دانشگاه اراک

دانشکده علوم - گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد علوم جانوری (گرایش سلولی تکوینی)

تحت عنوان:

بررسی اثر پارانونایل فنل بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت بالغ به استئوبلاست

توسط:

لیلا ده دهی

اساتید راهنما :

دکتر محمد حسین آبنوسی

دکتر ملک سلیمانی مهرنجانی

استاد مشاور:

دکتر سید محمد علی شریعت زاده

تیرماه ۱۳۸۹

بسم الله الرحمن الرحيم

چکیده

صنعتی شدن جوامع منجر به استفاده از آلاینده‌هایی شده که با ورود به آب، هوا و اکوسیستم محیط زندگی بشر را تحت تاثیر قرار داده است. یکی از این آلاینده‌ها پارانونایل فنل می‌باشد که در فرمولاسیون و ساخت بسیاری از محصولات مورد استفاده در زندگی مدرن از جمله مواد پلاستیکی، لوازم آرایشی و شوینده‌ها استفاده می‌شود. این آلاینده پس از ورود به بدن موجود زنده، قابلیت تجمع در بافت ها را داشته و طی بررسی‌های گوناگون اثرات تخریبی آن در هر دو محیط in vivo و in vitro مشخص شده‌است. به منظور بررسی توکسیکولوژی اثر این آلاینده، سلول بنیادی مزانشیمی با توانایی خود نوسازی و قابلیت تمایز به انواع سلول‌ها می‌تواند به عنوان مدل مناسبی مورد استفاده قرار گیرد. لذا هدف این مطالعه بررسی اثر دوزهای مختلف پارانونایل (۵-۰۰۱/ ۰میکرومولار) فنل در طی ۲۱ روز بر توانایی زیستی سلول بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت و تاثیر دوز ۰/۵ و ۲/۵ میکرومولار از پارانونایل فنل به عنوان دوزهای منتخب در بررسی مورفولوژی، مرگ سلولی و تمایز استئوژنیک این سلول‌ها بود. در این مطالعه پس از بررسی توانایی زیستی توسط دو روش رنگ آمیزی تریپان بلو و MTT، توانایی کلونی زایی (CFA) در روزهای ۱۴،۷ و ۲۱ و میزان دوبرابر شدگی جمعیت (PDN) در روزهای ۵ ،۱۰،۱۵ و ۲۱ ارزیابی گردید. همچنین از رنگ آمیزی فلورسنت (هوخست و آکریدین اورانژ) برای مورفولوژی و از تست تانل، تست کاسپاز، DNA Ladder و آزمون کامت برای بررسی مرگ سلولی استفاده شد. به علاوه میزان تمایز با استفاده از روش کمی آلیزارین رد، غلظت کلسیم و میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز مورد ارزیابی قرار گرفت. داده ها توسط نرم افزار SPSS و روش آنالیز واریانس یک طرفه (Tukey test) و دو طرفه مورد ارزیابی قرار گرفت و $p<0.05$ به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که پارانونایل فنل در یک اثر وابسته به دوز بصورت معنی داری منجر به کاهش توانایی زیستی، توانایی کلونی زایی و میزان دوبرابرشدگی جمعیت سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت می‌شود. علاوه بر آن تغییرات مورفولوژیکی مانند شکستگی و تراکم کروماتین هسته، کاهش معنی دار قطر هسته و چروکیدگی سیتوپلاسم در این سلول ها نیز مشاهده شد. آزمون کامت و DNA Ladder حاکی از شکست DNA و تست تانل و کاسپاز نیز برای سلول های تیمار شده مثبت بود. این آلاینده همچنین باعث کاهش غلظت کلسیم، فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و میزان معدنی شدن در سلول های استئوبلاست تمایز یافته گردید. این آلاینده با القاء آپوپتوزیس وابسته به کاسپاز موجب کاهش توانایی زیستی و تکثیری سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت و نیز موجب اختلال در فرایند تمایز استئوژنیک آن ها شد.

فهرست

فصل اول (مقدمه)

