بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه فردوسی مشهد
گروه زیست‌شناسی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد
رشته زیست شناسی گرایش علوم سلولی ملکولی

با عنوان:

بررسی امکان تمایز سلول های بلاستمایی حاصل از لاله گوش خرگوش سفید نژاد نیوزلندی به سلول های مولد انسولین

استاد راهنما
دکتر مریم مقدم متین

استاد مشاور
دکتر احمد رضا بهرامی

تحقیق و تألیف
مروارید ساعی نسب

زمستان ۱۳۸۸

سپاس خداوند بلند مرتبه را

آن نخستین بی آغاز و آن واپسین بی انجام؛

چگونه می توان نعمتش را سپاس گفت

آنگاه که مرا هم قدم کاروان مشتاقانی قرار داد تا در هر منزل حجم حضورش را احساس کنم.

تقدیم به:

پدر عزیزم؛

او که وجود همیشه آفتابی اش، گرمابخش لحظه لحظه زندگی ام بوده و هست.

و مادر مهربانم؛

او که بیکران دریای مهربانی هایش، بهاری جاودانه را به زندگی ام هدیه نموده است.

و تقدیم به:

همسر فداکارم؛

که پیمودن این راه بدون یاری صمیمانه او میسر نبود.

و نازنین فرزندم؛

که وجود من ناتوان از جبران لحظه های چشم انتظاری اوست...

سپاس

پس از حمد و سپاس الهی، بر خود لازم می دانم تا از تمامی کسانی که در پیمودن این راه مرا یاری نمودند، تشکر و قدردانی کنم. امیدوارم حاصل تلاش من، قطره ای هر چند ناچیز به دریای بیکران علم بیافزاید.

تشکر و قدردانی صمیمانه از استاد گرانقدرم سرکار خانم دکتر مقدم متین که در تمام طول کار، مهربانانه و با روی باز راه را برایم روشن می نمود، بزرگوارانه یاریم می کرد و با نکته سنجی و دقت خود، همواره فرصت اشتباه را از من می گرفت. به راستی که همراهی های گرم ایشان در طی انجام این پروژه، فراتر از تصور من بود.

سپاس از استاد ارزشمندم جناب آقای دکتر بهرامی که در نهایت تواضع، تجربیات گرانقدر خود را در اختیارم می گذاشت و عمیقاً عملکرد مرا باور داشت. رهنمودهای ارزنده ایشان در طول راه، مسیر را برایم هموار می نمود و حمایت های بی دریغ شان همواره تکیه گاهی محکم و مایه اعتماد به نفس من بود.

سپاس از اساتید فرزانه، جناب آقای دکتر حداد و جناب آقای دکتر دهقانی که راهنمایی های ارزشمندشان در طی داوری این پایان نامه، روشنگر راهم بود.

تشکر ویژه از جناب آقای دکتر محمد مهدی اجتهادی و کادر فنی آزمایشگاه ایشان که در طول انجام این پروژه صمیمانه یاریم نمودند.

از سرکار خانم جوشنی، منشی محترم گروه زیست شناسی، و تمامی مسئولین و کارکنان محترم دانشکده علوم، به ویژه کتابخانه، امور رایانه، بخش اداری، آموزش و انتظامات کمال امتنان و سپاس را دارم.

و سپاس از دوستان ارزشمندم خانم ها زینب نشاطی، وجیهه نشاطی و فاطمه بهنام رسولی که از نخستین گامها تا واپسین لحظات انجام این پروژه، از سر لطف و محبت همراهم بودند و راهنمایی های دوستانه شان همواره مایه امید و دلگرمی من بود.

سپاس از همکاران عزیزم خانم ها رونقی، عتیقی و آقایان صباغی و مؤمنی به خاطر تمام محبت ها و حمایت هایشان و همچنین سایر دوستان و همکلاسی هایم به خاطر تمام فرزانگی هایشان.

مروارید ساعی نسب

اسفندماه ۱۳۸۸

بخشی از مراحل اجرایی این پروژه در آزمایشگاه تخصصی

پژوهشکده فناوری زیستی دانشگاه فردوسی مشهد

به انجام رسیده است.

