو روش متفاوت جهت بدست آوردن کلون سلول‌های بنیادی جنینی کشت داده شدند. در روش اول، حدود ۵۰ توده داخل سلولی پس از تریپسینه شدن بر روی سلول‌های فیبروبلاست اولیه جنین موش که قبلاً فعالیت میتوزی آنها متوقف شده بود منتقل شدند. در این روش پس از گذشت ۳ هفته از کشت، هیچگونه آثاری از تشکیل کلون بر سطح سلول‌های فیبروبلاستی مشاهده نگردید.

در روش دوم حدود ۳۳۵ توده داخل سلولی پس از تریپسینه شدن در محیط کشت DMEM حاوی، ۱۰٪ سرم جنین گاو، Leukemia Inhibitory Factor (LIF) به میزان ۱۰۰۰ u/ml و ۰/۱ میلی‌مول بتامرکاپتوانانول کشت داده شدند.

پس از ظهور کلون‌های مربوط به سلول‌های بنیادی جنینی، چندین ساب‌کالچر از آنها تهیه و به روش هیستوشیمی آلکالن فسفاتاز مورد شناسایی قرار گرفتند. بعد از ساب‌کالچر سوم تعدادی از کلونهای سلول‌های بنیادی بر سطح استرومای مغز استخوان موش که در شرایط in vitro به مدت ۳ هفته کشت داده شده و فعالیت میتوزی آنها نیز متوقف گردیده بود انتقال داده شدند. پس از گذشت ۲ هفته، سلول‌های موجود در کشت مورد نظر به محیط‌های کشت اختصاصی نیمه جامد متیل سلولز انتقال یافتند و تحت تأثیر فاکتورهای رشد IL3 و IL6 قرار گرفتند، تا تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های پیش‌ساز خونی مورد ارزیابی قرار گیرد.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که:

۱- می‌توان از بلاستوسیست موش نژاد NMRI سلول‌های بنیادی را جداسازی و تکثیر نمود. گرچه از سرعت رشد و تکثیر کمی برخوردار بوده و نیز درصد کمی کلون سلولی ایجاد می‌نمایند.

۲- استفاده از فیبروبلاست اولیه جنین موش به عنوان لایه پشتیبان به تنهایی در جلوگیری و مهار تمایز و همچنین فرایند تکثیری سلول‌های بنیادی جنینی در نژاد NMRI مؤثر نیست.

۳- کشت سلول‌های استرومای مغز استخوان موش به مدت ۳ هفته (طولانی مدت) ریز محیط مناسبی را فراهم کرد تا سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های پیش‌ساز خونی تمایز حاصل نماید.

بنابراین می‌توان با بهبود شرایط و تولید سلول‌های بنیادی جنین موش در مطالعات پایه‌ای مثل تمایز آنها به رده‌های خاص، تولید جانوران ترانس ژن، سلول درمانی، ایجاد تغییرات ژنی هدفمند (gene targeting) و غیره استفاده نمود.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی جنینی، جنین موش، فاکتور مهارکننده لوسمی (LIF)، سلول‌های بنیادی خونساز

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات انجام شده ۱

۱-۱. پیشگفتار ۲

۱-۲. خصوصیات و ویژگی‌های سلول‌های بنیادی جنینی ۵

۱-۳. سلول‌های بنیادی چند ظرفیتی در جنین موش ۶

۱-۳-۱. ویژگی‌های سلول‌های بنیادی جنینی و جداسازی آن‌ها از جنین موش ۱۰

۱-۴. اصول تولید و تکثیر سلول‌های بنیادی جنینی ۱۳

۱-۴-۱. لایه پشتیبان ۱۳

۱-۴-۱-۱. لایه پشتیبان از جنس فیبروبلاست اولیه جنین موش ۱۴

۱-۴-۱-۲. لایه پشتیبان از جنس فیبروبلاست STO ۱۴

۱-۴-۱-۳. لایه پشتیبان از جنس سلول‌های اپی‌تلیال لوله فالوپ ۱۵

۱-۵. عوامل دخیل در مهار فرایند تمایز سلول‌های بنیادی ۱۵

۱-۵-۱. اهمیت فاکتورهای DIA/LIF در مهار تمایز ۱۶

۱-۵-۲. عملکرد و نقش DIA/LIF در in vivo ۱۹

۱-۵-۳. ویژگی‌های ساختاری و عملکردی گیرنده فاکتور DIA/LIF ۲۱

۱-۵-۴. وجود اشتراک ساختمانی و عملکردی گیرنده DIA/LIF با گیرنده IL-6 ..... ۲۲

۱-۵-۵. وجود اشتراک ساختمانی و عملکردی گیرنده DIA/LIF با گیرنده انکواستاتین M ۲۳

۱-۶. کاربردهای سلول‌های بنیادی جنینی ۲۴

۱-۶-۱. بکارگیری سلول‌های بنیادی جنینی در تولید حیوانات ترانس ژن ۲۴

۱-۶-۲. بکارگیری سلول‌های بنیادی در سلول درمانی ۲۵

۱-۶-۳. تولید موش با استفاده از تکنیک نوترکیبی همسان ۲۶

عنوان	صفحه

۱-۶-۴. استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی برای شناسایی ژن‌های جدیدی که نقش تنظیمی دارند. ۲۸