۱-۱. سلول‌های بنیادی ۲
۱-۱-۱ تعریف سلول های بنیادی ۲
۱-۱-۲ خود نوزایی سلول بنیادی ۳
۱-۱-۳ دسته بندی سلول های بنیادی بر مبنای توان تمایزی آن ها ۴
۱-۱-۳-۱ همه توان ۴
۱-۱-۳-۲ پرتوان ۴
۱-۱-۳-۳چند توان ۴
۱-۱-۴ دسته بندی سلول های بنیادی بر اساس منشا ۴
۱-۱-۴-۱ سلول های بنیادی جنینی ۵
۱-۱-۴-۲ سلول های زاینده جنینی ۶
۱-۱-۴-۳ سلول های بنیادی رویانی ۶
۱-۱-۴-۴ سلول های بنیادی بند ناف ۶
۱-۱-۴-۵ سلول های بنیادی بالغ ۸
۱-۱-۴-۵-۱ سلول های بنیادی هماتوپویتیک (مغز استخوان و خون محیطی) ۹
۱-۱-۴-۵-۲ سلول های بنیادی مزانشیم(استرومای مغز استخوان) ۹
۱-۲. بافت مغز استخوان ۱۰
۱-۲-۱ سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان ۱۰
۱-۲-۱-۱ تاریخچه ۱۰
۱-۲-۱-۲ کنام سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان ۱۱
۱-۲-۱-۳ مورفولوژی سلول های بنیادی مزانشیم ۱۳
۱-۲-۱-۴ منابع سلول های بنیادی مزانشیم ۱۴
۱-۲-۱-۵ رشد و گسترش سلول های بنیادی مزانشیم ۱۵
۱-۲-۱-۶ پتانسیل تمایزی چنددودمانه سلول های بنیادی مزانشیم ۱۵
۱-۳. استخوان ۱۹
۱-۳-۱ فرایند استخوان سازی ۲۱
۱-۳-۱-۱ تشکیل استخوان از طریق استخوان سازی درون غشایی ۲۱
۱-۳-۱-۲ تشکیل استخوان از طریق استخوان سازی درون غضروفی ۲۲
۱-۳-۲ مراحل تمایز سلول های بنیادی مزانشیم به استئوسیت ها ۲۲
۱-۳-۲-۱ تغییر سیتواسکلتون اکتین در طی تمایز به استئوبلاست ها ۲۴
۱-۳-۲-۲ دسته بندی عملکردی پروتئین ها در فرایند استخوانی شدن ۲۴
۱-۳-۳ دوباره سازی استخوان ۲۵
۱-۳-۴ اثر استروژن ها بر سیستم اسکلتی ۲۶
۱-۴. تمایز استئوژنیک ۲۷
۱-۴-۱ اهمیت تمایز به استخوان ۲۷
۱-۴-۲ شرایط آزمایشگاهی لازم برای تمایز به استخوان در سلول های بنیادی ۲۸

۱-۴-۳ نقش مواد تمایز در شرایط آزمایشگاهی ۲۹
۱-۴-۴ نقش سیگنال دهی Wnt در تمایز سلول های بنیادی مزانشیم به استخوان ۳۰
۱-۵. آپوپتوزیس ۳۲
۱-۵-۱ مورفولوژی آپوپتوزیس ۳۲
۱-۵-۲ مکانیسم های آپوپتوزیس ۳۳
۱-۵-۲-۱ مسیر خارجی ۳۳
۱-۵-۲-۲ مسیر داخلی ۳۴
۱-۶. آلکیل فنل پلی اتوکسیلات ۳۷
۱-۶-۱ ویژگی های نونایل فنل ۳۷
ویژگی های شیمیایی ۳۷
خاصیت استروژنی ۳۸
۱-۶-۲ پراکنش نونایل فنل ۳۹
۱-۶-۳ اثرات نونایل فنل ۳۹
سمیت حاد برای انسان ۳۹
مرگ ۴۰
آلودگی پوست ۴۰
۱-۶-۳-۱ اثرات نونایل فنل برروی سلول ۴۰
سلول بنیادی جنینی ۴۰
سلول بنیادی عصبی ۴۰
سلول سرتولی ۴۱
سلول‌های 3T3-L1 ..... ۴۱
هسته‌ی سیاه ۴۲
سلول آبششی ماهی پهن ۴۲
نوتروفیل ۴۲
سلول سرطانی MCF7 ..... ۴۳
سلولMG63 ..... ۴۳
مروری بر مطالعات گذشته ۴۳
هدف مطالعه ۴۵

فصل دوم (مواد و روش‌ها)

۲-۱. انتخاب حیوان ۴۹
۲-۲. جدا سازی وکشت سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان ۴۹
اجرای پاساژ ۵۰
۲-۳. اثبات مزانشیم بودن سلول های استخراج شده ۵۲
۲-۳-۱ تمایز به استخوان ۵۲
مراحل رنگ آمیزی آلیزارین رد ۵۲

