

کلیات مصور

مسئول‌های بنیادی مزانشیمی از جداسازی تا بهره‌وری

(به انضمام جنبه‌های روش‌ها و دستورالعمل‌ها)

تالیف

دکتر راحله فرحزادی

استادیار و عضو هیأت علمی
دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دکتر عزت‌اله فتحی

دانشیار و عضو هیأت علمی دانشگاه
تبریز

- سرشناسه : فتحی، عزت‌اله، ۱۳۵۳ -
- عنوان و نام پدیدآور : کلیات مصور: سلول‌های بنیادی مزانشیمی از جداسازی تا بهره‌وری
- (به انضمام جدیدترین روش‌ها و دستورالعمل‌ها) // تالیف عزت‌اله فتحی، راحله فرحزادی.
- مشخصات نشر : تهران: سازمان جهاد دانشگاهی تهران، انتشارات، ۱۳۹۸.
- مشخصات ظاهری : ۱۸۲ص: مصور، نمودار.
- شابک : ۹۷۸-۶۰۰-۱۳۳-۴۲۹-۰ -
- وضعیت فهرست نویسی : فیبا
- یادداشت : واژه‌نامه.
- یادداشت : کتابنامه.
- موضوع : یاخته‌های بنیادی مزانشیمال
- موضوع : Mesenchymal stem cells
- شماره افزه : فرحزادی، راحله، ۱۳۶۳ -
- نشان زوده : سازمان جهاد دانشگاهی تهران. انتشارات
- رده بنده کنگره : QH ۵۵۸
- رده بندی دیو : ۶۱۶/۰۲۷۷۴
- شماره کتابشناسی : ۵۷۱۰۴۶۱



- ♦ نام کتاب: کلیات مصور: سلول‌های بنیادی مزانشیمی از جداسازی تا بهره‌وری
- ♦ تالیف: عزت‌اله فتحی - راحله فرحزادی
- ♦ ناشر: انتشارات سازمان جهاد دانشگاهی تهران
- ♦ ناظر چاپ: احمد آرش
- ♦ طراح جلد: سعید صحابی
- ♦ صفحه‌آرا: قاسم ()
- ♦ لیتوگرافی: زاویه نور
- ♦ چاپ و صحافی: راهین
- ♦ قیمت: ۴۰۰۰۰۰ ریال
- ♦ شمارگان: ۱۰۰ نسخه

- ♦ نوبت چاپ: اول - پاییز ۱۳۹۸
- ♦ شابک: ۹۷۸-۶۰۰-۱۳۳-۴۲۹-۰
- ISBN: 978-600-133-429-0
- ♦ نشانی: تهران - صندوق پستی ۱۸۶ - ۱۳۱۴۵
- ♦ تلفن: ۶۶۹۵۴۳۶۸ تلفکس: ۶۶۴۶۴۹۴۱
- ♦ تلفن مراکز پخش: ۶۶۹۵۵۷۵۳-۶۶۹۵۴۳۶۸
- ♦ خانه کتاب دانشگاه: ۶۶۹۷۳۴۲۳
- ♦ www.jahat.ir
- ♦ nashr.jutt@gmail.com

این اثر، مشمول قانون حمایت مولفان، مصنفان و هنرمندان مصوب ۱۳۴۸ است. هرکس تمام یا قسمتی از این اثر را بدون اجازه مولف یا ناشر تکثیر و کپی‌برداری کند، مورد پیگرد قانونی قرار خواهد گرفت.

فهرست مطالب

مقدمه ناشر.....	۵
پیشگفتار.....	۱۵
فصل اول / مقدمه.....	۱۷
۱- مفاهیم بنیادین.....	۱۷
۲- مبانی طبقه‌بندی سلول‌های بنیادی.....	۱۸
۱-۲- براساس حضور آنزیم‌ها در شرایط تکاملی یا منشاء.....	۱۹
۲-۲- براساس مکان استقرار.....	۲۵
۳-۲- براساس توانایی تمایز.....	۳۵
فصل ۲ / ابزارهای جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی رنشیمی.....	۳۷
۱- ملزومات اولیه کار با سلول‌های بنیادی رنانشیمی.....	۳۷
۱-۲- مواد مورد نیاز جهت تهیه الیتر محیط کشت.....	۳۷
۲- طراحی آزمایشگاه کشت سلولی.....	۳۸
۳- در اتاق کشت.....	۳۹
۴- تجهیزات آزمایشگاه کشت سلولی.....	۴۰
الف: انکوباتور CO_2	۴۰
ب: سانتریفوژ.....	۴۱
ج: میکروسکوپ‌ها.....	۴۱
چ: هود لامینار.....	۴۲
۵- شمارش سلولی.....	۴۳
۶- پاساژ دادن تیره‌های سلولی چسبان.....	۴۴