فهرست اشکال VI
فهرست جداول IX
چکیده X

فصل اول: کلیات

۱-۱ پانکراس ۱
۱-۱-۱ آناتومی پانکراس ۱
۱-۱-۲ بافت پانکراس ۲
۱-۱-۳ تکامل پانکراس ۳
۱-۱-۴ مسیرهای سیگنالی دخیل در تکامل پانکراس ۴
۱-۱-۵ فاکتورهای رونویسی دخیل در تکامل پانکراس ۸
۱-۱-۶ تکثیر سلول های بتا ۱۳
۱-۱-۷ سنتز انسولین در سلول های بتا ۱۳
۱-۱-۸ پاسخ سلول های بتای پانکراسی به گلوکز ۱۵
۱-۲ دیابت ۱۷
۱-۲-۱ انواع دیابت ۱۷
۱-۲-۲ درمان دیابت ۱۹
۱-۳ سلول های بنیادی ۲۴
۱-۳-۱ انواع سلول های بنیادی بر اساس قابلیت تمایز ۲۴
۱-۳-۲ انواع سلول های بنیادی بر اساس منشأ ۲۵
۱-۴ منبعی جدید برای سلول درمانی ۲۶
۱-۵ پدیده ترمیم ۲۷
۱-۶ عوامل تمایز دهنده سلول های بنیادی به سلول های مولد انسولین ۳۱
۱-۷ زیست شناسی خرگوش ها ۳۸
۱-۸ اهداف پروژه ۳۸

فصل دوم: مواد و روش ها

۲-۱ مواد و وسایل مورد استفاده ۴۰
۲-۱-۱ مواد مورد استفاده ۴۰
۲-۱-۲ وسایل مورد استفاده ۴۲
۲-۲ تهیه مواد و محلول های مورد استفاده ۴۳
۲-۲-۱ استریل کردن وسایل ۴۳
۲-۲-۲ تهیه محیط کشت ذخیره DMEM ۴۳
۲-۲-۳ تهیه محیط کشت مورد استفاده ۴۴
۲-۲-۴ آماده سازی سرم جنینی گاو ۴۴
۲-۲-۵ تهیه محلول فسفات بافر سالین ۴۴
۲-۳ نحوه استخراج سلول های بلاستمایی ۴۵
۲-۳-۱ محل و شرایط نگهداری خرگوش ها ۴۵
۲-۳-۲ آماده سازی حیوانات و نحوه تهیه حلقه های بلاستمایی ۴۵
۲-۳-۳ استخراج سلول های بلاستمایی ۴۷
۲-۳-۳-۱ مقایسه روند ترمیم در گوش خرگوش سفید نژاد نیوزلندی و نژاد بومی همزمان با مقایسه روند ریزش سلولی از حلقه های حاصل ۴۷
۲-۳-۳-۲ مقایسه مورفولوژی سلول های حاصل از حلقه های گوش خرگوش های سفید نژاد نیوزلندی و نژاد بومی ۴۸
۲-۴ نگهداری و کشت سلول ها ۴۸
۲-۴-۱ شرایط نگهداری سلول های بلاستمایی نیوزلندی و بلاستمایی بومی ۴۸
۲-۴-۲ کشت سلول های بلاستمایی نیوزلندی و بومی ۴۸
۲-۴-۲-۱ تعویض محیط کشت سلول ها ۴۸
۲-۴-۲-۲ تعیین درصد FBS مناسب جهت رشد و تکثیر سلول های بلاستمایی نیوزلندی ۴۹
۲-۴-۲-۳ پاساژ سلول های بلاستمایی نیوزلندی و بومی ۴۹
۲-۴-۲-۴ بررسی قابلیت پاساژ سلول های بلاستمایی نیوزلندی ۵۰
۲-۴-۲-۵ مقایسه مورفولوژی سلول های بلاستمایی نیوزلندی در پاساژهای مختلف ۵۱
۲-۴-۲-۶ بررسی قابلیت انجماد سلول های بلاستمایی نیوزلندی ۵۱
۲-۴-۲-۷ بررسی قابلیت خارج شدن سلول های بلاستمایی نیوزلندی از انجماد ۵۲