۲-۴. بررسی توان زیستی سلول‌ها (دوز فایندینگ) ۵۳
بررسی حیات سلولی به کمک تریپان بلو ۵۳
مراحل تست رنگ آمیزی با تریپان بلو ۵۴
بررسی حیات سلول بر پایه‌ی رنگ سنجی (MTT) ۵۵
مراحل سنجش تترازولیوم ۵۵
ترسیم منحنی استاندارد با استفاده از سنجش تترازولیوم ۵۷
انتخاب دوز مورد نظر ۵۸
۲-۵. بررسی توان تکثیری سلول های بنیادی مزانشیم ۵۸
توانایی تشکیل کلونی ۵۸
سنجش پتانسیل کلونی زایی(CFC) ۵۹
رنگ آمیزی کریستال ویولت ۶۰
محاسبه تعداد دوبرابر شدگی جمعیتی (PDN) ۶۰
روش انجام تست PDN ۶۱
۲-۶. مطالعه آپوپتوزیس ۶۱
۲-۶-۱ بررسی تغییرات مورفولوژیکی با استفاده از رنگ آمیزی فلورسنس ۶۱
مراحل رنگ آمیزی با هوخست و اکریدین اورنژ ۶۲
۲-۶-۲ DNA Ladder ۶۳
مراحل انجام تست DNA Ladder ۶۴
استخراج DNA سلول ۶۴
۲-۶-۳ تشخیص وابستگی آپوپتوزیس به مسیر کاسپاز ۶۵
پروتکل تست کاسپاز۳ ۶۵
۲-۶-۴ آزمون کامت ۶۷
آماده سازی لام‌ها ۶۸
لیز کردن سلول‌ها ۶۸
تیمار قلیایی سلول‌ها ۶۹
الکتروفورز سلول‌ها ۶۹
خنثی سازی و تثبیت ۶۹
رنگ آمیزی ۶۹
بررسی میکروسکوپی و عکس برداری ۷۰
۲-۶-۵ بررسی حیات سلول به روش نشان دار کردن با آنزیم باند شونده به DNA ۷۰
تکنیک تانل ۷۰
۲-۷ بررسی روند تمایز ۷۳
۲-۷-۱ انجام تست MTT برای سلول های تمایز یافته ۷۳
مراحل انجام تست MTT استئوژنیک ۷۳
۲-۷-۲ سنجش میزان رسوب ماتریکس معدنی به کمک استخراج رنگ آلیزارین رد ۷۳
رسم منحنی استاندارد برای رنگ آمیزی آلیزارین رد ۷۴
بررسی میزان رسوب ماتریکس استخوانی در نمونه های تیمار شده ۷۵
۲-۷-۳ بررسی میزان رسوب کلسیم با استفاده از کیت کلسیم به روش رنگ سنجی ۷۶
۲-۷-۴ بررسی میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز ۷۸
طرز ترسیم منحنی استاندارد ۷۹

بررسی میزان فعالیت آنزیم در سلول های تیمار شده استئوژنیک و غیر استئوژنیک ۸۰
۲-۸. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها ۸۱

فصل سوم (نتایج)

مقدمه ۸۳
الف: نتایج مرحله استخراج سلول ها و انتخاب دوز موثر ۸۳
۳-۱. تکثیر و رشد سلول بنیادی مزانشیم ۸۳
۳-۲. اثر پارانونایل فنل بر توانایی زیستی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت ۸۴
۳-۲-۱ توانایی زیستی سلول های مزانشیم بر پایه جذب تریپان بلو ۸۴
۳-۲-۲ روش MTT (رنگ سنجی) ۸۵
انتخاب دوز موثر ۸۶
ب: نتایج اثر دوزهای انتخابی پارانونایل فنل بر توانایی کلونی زایی، تعداد دوبرابرشدگی جمعیت سلولی و آپوپتوزیس ۸۷
۳-۳. اثر پارانونایل فنل بر توان تکثیری سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت ۸۷
۳-۳-۱ سنجش توانایی کلونی زایی ۸۷
۳-۳-۱-۱ تعداد کلونی ۸۷
۳-۳-۱-۲ قطر کلونی ۸۸
۳-۳-۲ محاسبه تعداد دوبرابرشدگی جمعیت سلول ها ۹۰
۳-۴. آپوپتوزیس ۹۱
۳-۴-۱ بررسی تغییرات مورفولوژیک با استفاده از رنگ آمیزی فلورسنس ۹۱
۳-۴-۲ DNA Ladder ۹۳
۳-۴-۳ کاسپاز ۹۴
۳-۴-۴ آزمون کامت ۹۴
۳-۴-۵ تانل ۹۶
ج: نتایج اثر دوزهای انتخابی پارانونایل فنل بر شاخص های تمایز به استئوبلاست ۹۶
۳-۵ توانایی زیستی سلول ها در روند تمایز ۹۶
۳-۵-۱ روش MTT (رنگ سنجی) ۹۶
۳-۵-۲ میزان معدنی شدن ماتریکس با سنجش رنگ آلیزارین رد ۹۸
۳-۵-۳ میزان رسوب کلسیم ۱۰۰
۳-۵-۴ میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز ۱۰۱
۳-۵-۵ بررسی تغییرات مورفولوژیکی با استفاده از رنگ آمیزی فلورسنس در نمونه های استئوژنیک ۱۰۲

فصل چهارم (بحث)

۴-۱ اثر پارانونایل فنل بر توانایی زیستی سلول ها ۱۰۶
۴-۲ اثر پارانونایل فنل در القای آپوپتوزیس ۱۰۸

پارانونایل فنل و القای فعالیت کاسپازها ۱۰۹
تاثیر پارانونایل فنل بر یکپارچگی DNA ۱۱۰
۴-۳ اثر پارانونایل فنل بر تغییر غلظت کلسیم درون سلولی ۱۱۱
۴-۴ اثر پارانونایل فنل بر تمایز سلولی ۱۱۲

فصل پنجم (پیوست)