- ۴۴..... ۷- تریپسین
- ۴۴..... ۸- اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA)
- ۴۷..... فصل ۳ / منابع جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی
- ۴۷..... ۱- تاریخچه
- ۴۸..... ۲- روش‌ها
- ۴۸..... ۳- بافت چربی
- ۵۲..... ۴- جداسازی، استخراج و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی
- ۵۳..... ۵- پاساژ سلول
- ۵۳..... ۶- فریز سلولی
- الف: جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی بالغ مشتق از چربی به صورت استفاده توأم از آنزیم‌های کلان‌آزوت‌ترپسین..... ۵۴
- ب: جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی بالغ مشتق از چربی با استفاده از روش اکسپلنت..... ۵۵
- ۵۵..... ۷- خون محیطی و مغز استخوان
- الف: جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان با استفاده از فایکول هایپیک..... ۵۶
- ب: جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان با استفاده از تعویض مداوم محیط کشت..... ۵۷
- ۵۹..... ۸- ارزیابی تمایز
- ۵۹..... ۹- جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف
- ۶۰..... ۱۰- جداسازی سلول‌های بنیادی خونساز از بند ناف (CD34⁺)
- ۶۲..... ۱۱- جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از پرده آمنیون
- ۶۳..... ۱۲- جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از ژله وارتن
- ۶۵..... ۱۳- جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از پالپ دندان

فصل ۴ / شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی	۶۷
۱- اهمیت شناسایی نشانگرهای سطحی	۶۷
۲- بررسی نشانگرهای سطح سلولی با روش فلوسیتومتری	۶۸
۱-۲- ملزومات و مراحل آماده سازی جهت انجام فلوسیتومتری	۶۹
۲-۲- مراحل انجام کار	۶۹
۳- بررسی نشانگرهای سطح سلولی با روش ایمنوسیتوشیمی	۷۰
۱-۳- ملزومات و مراحل اولیه جهت انجام تکنیک ایمنوسیتوشیمی	۷۰
۲-۳- طرز تهیه ۵۰۰ میلی لیتر محلول پارافمالدئید ۴ درصد	۷۰
۳-۳- مراحل انجام کار	۷۱
۴- نتایج استخراج، جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی بالغ مشتق از چربی در مدل حیوانی رت	۷۳
۵- شناسایی نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی بالغ مشتق از چربی در مدل حیوانی رت با روش ایمنوسیتوشیمی	۷۴
۶- تأیید نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی بالغ مشتق از چربی در مدل حیوانی رت با روش فلوسیتومتری	۷۷
۷- نتایج استخراج، جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در مدل حیوانی رت	۸۰
۸- شناسایی نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در مدل حیوانی رت با فلوسیتومتری	۸۲
۹- نتایج استخراج، جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی بالغ مشتق از چربی در انسان	۸۵
۱۰- شناسایی نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی بالغ مشتق از چربی در انسان با روش ایمنوسیتوشیمی و فلوسیتومتری	۸۷
۱۱- اهمیت انتخاب مدل حیوانی زیرافیش در تحقیقات سلول‌های بنیادی مزانشیمی	۹۵
۱۲- نتایج استخراج، جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی از قلب زیرافیش	۹۶

۱۳- شناسایی نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از قلب زبرافیش با

فلوسیتومتری ۹۹

۱۴- نتایج استخراج، جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی از کبد زبرافیش ۱۰۳

۱۵- شناسایی نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت کبد زبرافیش با روش