۲-۴-۲-۸ مقایسه قابلیت خارج شدن از انجماد سلول های بلاستمایی نیوزلندی و بلاستمایی بومی ۵۲
۲-۴-۳ کشت سلول های بلاستمایی نیوزلندی در پلیت های ۶ خانه ای ۵۲
۲-۵ القاء تمایز در سلول های بلاستمایی نیوزلندی به سمت سلول های مولد انسولین ۵۳
۲-۵-۱ تهیه محلول مورد نیاز برای تمایز سلول های بلاستمایی نیوزلندی به سلول های مولد انسولین ۵۳
۲-۵-۱-۱ تهیه محیط کشت فاقد سرم با غلظت بالای گلوکز (۲۵ mM) ۵۳
۲-۵-۱-۲ تهیه محلول ذخیره نیکوتین آمید ۵۴
۲-۵-۱-۳ تهیه محلول ذخیره بتامرکاپتواتانول ۵۴
۲-۵-۲ قراردادن سلول های بلاستمایی نیوزلندی در معرض مواد القاء کننده تمایز به سمت سلول های مولد انسولین ۵۵
۲-۶ بررسی تمایز سلول های بلاستمایی نیوزلندی به سلول های مولد انسولین ۵۵
۲-۶-۱ بررسی مورفولوژیکی ۵۵
۲-۶-۲ رنگ آمیزی اختصاصی با دیتیزون ۵۵
۲-۶-۳ رنگ آمیزی سلول ها با رنگ گیمسا ۵۶
۲-۶-۴ اندازه گیری میزان انسولین ترشح شده از سلول های تحت تیمار ۵۶
۲-۶-۵ مقایسه قابلیت تمایز سلول های بلاستمایی نیوزلندی در پاساژهای مختلف ۵۷
۲-۶-۶ اندازه گیری مقدار انسولین ترشح شده توسط سلول های بلاستمایی نیوزلندی تحت تیمار در پاسخ به غلظت های مختلف گلوکز ۵۷
۲-۶-۷ مقایسه قابلیت تمایزی سلول های بلاستمایی نیوزلندی و بلاستمایی بومی ۵۷
۲-۶-۸ تعیین اثر bFGF در تمایز سلول های بلاستمایی نیوزلندی ۵۸
۲-۷ بررسی بیان ژن *insulin* با استفاده از روش RT-PCR ۵۸
۲-۷-۱ آماده سازی وسایل و مواد مورد استفاده ۵۸
۲-۷-۱-۱ استریل کردن وسایل مورد استفاده ۵۸
۲-۷-۱-۲ تهیه آب عاری از RNase ۵۹
۲-۷-۲ استخراج RNA تام ۵۹
۲-۷-۲-۱ روش استخراج RNA تام از سلول های بلاستمایی نیوزلندی کنترل و تست ۵۹
۲-۷-۲-۲ روش استخراج RNA تام از بافت پانکراس رت ۶۰

۲-۷-۲-۳ نگهداری RNA ۶۲
۲-۷-۲-۴ تعیین غلظت RNA استخراج شده ۶۲
۲-۷-۳ انجام واکنش رونویسی معکوس ۶۲
۲-۷-۴ انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز ۶۳
۲-۷-۴-۱ آغازگرها ۶۳
۲-۷-۴-۲ انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) بر روی cDNA حاصل ۶۴
۲-۷-۵ الکتروفورز محصول نهایی ۶۵
۲-۷-۵-۱ تهیه محلول های مورد نیاز در الکتروفورز ۶۵
۲-۷-۵-۲ تهیه ژل آگارز ۱/۲٪ ۶۶
۲-۷-۵-۳ بارگذاری DNA ۶۶

فصل سوم: نتایج

۳-۱ نتایج کشت سلول ۶۸
۳-۱-۱ مقایسه روند ترمیم در گوش خرگوش های سفید نژاد نیوزلندی و نژاد بومی ۶۸
۳-۱-۲ مقایسه روند ریزش سلول از حلقه های حاصل از لاله گوش خرگوش های نژاد نیوزلندی و بومی ۶۹
۳-۱-۳ تعیین درصد FBS مناسب جهت رشد و تکثیر سلول های بلاستمایی نیوزلندی ۷۱
۳-۱-۴ بررسی قابلیت پاساژ سلول های بلاستمایی نیوزلندی ۷۲
۳-۱-۵ مقایسه مورفولوژی سلول های بلاستمایی نیوزلندی در پاساژهای مختلف ۷۳
۳-۱-۶ بررسی قابلیت انجماد و خروج از انجماد سلول های بلاستمایی نیوزلندی ۷۵
۳-۱-۷ مقایسه قابلیت خروج از انجماد سلول های بلاستمایی نیوزلندی و بومی ۷۵
۳-۲ تمایز سلول های بلاستمایی نیوزلندی به سلول های مولد انسولین ۷۶
۳-۲-۱ بررسی مورفولوژیکی ۷۶
۳-۲-۲ رنگ آمیزی اختصاصی با دیتیزون ۷۸
۳-۲-۳ رنگ آمیزی سلول ها با رنگ گیمسا ۸۲
۳-۲-۴ اندازه گیری میزان انسولین ترشح شده در سلول های تحت تیمار ۸۴
۳-۲-۵ مقایسه قابلیت تمایز سلول های بلاستمایی نیوزلندی در پاساژهای مختلف ۸۵