۵-۱. روش تهیه محیط کشت ۱۱۵
۵-۲. تهیه‌ی فسفات بافر سالین مثبت PBS^{+} ۱۱۵
۵-۳. تهیه‌ی فسفات بافر سالین PBS^{-} ۱۱۶
۵-۴. روش تهیه محیط تمایزی استئوژنیک ۱۱۶
۵-۵. آماده سازی آلیزارین رد ۱۱۷
۵-۶. روش تهیه محلول تریپان بلو۰/۴ درصد ۱۱۷
۵-۷. روش تهیه‌ی محلول MTT ۱۱۷
۵-۸. تهیه محلول کریستال ویولت ۱۱۷
۵-۹. آماده سازی بافر PBS/T ۱۱۷
۵-۱۰. روش تهیه‌ی محلول آگارز با نقطه‌ی ذوب معمولی ۱۱۸
۵-۱۱. روش تهیه محلول آگارز با نقطه ذوب پائین ۱۱۸
۵-۱۲ محلول لیز کننده ۱۱۸
۵-۱۳ بافر الکتروفورز ۱۱۹
۵-۱۴ . بافر خنثی ۱۱۹
۵-۱۵ آماده سازی پارافرمالدهید ۴٪ ۱۱۹
۵-۱۶. روش تهیه محلول تریتون X-100 در سدیم سیترات ۱۱۹
۵-۱۷. روش تهیه‌ی محلول DAB ۱۲۰
۵-۱۸. بافر استخراج آلکالین فسفاتاز ۱۲۰
۵-۱۹. روش لاوری ۱۲۰
تهیه‌ی نمودار استاندارد برای آزمایش لاوری ۱۲۰
۵-۱۹-۱ تهیه‌ی محلول BSA ۱۲۱
۵-۱۹-۲. روش تهیه‌ی محلول کمپلکس ۱۲۱

فصل ششم (منابع)

فهرست اشکال

شکل ۱-۱.دسته بندی سلول های بنیادی انسان ۸
شکل ۱-۲. کنام سلول های بنیادی مغز استخوان ۱۳
شکل ۱-۳. اشکال سلول های بنیادی مزانشیم ۱۴
شکل ۱-۴. تمایز سلول های بنیادی مزانشیم ۱۷
شکل ۱-۵. تقسیم نامتقارن سلول های بنیادی مزانشیم ۱۸
شکل ۱-۶. رسوب کلسیم بر فیبرهای کلاژنی موجود در ماتریکس ۲۰
شکل ۱-۷. ترشح ماتریکس کلاژنی از استئوبلاست ها و تشکیل استئوئید ۲۱
شکل ۱-۸. فرایند استخوانی شدن درون غشایی ۲۲
شکل ۱-۹. فرایند استخوانی شدن درون غضروفی ۲۲
شکل ۱-۱۰. مراحل تمایز سلول های مزانشیم به استئوسیت و کاهش میزان تکثیر در آن ها ۲۳
شکل ۱-۱۱. تبدیل سلول های پیش ساز استخوان به استئوبلاست ها ۲۳
شکل ۱-۱۲. تشکیلات سیتواسکلتون در سلول های تمایز نیافته و استئوبلاست های بالغ ۲۴
شکل ۱-۱۳. توزیع عملکردی پروتئین های شناسایی شده در فرایند تمایز ۲۵
شکل ۱-۱۴. اثر استروژن بر سلول های بنیادی مزانشیم ۲۷
شکل ۱-۱۵. تصویر شماتیک از مسیر سیگنال دهی Wnt ۳۱
شکل ۱-۱۶.مسیر سیگنال دهی خارجی آپوپتوزیس ۳۴
شکل ۱-۱۷. مسیر داخلی آپوپتوزیس ۳۵
شکل ۱-۱۸. پروتئین های رها شده از میتوکندری در آپوپتوزیس ۳۶
شکل ۱-۱۹. مکانیسم مواد سمی در اتصال به رسپتور استروژنی ۳۸
شکل ۱-۲۰. شباهت ساختاری ۱۷- بتا استرادیول و ۴- نونایل فنل ۳۹
شکل ۲-۱. نمایی از لام نئوبار ۵۱
شکل ۲-۲. ساختار آلیزارین رد ۵۳
شکل ۲-۳ ساختار تریپان بلو ۵۳
شکل ۲-۴. نفوذ رنگ تریپان بلو در سلول های مرده ۵۵
شکل ۲-۵. تغییر ساختار رنگ تترازولیوم بر اثر عمل آنزیم های میتوکندریایی و تولید بلور فورمازان ۵۶
شکل ۲-۶. مراحل انجام تست MTT ۵۷
شکل ۲-۷. نمودار استاندارد MTT ۵۸
شکل ۲-۸ تمایز کلونی های حاصل از سلول های مزانشیم به رده های دیگر سلولی ۵۹
شکل ۲-۹. ساختار کریستال ویولت ۶۰
شکل ۲-۱۰. ساختار رنگ فلورسنس هوخست ۶۲
شکل ۲-۱۱. ساختار مولکولی آکریدین اورنژ ۶۳
شکل ۲-۱۲. نواحی شکستگی های DNA در آپوپتوزیس ۶۴
شکل ۲-۱۳ مراحل تست کاسپاز ۶۶
شکل ۲-۱۴ کیت کاسپاز مورد استفاده ۶۷
شکل ۲-۱۵. مراحل آزمون کامت ۶۸
شکل ۲-۱۶ ساختار مولکولی اتیدیوم بروماید ۷۰
شکل ۲-۱۷ تست تانل ۷۲
شکل ۲-۱۸. غلظت های مشخص مورد استفاده در رسم منحنی استاندارد ۷۴