فلوسیتومتری ۱۰۵

فصل ۵ / تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۱۰۹

۵۱- پیت تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۱۰۹

- تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوان‌ساز ۱۱۰

الف: ترپسین کردن ۱۱۰

ب: سادریف ۱۱۱

پ: کاشت سلولی ۱۱۱

ج: تیمار با محیط تمایز به استخوان ۱۱۱

چ: بررسی استئوژنزیس ۱۱۱

۳- رنگ‌آمیزی آلیزارین رد-اس ۱۱۱

الف: خارج کردن محیط تمایز به استخوان و شستشوی سلول‌ها ۱۱۲

ب: فیکس سلول‌ها ۱۱۲

ج: شستشو و خشک شدن سلول‌ها ۱۱۲

چ: رنگ‌آمیزی ۱۱۲

ح: مشاهده با میکروسکوپ ۱۱۲

۴- رنگ‌آمیزی VON KOSA ۱۱۲

الف: خروج محیط تمایز به استخوان و شستشوی سلول‌ها ۱۱۳

ب: فیکس سلول‌ها ۱۱۳

ج: شستشو و خشک شدن سلول‌ها ۱۱۳

چ: رنگ‌آمیزی ۱۱۳

ح: فیکساسیون سلول‌ها با تیوسولفات سدیم ۵ درصد ۱۱۳

۱۱۳	خ: مشاهده با میکروسکوپ
۱۱۴	۵- تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های چربی ساز
۱۱۴	۶- رنگ آمیزی اوایل رد-ا
۱۱۵	الف: خروج محیط تمایز به چربی و شستشوی سلول‌ها
۱۱۵	ب: فیکس سلول‌ها
۱۱۵	ج: شستشو و خشک شدن سلول‌ها
۱۱۵	چ: رنگ آمیزی
۱۱۵	ح: مشاهده با میکروسکوپ
۱۱۵	۷- رنگ آمیزی سودان ۱۱
۱۱۶	۸- تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های غضروف ساز
۱۱۶	۹- رنگ آمیزی تولوئیدین بلو
۱۱۷	الف: خروج محیط تمایز به غضروف و شستشوی سلول‌ها
۱۱۷	ب: فیکس سلول‌ها
۱۱۷	ج: شستشو و خشک شدن سلول‌ها
۱۱۷	چ: رنگ آمیزی
۱۱۷	ح: مشاهده با میکروسکوپ
۱۱۷	۱۰- تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های نورونی
۱۱۸	۱۱- کرزول بنفش
۱۱۸	الف: خروج محیط تمایز به نورون و شستشوی سلول‌ها
۱۱۹	ب: فیکس سلول‌ها
۱۱۹	ج: شستشو و خشک شدن سلول‌ها
۱۱۹	چ: رنگ آمیزی
۱۱۹	ح: مشاهده با میکروسکوپ
۱۱۹	۱۲- بررسی توان تمایزی چندگانه سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از روش RT-PCR
۱۲۰	۱۳- استخراج RNA از سلول‌های بنیادی مزانشیمی

۱۴- بررسی کمی و کیفی RNA تام استخراج شده	۱۲۰
۱۵- بررسی کمی RNA تام استخراج شده با اسپکتروفتومتری	۱۲۱
۱۶- بررسی کیفی RNA تام با الکتروفورز ژل آگارز	۱۲۱
۱۷- تهیه cDNA	۱۲۲
۱۷-۱- مراحل تهیه cDNA	۱۲۳
۱۸- آماده سازی پرایمر جهت بررسی بیان ژن‌های تمایز یافته	۱۲۳
۱۹- نتایج مربوط به تمایز چندگانه سلول‌های بنیادی بالغ مشتق از چربی در مدل حیوانی رت	۱۲۴
۲۰- نتایج مربوط به تمایز چندگانه سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در مدل حیوانی رت	۱۲۶
۲۱- نتایج مربوط به تمایز چندگانه سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی در انسان	۱۲۷
۲۲- نتایج مربوط به تمایز چندگانه سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت قلب در مدل حیوانی زیرافیش	۱۲۹
۲۳- ارزیابی مولکولی روند تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مدل‌های مختلف	۱۳۲
فصل ۶ / پیری سلول‌های بنیادی مزانشیمی	۱۳۵
۱- مفهوم پیری	۱۳۵
۲- نشانگرهای پیری در سلول‌های بنیادی مزانشیمی	۱۳۶
۲-۱- ریخت شناسی	۱۳۶
۲-۲- تکثیر	۱۳۷
۲-۳- تمایز	۱۳۷
۲-۴- زمان دو برابر شدن- قابلیت تقسیم	۱۳۸
۲-۵- اندازه کلونی	۱۳۸
۲-۶- سرعت رشد	۱۳۹
۲-۷- تلومر	۱۳۹

۳- فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز به عنوان یکی از نشانگرهای پیری در شرایط برون تنی ۱۴۱