۳-۲-۶ مقایسه مقدار انسولین ترشح شده از سلول های تحت تیمار در پاسخ به غلظت هـای مختلـف گلوکز ۸۶
۳-۲-۷ مقایسه قابلیت تمایزی سلول های بلاستمایی نیوزلندی و بلاستمایی بومی ۸۷
۳-۲-۸ نتایج حاصل از تأثیر bFGF در تمایز سلول های بلاستمایی نیوزلندی به سـلول هـای مولـد انسولین ۹۱
۳-۳ بررسی بیان ژن *insulin* در سلول های تمایز یافته ۹۲
۳-۳-۱ نتایج حاصل از تعیین غلظت و خلوص RNA استخراج شده ۹۲
۳-۳-۲ نتایج حاصل از PCR برای بررسی بیان ژن *insulin* ۹۲

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

۴-۱ مقدمه ۹۳
۴-۲ اهداف پروژه ۹۴
۴-۳ خصوصیات سلول های بنیادی جنینی ۹۷
۴-۴ تولید سلول های مولد انسولین از سلول های بنیادی ۹۸
۴-۵ عوامل تمایز دهنده سلول های بنیادی به سلول های مولد انسولین ۹۹
۴-۶ تشابه سلول های بلاستمایی نیوزلندی با سلول های بنیادی ۱۰۶
۴-۷ قابلیت تمایز سلول های بلاستمایی نیوزلندی به سلول های مولد انسولین ۱۰۷
۴-۸ نتیجه گیری ۱۱۲
۴-۹ پیشنهادات ۱۱۳

منابع ۱۱۵

فصل اول

شکل ۱-۱ موقعیت آناتومیکی پانکراس و بخش های مختلف آن ۱
شکل ۱-۲ تصویر شماتیک مقطع عرضی از پانکراس ۳
شکل ۱-۳ فاکتورهای رونویسی دخیل در ایجاد سلول های بتا ۸
شکل ۱-۴ بیوسنتز انسولین از پری پرو انسولین و پرو انسولین ۱۴
شکل ۱-۵ اجزاء دخیل در پاسخ به غلظت گلوکز محیطی در سلول های بتا ۱۶
شکل ۱-۶ مکانیسم عمل ملکول های شیمیایی در تبدیل سلول های بنیادی به سلول های مولد انسولین ۳۲

فصل دوم

شکل ۲-۱ نحوه پانچ نمودن لاله گوش خرگوش ۴۵
شکل ۲-۲ نمونه ای از حلقه بافتی پانچ شده از لاله گوش خرگوش ۴۶