۱-۷. روش‌های شناسایی سلول‌های بنیادی جنینی ۳۰

۱-۷-۱. استفاده از روش هیستوشیمی آلکالن فسفاتاز ۳۰

۱-۷-۲. استفاده از مارکرهای سطح سلولی ۳۰

۱-۷-۳. رنگ‌آمیزی ایمنوفلورسانس ۳۰

۱-۷-۴. استفاده از میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ (SEM) ۳۱

۱-۸. جداسازی و تکثیر سلول‌های بنیادی جنینی از گونه‌های مختلف ۳۱

۱-۹. محدودیت‌های سیستم سلول‌های بنیادی جنینی ۳۲

۱-۱۰. محیط کشت سلول‌های بنیادی جنینی ۳۴

۱-۱۱. استرومای مغز استخوان ۳۶

۱-۱۱-۱. اهمیت استروما در خونسازی ۳۷

۱-۱۱-۲. اجزای سلولی استرومای خونساز و نقش آن در خونسازی ۳۸

۱-۱۱-۳. کشت طولانی مدت مغز استخوان ۳۹

۱-۱۱-۴. سلول‌های پشتیبان مغز استخوان ۴۰

۱-۱۱-۵. کشت طولانی مدت مغز استخوان موش ۴۱

۱-۱۲. مروری بر مطالعات انجام گرفته ۴۳

۱-۱۲-۱. جداسازی و تکثیر سلول‌های بنیادی جنینی از جنین پستانداران ۴۳

۱-۱۲-۲. مطالعات صورت گرفته در ارتباط با انتقال سلول‌های بنیادی به germ line و ایجاد حیوان کایمرا ۴۵

عنوان | صفحه

۱-۱۲-۳. تاریخچه بکارگیری سایتوکاین‌ها و عوامل مختلف در تمایز سلول‌های بنیادی... ۴۶

۱-۱۲-۴. مطالعات انجام گرفته در ارتباط با کاربرد سلول‌های بنیادی جنینی در سلول درمانی و ژن درمانی ۴۷