شکل۲-۱۹. استخراج رنگ آلیزارین رد به کمک اسید استیک ۷۵
شکل۲-۲۰ نمودار غلظت های مشخص از رنگ آلیزارین رد ۷۵
شکل۲-۲۱ نمودار استاندارد آلکالین فسفاتاز ۸۰
شکل۳-۱. مراحل رشد سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت..... ۸۴
شکل۳-۲. رنگ آمیزی فلورسنس سلول بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت با رنگ هوخست..... ۹۲
شکل۳-۳. رنگ آمیزی آکریدین اورنژ سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت..... ۹۳
شکل۳-۴. طرح نردبانی در ژل الکتروفورز ۹۳
شکل۳-۵. تست کاسپاز- ۳ فعال ۹۴
شکل۳-۶. تست کامت در سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان ۹۵
شکل۳-۷. درجه بندی سلول ها بر اساس طول و اندازه کامت..... ۹۵
شکل۳-۸. تست تانل..... ۹۶
شکل۳-۹. ماتریکس رنگ آمیزی شده با آلیزارین رد در نمونه های استئوژنیک..... ۱۰۰
شکل۳-۱۰.رنگ آمیزی فلورسنس هوخست در سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان تمایز یافته به استئوبلاست ۱۰۳
شکل۳-۱۱. رنگ آمیزی آکریدین اورنژ سلول بنیادی مزانشیم مغز استخوان تمایز یافته به استئوبلاست..... ۱۰۴
شکل۵-۱. نمودار استاندارد لاوری..... ۱۲۱

فهرست جدول‌ها

جدول۲-۱.آماده سازی محلول استاندارد و اندازه گیری فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز ۷۹
جدول۳-۱. مقایسه میانگین درصد توانایی زیستی سلول‌ها و تعداد سلول های مزانشیم زنده پس از تیمار ۲۱ روزه با دوزهای مختلف پازانونایل فنل با روش رنگامیزی تریپان بلو و MTT ۸۶
جدول۳-۲. اثر متقابل دوز و زمان بر میانگین تعداد کلونی های تشکیل شده در سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت در روزهای ۷، ۱۴و ۲۱ پس از تیمار با پارانونایل فنل ۸۷
جدول۳-۳. مقایسه میانگین تعداد کلونی های تشکیل شده توسط سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت در روزهای ۷، ۱۴و ۲۱ پس از تیمار با پارانونایل فنل..... ۸۸
جدول۳-۴. اثر متقابل دوز و زمان بر میانگین قطر کلونی های تشکیل شده توسط سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت در روزهای ۷، ۱۴و ۲۱ پس از تیمار با پارانونایل فنل.. ..... ۸۹
جدول۳-۵. مقایسه میانگین قطر کلونی های تشکیل شده توسط سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت در روزهای ۷، ۱۴و ۲۱ پس از تیمار با پارانونایل فنل..... ۸۹
جدول۳-۶ اثر متقابل دوز و زمان بر میانگین میزان دوبرابرشدگی جمعیت سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت در روزهای ۵،۱۰،۱۵و ۲۱ پس از تیمار با پارانونایل فنل ۹۰
جدول۳-۷ مقایسه میانگین تعداد دوبرابرشدگی جمعیت سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت در روزهای ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۱ پس از تیمار با پارانونایل فنل ۹۱
جدول۳-۸. مقایسه میانگین قطر هسته در سلولهای بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت در گروه های تیمار با پارانونایل فنل ۹۲
جدول۳-۹. مقایسه میانگین درصد درجه آسیب وارد به DNA در سلولهای مزانشیم مغز استخوان رت در گروه های تیمار با پارانونایل فنل ۹۵
جدول۳-۱۰. اثر متقابل دوز و زمان بر میانگین میزان جذب نور مرئی در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط نمونه های استئوژنیک تیمار شده با پارانونایل فنل..... ۹۷
جدول۳-۱۱ مقایسه میانگین میزان جذب نور مرئی در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط نمونه های استئوژنیک تیمار شده با پارانونایل فنل ۹۷
جدول۳-۱۲ اثر متقابل دوز و زمان بر میانگین میزان (میلی مولار) رنگ آلیزارین رد استخراج شده از نمونه های استئوژنیک تیمار شده با پارانونایل فنل..... ۹۸
جدول۳-۱۳. مقایسه میانگین میزان (میلی مولار) رنگ آلیزارین رد استخراج شده از نمونه های استئوژنیک تیمار شده با پارانونایل فنل ۹۹
جدول۳-۱۴. مقایسه میانگین میزان کلسیم (میلی گرم بر دسی لیتر) در نمونه های استئوژنیک پس از ۲۱ روز تیمار با پارانونایل فنل ۱۰۱
جدول۳-۱۵ مقایسه میانگین میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز (U/L) در نمونه های استئوژنیک پس از ۲۱ روز تیمار با پارانونایل فنل ۱۰۱
جدول۳-۱۶ مقایسه میانگین قطر هسته های رنگ آمیزی شده با رنگ هوخست در نمونه های استئوژنیک پس از ۲۱ روز تیمار با پارانونایل فنل..... ۱۰۲
جدول۵-۱. ترکیبات محیط تمایزی استئوژنیک ۱۱۶