فصل سوم

شکل ۳-۱ روند بسته شدن سوراخ های لاله گوش خرگوش های نیوزلندی و بومی (پانچ شماره ۱) ۶۹
شکل ۳-۲ روند بسته شدن سوراخ های لاله گوش خرگوش های نیوزلندی و بومی (پانچ شماره ۲) ۶۹
شکل ۳-۳ سلول های ریزش یافته از حلقه های حاصل از گوش خرگوش سفید نژاد نیوزلندی در پاساژ صفر ۷۰
شکل ۳-۴ سلول های ریزش یافته از حلقه های حاصل از گوش خرگوش بومی در پاساژ صفر ۷۰
شکل ۳-۵ تغییرات تعداد سلول های بلاستمایی نیوزلندی و منحنی رشد آن ها پس از ۲، ۴ و ۶ روز کشت در غلظت های مختلف FBS ۷۲
شکل ۳-۶ تصویر گرفته شده از سلول های بلاستمایی نیوزلندی با استفاده از میکروسکوپ معکوس در پاساژ ۵ ..... ۷۳
شکل ۳-۷ تصویر گرفته شده از سلول های بلاستمایی نیوزلندی با استفاده از میکروسکوپ فاز متضاد در پاساژ ۵. ۷۳
شکل ۳-۸ تصاویر مربوط به سلول های بلاستمایی نیوزلندی در پاساژهای مختلف ۷۴
شکل ۳-۹ تصویر سلول های بلاستمایی ۳ روز پس از خروج از انجماد ۷۵
شکل ۳-۱۰ مورفولوژی سلول های بلاستمایی نیوزلندی و بومی پس از خروج از انجماد ۷۶
شکل ۳-۱۱ مورفولوژی سلول های بلاستمایی نیوزلندی کنترل (تیمار نشده) در پاساژ ۵ ..... ۷۷
شکل ۳-۱۲ تغییر مورفولوژی سلول های بلاستمایی نیوزلندی (پاساژ ۵)، ۴ روز پس از تأثیر تیمار با غلظت بالای گلوکز، نیکوتین آمید و بتا مرکاپتواتانول در محیط فاقد سرم ۷۷
شکل ۳-۱۳ رنگ آمیزی سلول های بلاستمایی نیوزلندی کنترل (تیمار نشده) با DTZ ۷۹

شکل ۳-۱۴ رنگ آمیزی سلول های بلاستمایی نیوزلندی با DTZ و تغییر مورفولوژی آنها پس از ۲ روز تیمار با غلظت بالای گلوکز، نیکوتین آمید و بتا مرکاپتواتانول در محیط فاقد سرم ۷۹
شکل ۳-۱۵ رنگ آمیزی سلول های بلاستمایی نیوزلندی با DTZ و تغییر مورفولوژی آنها پس از ۴ روز تیمار با غلظت بالای گلوکز، نیکوتین آمید و بتا مرکاپتواتانول در محیط فاقد سرم ۷۹
شکل ۳-۱۶ رنگ آمیزی سلول های بلاستمایی نیوزلندی کنترل (تیمار نشده) با DTZ ۸۰
شکل ۳-۱۷ رنگ آمیزی سلول های بلاستمایی نیوزلندی با DTZ و تغییر مورفولوژی آنها پس از ۷ روز تیمار با غلظت بالای گلوکز، نیکوتین آمید و بتا مرکاپتواتانول در محیط فاقد سرم..... ۸۰
شکل ۳-۱۸ رنگ آمیزی سلول های بلاستمایی نیوزلندی با DTZ و تغییر مورفولوژی آنها پس از ۱۴ روز تیمار با غلظت بالای گلوکز، نیکوتین آمید و بتا مرکاپتواتانول در محیط فاقد سرم ۸۰
شکل ۳-۱۹ رنگ آمیزی سلول های بلاستمایی نیوزلندی با DTZ و تغییر مورفولوژی آنها پس از ۲۱ روز تیمار با غلظت بالای گلوکز، نیکوتین آمید و بتا مرکاپتواتانول در محیط فاقد سرم..... ۸۱
شکل ۳-۲۰ رنگ آمیزی سلول های بلاستمایی نیوزلندی با DTZ و تغییر مورفولوژی آنها پس از ۲۸ روز تیمار با غلظت بالای گلوکز، نیکوتین آمید و بتا مرکاپتواتانول در محیط فاقد سرم..... ۸۱
شکل ۳-۲۱ رنگ آمیزی محیط کشت سلول های بلاستمایی نیوزلندی تیمار شده با رنگ DTZ در روز دوم تمایز (بزرگنمایی X ۲۰) ۸۲
شکل ۳-۲۲ رنگ آمیزی محیط کشت سلول های بلاستمایی نیوزلندی تیمار شده با رنگ DTZ در روز دوم تمایز (بزرگنمایی X ۴۰) ۸۲
شکل ۳-۲۳ رنگ آمیزی سلول های بلاستمایی نیوزلندی کنترل (تیمار نشده) با رنگ گیمسا..... ۸۳
شکل ۳-۲۴ رنگ آمیزی سلول های بلاستمایی نیوزلندی با رنگ گیمسا ۱۴ روز پس از تیمار با مواد القاء کننده .. ۸۳
شکل ۳-۲۵ رنگ آمیزی سلول های بلاستمایی نیوزلندی با رنگ گیمسا ۲۱ روز پس از تیمار با مواد القاء کننده .. ۸۳
شکل ۳-۲۶ رنگ آمیزی سلول های بلاستمایی نیوزلندی با رنگ گیمسا ۲۸ روز پس از تیمار با مواد القاء کننده. ۸۴
شکل ۳-۲۷ تغییرات میزان انسولین موجود در محیط کشت سلول های کنترل و تست در روزهای مختلف..... ۸۵
شکل ۳-۲۸ میزان انسولین ترشح شده از سلول های پاساژ ۵، ۲۰ و ۳۵ در روز ششم تیمار..... ۸۶
شکل ۳-۲۹ میزان انسولین ترشح شده در پاسخ به غلظت های مختلف گلوکز در روز ششم تیمار..... ۸۷
شکل ۳-۳۰ میزان انسولین ترشح شده از سلول های بلاستمایی نیوزلندی و بلاستمایی بومی در روز ششم تیمار.. ۸۸
شکل ۳-۳۱ مورفولوژی سلول های بلاستمایی نیوزلندی کنترل (تیمار نشده) پس از رنگ آمیزی با DTZ..... ۸۹
شکل ۳-۳۲ مورفولوژی سلول های بلاستمایی بومی کنترل (تیمار نشده) پس از رنگ آمیزی با DTZ..... ۸۹
شکل ۳-۳۳ مورفولوژی سلول های بلاستمایی نیوزلندی تحت تیمار در روز ششم تمایز پس از رنگ آمیزی با DTZ ۹۰
شکل ۳-۳۴ مورفولوژی سلول های بلاستمایی بومی تحت تیمار در روز ششم تمایز پس از رنگ آمیزی با DTZ.. ۹۰