فصل دوم: مواد و روشها ۴۹

۲-۱. تهیه جنین ۵۰

۲-۱-۱. روش Flushing ۵۰

۲-۲. تهیه لایه پشتیبان ۵۱

۲-۲-۱. تهیه لایه پشتیبان از فیبروبلاست جنینی موش ۵۳

۲-۲-۱-۱. استفاده از میتومایسین C ۵۳

۲-۲-۱-۲. استفاده از اشعه گاما ۵۴

۲-۳. جداکردن سلول‌های بنیادی جنینی ۵۴

۲-۴. روش هیستوشیمیایی برای تشخیص سلول‌های بنیادی جنینی ۵۷

۲-۴-۱. بررسی فعالیت آلکان فسفاتاز با میکروسکوپ نوری ۵۷

۲-۴-۲. Azo-coupling techniques ۵۷

۲-۴-۳. طرز تهیه محلول فیکساتیو ۵۸

۲-۴-۴. طرز تهیه محلول رنگی ۵۸

۲-۵. تهیه سلول‌های استرومای مغز استخوان موش ۵۹

۲-۶. انتقال سلول‌های بنیادی جنینی بر روی استرومای مغز استخوان ۶۰

۲-۷. سنجش کلونی ۶۱

عنوان | صفحه

فصل سوم: نتایج ۶۳

۳-۱. خروج جنین‌ها از غشاء زونا ۶۴

۳-۲. تشکیل کلونی اولیه از جنین‌ها ۶۵

۳-۳. جداسازی سلول‌های توده داخل سلولی (ICM) ۶۶

۳-۴. کشت سلول‌های جدا شده از توده داخل سلولی در محیط کشت حاوی LIF ۶۶

۳-۵. کشت سلول‌های جدا شده از توده داخل سلولی بر سطح فیبروبلاست اولیه جنین موش ۶۷

۳-۶. Subculture های بعدی کلون سلول‌های بنیادی ۶۸

۳-۷. بررسی هیستوشیمیایی سلول‌های بنیادی جنینی ۶۸

۳-۸. استرومای مغز استخوان ۶۹

۳-۹. سنجش کلونی ۶۹

فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری، پیشنهادها ۸۰

۴-۱. بحث و نتیجه‌گیری ۸۱

فهرست منابع ۸۷

چکیده انگلیسی ۱۰۵

فهرست جداول

عنوان | صفحه

جدول ۳-۱. شمارش جنین‌های کشت شده و جنین‌های خارج شده از غشاء زونا..... ۶۵

جدول ۳-۲. تعداد جنین‌هایی که توده داخل سلولی آنها ایجاد کلون سلولی نموده است ۶۶

جدول ۳-۳. تعداد چاهک‌هایی که حاوی کلون سلول‌های بنیادی بودند..... ۶۷

فهرست شکل‌ها و تصاویر

عنوان | صفحه

شکل ۱-۱. سیر تکاملی جنین موش از مرحله لقاح تا مرحله گاسترولا ۷

شکل ۱-۲. مکانیزم‌های تنظیمی سلول بنیادی با واسطه DIA/LIF ۱۸

شکل ۱-۳. کاربرد سلول‌های بنیادی جنینی در تولید حیوانات ترانس ژن ۲۴

تصویر ۳-۱. بلاستوسیست‌های late و early بزرگنمایی ۱۰۰ × ۷۰

تصویر ۳-۲. بلاستوسیست در حال خروج از زونا (hatching) بزرگنمایی ۴۰۰ × ۷۰

تصویر ۳-۳. بلاستوسیست hatch کرده بزرگنمایی ۴۰۰ × ۷۱

تصویر ۳-۴. توده داخل سلولی ۲۴ ساعت پس از خروج از زونا بزرگنمایی ۱۰۰ × ۷۱

تصویر ۳-۵. توده داخل سلولی ۴۸ ساعت پس از خروج از زونا بزرگنمایی ۱۰۰ × ۷۲

تصویر ۳-۶. توده داخل سلولی ۷۲ ساعت پس از خروج از زونا بزرگنمایی ۱۰۰ × ۷۲

تصویر ۳-۷. سلول‌های حاصل از توده داخل سلولی پس از تریپسینه شدن بزرگنمایی ۱۰۰ × ۷۳

تصویر ۳-۸. کلون سلول‌های بنیادی جنینی بزرگنمایی ۱۰۰ × ۷۳

تصویر ۳-۹. لایه پشتیبان فیبروبلاست اولیه جنین موش بزرگنمایی ۱۰۰ × ۷۴

تصویر ۳-۱۰. کلون سلول‌های بنیادی جنینی در subculture دوم و سوم بزرگنمایی ۱۰۰ × ۷۴

تصویر ۳-۱۱. کلون سلول‌های بنیادی جنینی در subculture چهارم به بعد بزرگنمایی ۲۵۰ × ۷۵

تصویر ۳-۱۲. کلون تریپسینه شده سلول‌های بنیادی در subculture چهارم به بعد، قبل از عمل pipetting بزرگنمایی ۱۰۰ × ۷۵

تصویر ۳-۱۳. رنگ‌آمیزی آلکالن فسفاتاز سلول‌های بنیادی جنینی. مناطق فعالیت آنزیم به شکل قهوه‌ای روشن قابل رویت است. بزرگنمایی ۱۰۰۰ × ۷۶

تصویر ۳-۱۴. رنگ‌آمیزی آلکالن فسفاتاز کلونی از سلول‌های بنیادی جنینی بزرگنمایی ۱۰۰۰ × ۷۶

عنوان	صفحه

تصویر ۳-۱۵. رنگ‌آمیزی آلکالن فسفاتاز کلون سلول‌های بنیادی با رنگ افتراقی هماتوکسیلین بزرگنمایی ۱۰۰۰ × ۷۷

تصویر ۳-۱۶. رنگ‌آمیزی آلکالن فسفاتاز کلون سلول‌های بنیادی با رنگ افتراقی هماتوکسیلین بزرگنمایی ۴۰۰ × ۷۷

تصویر ۳-۱۷. سلول‌های مغز استخوان جمع‌آوری شده از فمور موش درکشت طولانی مدت مغز استخوان بزرگنمایی ۱۰۰ × ۷۸

تصویر ۳-۱۸. هفته سوم کشت طولانی مدت استرومای مغز استخوان موش بزرگنمایی ۱۰۰ × . ۷۸

تصویر ۳-۱۹. کلون مشکوک به سلول‌های خونساز، ۱۴ روز پس از انتقال سلول‌های بنیادی بر سطح سلول‌های استرومای مغز استخوان بزرگنمایی ۱۰۰ × ۷۹

تصویر ۳-۲۰. ظهور کلون‌های خونساز در محیط متیل سلولز بزرگنمایی ۱۰۰ × ۷۹

فصل اول

مقدمه

و

مروری بر مطالعات انجام شده