فصل اول

مقدمه

۱-۱ سلول های بنیادی

۱-۱-۱ تعریف سلول های بنیادی

سلول‌های بنیادی سلول‌هایی غیر تخصصی[1] در بدن انسان هستند که قابلیت تبدیل به سلول‌های تخصص یافته را، با کسب کلیه اعمال سلولی تخصصی دارند. بهترین مثال سلول های بنیادی، سلول های بنیادی مغز استخوان می باشد که تخصص نیافته بوده و توانایی تخصص یافتن به سلول های خونی نظیر سلول های خونی سفید و قرمز را دارد. به طور اساسی یک سلول بنیادی، تا زمانی که سیگنالی را جهت تکامل به یک سلول تخصصی دریافت نکند، به صورت غیر متعهد[2] باقی می ماند. سلول های بنیادی ویژگی های قابل توجهی را برای تکامل به انواعی از سلول ها در بدن انسان دارا هستند. آن ها نظیر یک سیستم ترمیمی[3] به کار می روند که می توانند بدون ایجاد محدودیت در ذخایر سایر سلول ها ، تقسیم شوند. زمانی که سلول های بنیادی تقسیم می شوند ، هر سلول جدید دارای پتانسیلی جهت باقی ماندن در حالت بنیادی و یا تبدیل شدن به نوع سلولی دیگر با اعمال تخصصی جدید، نظیر سلول های خونی ،عصبی و ... می باشد[۱].

امروزه سلول های بنیادی از جنین های لانه گزینی نشده، فتوس[4]، بند ناف و بافت های بالغ جداسازی شده اند و تحت شرایط ویژه، این سلول های تمایز نیافته می توانند پر توانه[5] (با قابلیت تبدیل به سلول هایی از همه سه لایه زاینده یعنی اکتودرم ، مزودرم و اندودرم) یا چند توانه[6] (با توانایی تبدیل به تعداد محدودی از انواع سلولی تخصص یافته) باشند[۱].

1- unspecialized
2- uncommitted
3- repair system
4- fetuses
5- pluripotent
6- multipotent

۱-۱-۲ خود تجدیدی[1] سلول بنیادی

سلول های بنیادی دو ویژگی اساسی یعنی توانایی تقسیم و تولید سلول هایی با خواص یکسان (خود تجدیدی) و ایجاد انواع سلول های تمایز یافته، را دارند. تکثیر یا خود تجدیدی، توانایی سلول ها در تولید نسخه های یکسان از خود توسط تقسیم میتوز در یک دوره زمانی مشخص است به صورتی که خصوصیات ژنتیکی و کاریوتایپی در سلول های دختری عینا شبیه سلول های مادری باقی می ماند.

خود تجدیدی سلول های بنیادی از دو راه امکان پذیر است:

تقسیم متقارن: بر طبق این مدل، حاصل تقسیم سلول های بنیادی ، دو سلول دختری مشابه با سلول مادری است . سلول های دختری با فراهم شدن شرایط مناسب وارد مرحله تمایز می شوند .

تقسیم نامتقارن : در این نوع تقسیم هر سلول بنیادی به یک سلول بنیادی و یک سلول پروژنیتور (پیش ساز) تقسیم می شود. سلول بنیادی حاصل از تقسیم ، جمعیت سلول های بنیادی را حفظ کرده و سلول پروژنیتور ، با فراهم شدن شرایط تمایز ، متمایز می شود . بنابراین هیچ تغییری در تعداد کل سلولهای بنیادی حاصل نمی شود[۲].

مطالعات نشان داده است که خود تجدیدی سلول های بنیادی بافتی تحت تاثیر عوامل محیطی نیز می باشد. در واقع دخالت محیط اطراف، به عنوان عامل تعیین کننده تقسیم سلول بنیادی در نظر گرفته می شوند. بر این اساس، در وضعیت های محیطی خاص از قبیل آسیب یا صدمه ، یک سلول بنیادی ممکن است دو سلول دختری ایجاد کند که تحت شرایط محیطی ، یا به صورت سلول های بنیادی باقی می مانند یا متمایز می شوند[۲].

1-self renewing

۱-۱-۳ دسته بندی سلول های بنیادی بر مبنای توان تمایزی آن ها:

بر اساس توان تمایزی و برگشت پذیری آن ها را می توان به انواع ذیل تقسیم نمود:

۱-۱-۳-۱ همه توان[۱]: این سلول ها می توانند همه سلول ها اعم از سلول های فرد و سلول های برون جنینی (جفت) را بسازند. مانند بلاستومرهای یک جنین دو سلولی که هر سلول آن می تواند یک فرد کامل را بسازد.