شکل ۳-۳۵ میزان انسولین تولید شده در مجاورت غلظت های مختلف bFGF در روز ششم تیمار ۹۱
شکل ۳-۳۶ باندهای حاصل از RT-PCR برای ژن های بتا اکتین و انسولین ۹۲

فصل چهارم

شکل ۴-۱: نتایج حاصل از آزمایشات Shirio و همکارانش در سال ۲۰۰۵ ..... ۱۰۱
شکل ۴-۲: تغییرات مورفولوژیکی سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان افراد دیابتی در طول روند تمایز از روز صفر تا ۱۸ ..... ۱۰۴

فصل اول

جدول ۱-۱ رده بندی خرگوش سفید نژاد نیوزلندی ۳۸

فصل دوم

جدول ۲-۱ ترکیبات لازم جهت انجام واکنش رونویسی معکوس..... ۶۲
جدول ۲-۲ مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای ژن های *insulin* و *β-actin*..... ۶۳
جدول ۲-۳ ترکیبات لازم جهت انجام واکنش PCR..... ۶۴
جدول ۲-۴ برنامه زمانی PCR برای ژن *β-actin*..... ۶۵
جدول ۲-۵ برنامه زمانی PCR برای ژن *insulin*..... ۶۵

فصل سوم

جدول ۳-۱ درصد سطوح بازسازی نشده، بعد از ایجاد زخم در لاله گوش خرگوش های نیوزلندی و بومی (پـانچ شـماره ۱) ۶۸
جدول ۳-۲ درصد سطوح بازسازی نشده، بعد از ایجاد زخم در لاله گوش خرگوش های نیوزلندی و بومی (پـانچ شـماره ۲) ۶۸
جدول ۳-۳ میانگین تعداد سلول های بلاستمایی تکثیر یافته در غلظت های مختلف FBS..... ۷۱
جدول ۳-۴ میزان انسولین موجود در محیط کشت سلول های کنترل و تحت تیمار در روزهای مختلف بر حسب µIU/ml ۸۴
جدول ۳-۵ غلظت RNA استخراج شده از سلول های کنترل و تست بر حسب ng/ µl..... ۹۲

چکیده

دیابت شیرین یک بیماری شایع در جوامع انسانی بوده و تعداد مبتلایان به آن همه ساله در حال افزایش است. این بیماری که سبب اختلال در متابولیسم مواد غذایی می گردد، به علت عدم ترشح مقدار لازم انسولین و یا مقاومت سلول های بافت هایی همچون کبد، عضله و چربی به انسولین ایجاد می شود. درمان هایی که در حال حاضر به کار می روند، سبب درمان قطعی دیابت نمی گردند. به همین دلیل یافتن راهی برای درمان همیشگی این بیماری امری ضروری به نظر می رسد. در همین راستا امروزه توجه بسیاری از محققین به سلول درمانی و استفاده از سلول های بنیادی معطوف گشته است. اما وجود برخی مشکلات از جمله عدم دسترسی آسان به این سلول ها، روش های پرهزینه استخراج و نیز کارآیی پایین آن ها در تمایز به سلول های مورد نظر، سبب شده تا دانشمندان به دنبال یافتن منابع سلولی جدید باشند. در این راستا پدیده ترمیم که در برخی از جانوران رخ می دهد، بسیار مورد توجه واقع شده است. زیرا اتفاق نظر بر این است که طی این پدیده، بافتی به نام بلاستما ایجاد می شود که دارای سلول هایی تمایز نیافته با ویژگی های سلول های جنینی می باشد. در این پژوهش سلول های حاصل از زخم گوش خرگوش های نژاد نیوزلندی و بومی مورد مطالعه قرار گرفته و برخی از ویژگی های سلولی آن ها با هم مقایسه شد. با توجه به قابلیت های بالای سلول های حاصل از گوش خرگوش سفید نژاد نیوزلندی، از آن ها جهت تمایز به سلول های مولد انسولین استفاده گردید. بدین منظور سلول ها در مجاورت محیط فاقد سرم با غلظت بالای گلوکز که حاوی نیکوتین آمید و بتامرکاپتواتانول بود، قرار گرفتند. اثبات تمایز این سلول ها با استفاده از بررسی های مورفولوژیکی، رنگ آمیزی اختصاصی با دیتیزون، رنگ آمیزی گیمسا و نیز اندازه گیری انسولین تولید شده توسط این سلول ها به اثبات رسید. از سوی دیگر قابلیت تمایزی این سلول ها با سلول های حاصل از گوش خرگوش بومی توسط رنگ آمیزی اختصاصی و اندازه گیری انسولین تولید شده توسط این سلول ها مورد مقایسه قرار گرفت. در آخرین مرحله نیز بیان ژن انسولین با استفاده از روش RT-PCR ارزیابی شد.

تمامی نتایج به دست آمده، از جمله تولید ساختارهای شبه جزیره ای، رنگ پذیری توسط DTZ، افزایش غلظت انسولین در محیط کشت و اثبات بیان mRNA ژن انسولین توسط سلول های القاء شده، نشان از قابلیت تمایز بالای این سلول ها به سلول های مولد انسولین داشت.

در مجموع می توان گفت اگر چه سلول های بلاستمایی هنوز به طور کامل تعیین هویت نشده و قابلیت های تمایزی آن ها به طور کامل روشن نیست، اما نتایج حاصل، امید بخش یافتن منابع سلولی جدید با خواص بنیادی و قابلیت تمایز بالا به سلول های مولد انسولین است تا شاید بتوان از آن ها جهت سلول درمانی استفاده کرد.