۱-۱-۳-۲ پرتوان[۲]: سلول هایی هستند که می توانند غالب یا همه سلول های فرد را بسازند. مثلاً سلول های بنیادی جنینی تحت شرایط خاص می توانند یک فرد را بسازند ولی قادر به ایجاد سلول های برون جنینی (جفت) نیستند. سلول هایی که از گنادهای جنینی به دست می آیند و به آن ها سلول های زاینده جنین[۳] گفته می شود نیز جزو این دسته اند .

۱-۱-۳-۳ چند توان[۴]: تعداد محدودتری از انواع سلول را ایجاد می کنند (مانند سلول های بنیادی واقع در بافت های بزرگسالان [۳].

انواعی از سلول های بنیادی در حالت in vivo و in vitro شناسایی و جداسازی گردیده اند. آن ها از دو دسته عمده تشکیل شده اند : سلول های بنیادی جنینی[۵] و سلول های بنیادی بالغ [۱].

۱-۱-۴ دسته بندی سلول های بنیادی بر اساس منشاء

سلول های بنیادی بر اساس منشاء به پنج دسته دسته بندی می شوند (شکل ۱-۱).

1-totipotent
2- pluripotent
3 -embryonic germ cell;EG
4-multipotent
5- embryonic/ fetal stem cells

۱. سلول های بنیادی جنینی (stem cells from embryos)
۲. سلول های زاینده جنینی(human embryonic germ cell)
۳. سلول های بنیادی رویانی (stem cells from the fetus)
۴. سلول های بنیادی بند ناف (stem cells from the umbilical cord)
۵. سلول های بنیادی بالغ (stem cells from the adults) [۱].

۱-۱-۴-۱ سلول های بنیادی جنینی

در پستانداران، اووسیت لقاح یافته ، زیگوت دو سلولی ، چهار سلولی ، هشت سلولی و مورولا که در واقع حاصل تسهیم جنین اولیه هستند ، مثال هایی از سلول های همه توان که قابلیت تشکیل یک ارگانیسم کامل را دارند، می باشند. گواه همه توان بودن این سلول ها، دو قلوهای همسانی هستند که با از هم جدا کردن جنین اولیه در in vitro توسط micromanipulation ایجاد می شوند[۱].

توده سلولی داخلی[1] (ICM) بلاستوسیست ۵ تا ۶ روزه انسان، منبعی از سلول های پر توان جنینی (hESCs) است. در طی تکامل جنینی، ICM به دو لایه سلولی متمایز شامل اپی-بلاست[2] و هیپوبلاست[3] تکوین می یابد. هیپوبلاست کیسه زرده را تشکیل می دهد که در آینده احشاء را در انسان بوجود می آورد و اپی بلاست به لایه های زاینده اولیه (اکتودرم، مزودرم و اندودرم) تمایز می یابد[۱] .

1- inner cell mass (ICM)
2- epiblast
3- hypoblast

۱-۱-۴-۲ سلول های زاینده جنینی

سلول های زاینده اولیه[1] یا پیش ساز های سلولی زاینده دیپلوئید، به مدت کوتاهی در جنین پیش از ارتباط نزدیک با سلول های سوماتیک گنادها وجود دارند و سپس به عنوان سلول های زاینده متعهد می شوند. سلول های زاینده جنینی انسان(hEGCs)[2] نیز سلول های بنیادی هستند که از سلول های زاینده اولیه ستیغ گنادی[3] در جنین ۵ تا ۹ هفته ای منشاء می گیرند. این سلول ها پر توان بوده و قادرند سلول های سه لایه جنینی را ایجاد کنند[۱].

۱-۱-۴-۳ سلول های بنیادی رویانی:

سلول های بنیادی رویانی از انواع سلولی اولیه هستند که در اندام های جنین یافت می شوند. سلول های بنیادی تاج عصبی ، سلول های بنیادی هماتوپویتیک جنینی و پیش سازهای جزایر پانکراسی از جنین های سقط شده[4] جداسازی شده اند. توانایی تمایز سلول های بنیادی تاج عصبی که در مغز جنین یافت می شوند ، به سلول های گلیال و نورون نشان داده شده است. خون جنینی، جفت و بند ناف منابعی غنی از سلول های بنیادی هماتوپویتیک هستند[۱].

۱-۱-۴-۴ سلول های بنیادی بند ناف:

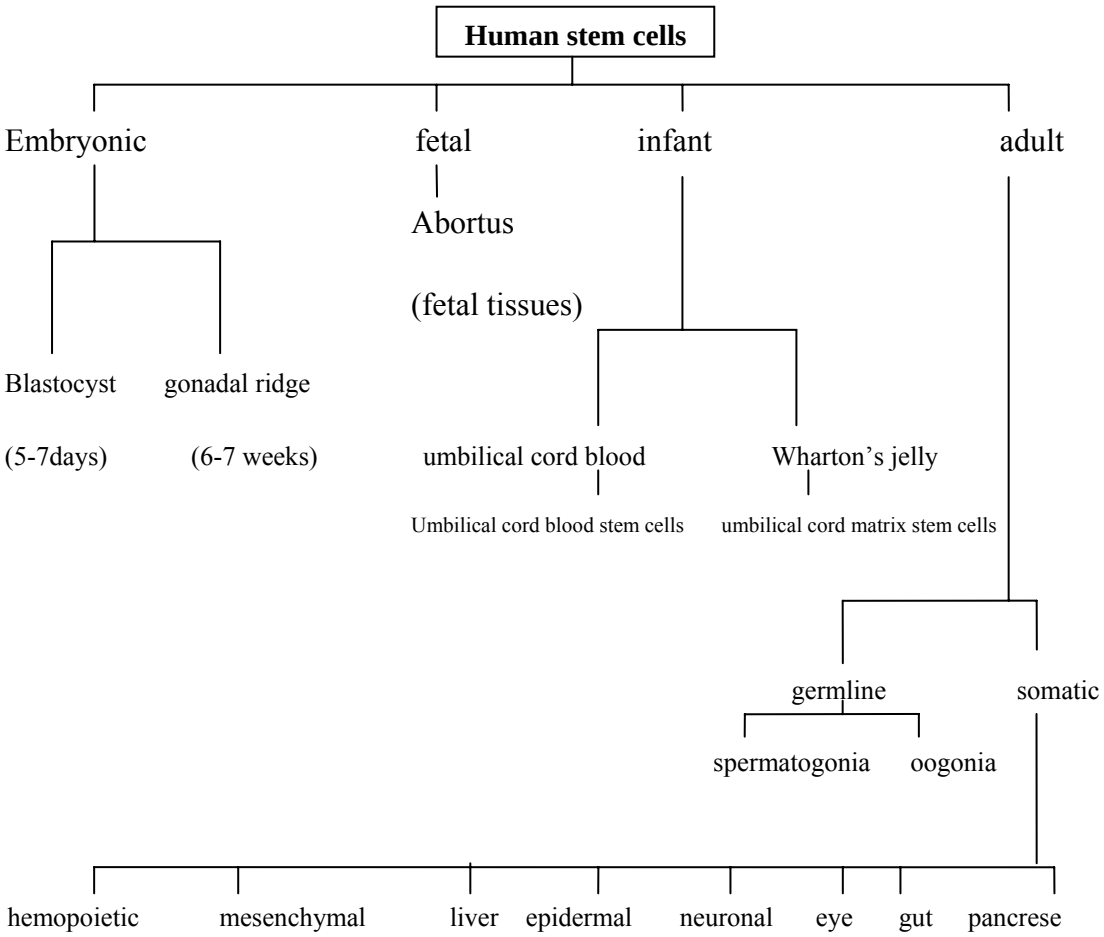
1- primordial germ cells
2- human embryonic germ cells (hEGCs)
3- gonadal ridge
4- abortuses embryos

مقدمه

خون بند ناف شامل سلول های بنیادی در گردش می باشد و محتوای سلولی خون بند ناف به نظر می رسدکه از سلول های مغز استخوان و خون محیطی بالغ کاملاً متمایز باشد. تعداد سلول های بنیادی هماتوپویتیک خون بند ناف برابر یا بیش از سلول های مغز استخوان می باشد و آن ها قادرند در محیط in vitro کلونی هایی را تشکیل دهند. این سلول ها نیاز به فاکتورهای رشد متفاوتی داشته و تلومرهای بلندی داشته و می توانند در کشت بلند مدت ، توسعه یابند.

خون بند ناف قابلیت پیوند کمتری در مقابل واکنش میزبان در مقایسه با مغز استخوان نشان می دهد که احتمالا به دلیل افزایش سطح اینترلوکین -۱۰[1] تولید شده توسط سلول ها و یا کاهش بیان بتا- ۲- میکروگلوبولین[2] است. بیشتر توجهات به سلول های بنیادی خون بند ناف به دلیل قابلیت ذخیره آن در استفاده های بعدی می باشد. گزارش شده است که سلول های ماتریکس خون بند ناف نیز شامل سلول های بنیادی بالقوه ای می باشند که این ماتریکس ژله وارتون[3] نام دارد و منبعی جهت استخراج سلول های بنیادی مزاشیم است[۱].

1- interlukin-10
2- beta-2- microglobulin
3 - wharton’s jelly



شکل۱-۱ دسته بندی سلول های بنیادی انسان[۱]

۱-۱-۴-۵ سلول های بنیادی بالغ

سلول های بنیادی بالغ به سلول های بنیادی هماتوپویتیک (مغز استخوان و خون محیطی)، سلول های بنیادی مزانشیم (استرومای مغز استخوان[1])، سلول های بنیادی روده، سلول های بنیادی کبد، سلول های بنیادی غضروف و استخوان، سلول های بنیادی اپیدرمال (پوست و مو)، سلول های بنیادی عصبی، سلول های بنیادی پانکراسی و سلول های بنیادی چشم تقسیم می شوند (شکل۱-۱) که از بین این سلول ها به توضیح دو مورد از آن ها پرداخته می شود.

1-bone marrow stroma