کلمات کلیدی: دیابت، سلول های بلاستمایی، تمایز، سلول های مولد انسولین

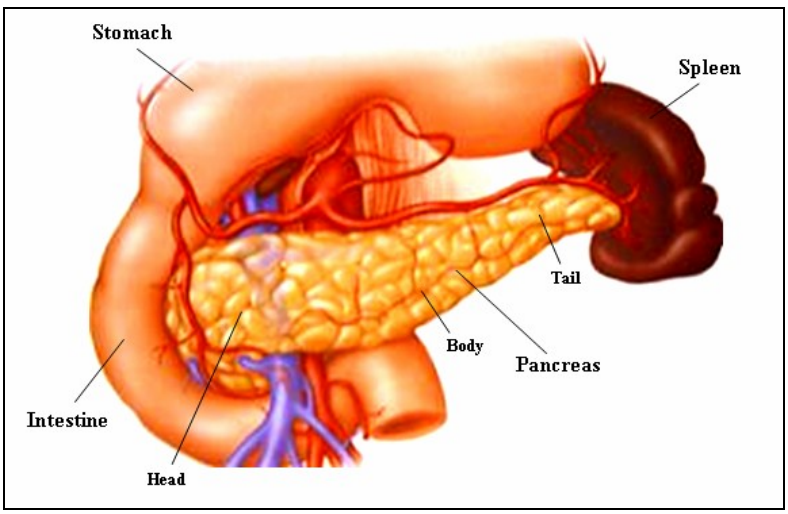
فصل اول

کلیات

۱-۱ پانکراس

۱-۱-۱ آناتومی پانکراس

پانکراس یا لوزالمعده یک عضو ترشحی بزرگ است که به موازات معده و در زیر آن قرار گرفته است. این عضو از نظر آناتومی به سه بخش سر، تنه و دم تقسیم شده که قسمت سر در مجاورت دوازدهه واقع شده و بخش انتهایی آن نیز با طحال در ارتباط است. این غده از خارج توسط یک لایه بافت همبند نازک پوشیده شده است که استطاله هایی از آن به درون پانکراس وارد شده و آن را به لوبول های مشخصی تقسیم می کند. ساختمان داخلی این غده مشابه غدد بزاقی بوده و به دو بخش اصلی برون ریز[1] و درون ریز[2] تقسیم می گردد. بخش برون ریز شامل آسینی ها و مجاری است که وظیفه اصلی آن ها ترشح آنزیم های گوارشی و بیکربنات می باشد. آنزیم های گوارشی به هضم مواد غذایی (کربوهیدرات ها، چربی ها و پروتئین ها) کمک نموده و محلول بیکربنات نیز محیط دوازدهه را پس از ورود اسید معده، خنثی می کند. قسمت درون ریز پانکراس نیز از جزایر لانگرهانس تشکیل شده که در سرتاسر پانکراس به صورت توده های سلولی گرد نامنظم پراکنده هستند. سلول های این قسمت هورمون هایی همچون انسولین، گلوکاگون و سوماتوستاتین را تولید نموده و در موقع لزوم آن ها را به گردش خون وارد می کنند (Guyton and Hall, 2006). در شکل ۱-۱ موقعیت آناتومیکی پانکراس نسبت به سایر اندام ها و همچنین بخش های مختلف آن مشاهده می گردد.



شکل ۱-۱ موقعیت آناتومیکی پانکراس و بخش های مختلف آن (http://www.bcm.edu/cms_web/260).

[1] exocrine
[2] endocrine

۱-۱-۲ بافت پانکراس

همان طور که عنوان شد پانکراس بالغ، از بافت اگزوکرین (سلول های آسینی، مجاری) و بافت اندوکرین تشکیل شده است که بافت اگزوکرین ۹۵٪ و بافت اندوکرین ۵٪ از آن را به خود اختصاص می دهند (Nir and Dor, 2005).

با استفاده از آنالیزهای دودمانی[1]، ۵ نوع سلول اصلی در پانکراس بالغ مشاهده شده است که هر یک دارای مارکرهای خاصی می باشند:

۱- سلول های اگزوکرین (دارای مارکر اختصاصی آمیلاز).

۲- سلول های مجاری[2] (دارای مارکر CK19[3]).

۳- سلول های اندوکرین (بیان کننده مارکرهای انسولین، گلوکاگون، سوماتوستاتین و پلی پپتید پانکراسی).

۴- سلول های عروقی[4] (دارای مارکر معروف PECAM[5]).

۵- سلول های مزانشیمی (دارای دو مارکر Nestin و Vimentin) (Wang, *et al*., 2004a).

مطالعات نشان داده است که جوانه های پانکراسی با ایجاد انشعاباتی سبب تولید مجاری و تشکیلات آسینی در غده پانکراس می گردند. همچنین گروهی از سلول های تمایز یافته که از پیش سازهای اندوکرینی ایجاد شده اند، تجمع یافته و جزایر لانگرهانس را تشکیل می دهند (Trucco, 2005). درون این جزایر سلول های مختلفی وجود دارند که هر کدام پروتئین خاصی را ترشح می کنند. تقریباً ۸۰٪ از این سلول ها، سلول های بتا هستند که ترشح کننده انسولین بوده و بنابراین در تنظیم قند خون نقش دارند. دیگر سلول های موجود در جزایر لانگرهانس شامل سلول های آلفا (ترشح کننده گلوکاگون)، سلول های دلتا (ترشح کننده سوماتوستاتین) و سلول های PP یا گاما (ترشح کننده پلی پپتید پانکراسی) می باشند (Nir and Dor, 2005).

شکل ۱-۲ بافت های مختلف پانکراس را نشان می دهد:

---

[1] Lineage analysis
[2] duct
[3] Cytokeratin 19
[4] Vascular Cells
[5] Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1