۴- رنگ آمیزی بتاگالاکتوزیداز جهت بررسی پیری سلول های بنیادی مزانشیمی ۱۴۲

۵- ملزومات انجام رنگ آمیزی ۱۴۲

فصل ۷ / ضرورت تحقیق و پژوهش و کاربرد بالینی سلول های بنیادی مزانشیمی ۲۵

۱- تحقیقات پیش رو ۱۴۵

۲- دستاوردهای پژوهشگاه رویان ۱۴۶

۳- لزوم استفاده از سلول های بنیادی مزانشیمی در تحقیقات بالینی ۱۴۷

۴- ویژگی های حاد اقلی، مزاد های بنیادی مزانشیمی در کاربردهای بالینی ۱۴۸

۵- قابلیت تمایز و خودنوشت سلول های بنیادی مزانشیمی ۱۵۰

۶- نقش سلول های بنیادی مزانشیمی در تنظیم سیستم ایمنی ۱۵۱

۷- توانایی مهاجرت ۱۵۳

۸- بیماری های غضروفی و استخوانی ۱۵۴

۹- پیوند مغز استخوان و بیماری های متعاقب استخوان ۱۵۶

۱۰- بیماری های قلبی - عروقی ۱۵۷

۱۱- بیماری های اتوایمیون ۱۵۸

۱۲- بیماری های کبدی ۱۶۱

۱۳- سرطان ۱۶۲

۱۴- نتیجه گیری، چالش ها و چشم اندازها ۱۶۳

منابع ۱۶۵

منابع فارسی ۱۶۵

منابع انگلیسی ۱۶۷

پیشگفتار

کتابی که در اختیار دارید حاصل تلاش چندین ساله مؤلفین در جمع‌آوری و ثبت اطلاعات با ارزش در زمینه تحقیقات سلول‌های بنیادی است. بسیاری از آثار ثبت شده مؤلفین کتاب در این حوزه در مجلات بین‌المللی معتبره چاپ رسیده است و همه این منابع همانند سایر منابعی که در تألیف این کتاب مورد استفاده قرار گرفته‌اند، در انتهای کتاب گنجانده شده است. تحقیقات در زمینه سلول‌های بنیادی بیشینه خیلی درازی نداشته و جزو علوم نوپا محسوب می‌شود و همین امر باعث جذابیت و بهیاری از محققین و دانشمندان گشته است.

لغت سلول بنیادی برای اولین بار حدردن یک زن بهش جهت تشریح فرضیه‌ایی مبنی بر باز تولید سلول‌های خونی در بدن توسط یک دانشمند آمریکایی در مجامع علمی مطرح شد. مهمترین هدف در کاربرد فناوری سلول‌های بنیادی به غیر از تولید و پرورش محصولات تراریخته، سلول درمانی و در حقیقت درمان بیماری‌های مختلفی است که بشر را از آن‌ها رنج می‌برد. تحقیقات اصلی و هدفمند در جهان نیز به دهه ۸۰ میلادی بر می‌گردد. در کشور عزیزمان نیز در زمینه سلول‌های بنیادی فعالیت‌های بسیار و قابل توجهی در مراکز مختلف تحقیقاتی و پژوهشگاه‌ها بخصوص پژوهشگاه رویان انجام گرفته و یا در حال انجام است بطوری‌که هم‌اکنون جمهوری اسلامی ایران جایگاه شایسته و نقش بسیار پررنگی در تولیدات علمی در این زمینه داراست و خداوند را شاکریم که این فرصت را به ما ارزانی کرد تا با آثار هر چند اندک خود گامی کوچک در راه رشد و نشر دستاوردهای علمی کشور برداریم، باشد که با یاری خداوند منان و با تلاش و همت اندیشمندان، نویسندگان و متخصصان مؤمن و متعهد بتوانیم در اعتلاء علمی کشور عزیزمان ایران سهمی داشته باشیم.

در نگارش این کتاب ضمن گنجاندن اشکالی مصور و گویا که حاصل مطالعات و نتایج پژوهشی چندین ساله خود مؤلفین می‌باشد، در رابطه با کلیات، مفاهیم و اصول کلی کار با سلول‌های بنیادی مزانشیمی بیشتر پرداخته شده و تلاش گردیده است تا مخاطبین ضمن

آشنایی نسبت به ضرورت تحقیق و پژوهش در خصوص سلول‌های بنیادی، ابزارهای جداسازی و کشت، با پروتوکول‌های مختلف از جداسازی گرفته تا شناسایی، تمایز، کاربرد بالینی و بهره‌وری آن‌ها نیز به صورت محتوایی آشنا شوند که مطالعه آن قطعاً برای دانشجویان و محققینی که در دانشگاه‌ها، آزمایشگاه‌ها و مراکز مختلف تحقیقاتی در این زمینه فعالیت مستقیم دارند در جهت نیل به اهداف شان مثمرثمر خواهد بود، ضمن اینکه توصیه می‌شود در کنار آن جهت درک مباحث مربوط به سایر مکانیسم‌های مولکولی دخیل در هریک از مباحث موضوعی به آثار چاپ شده خود مؤلفین در بخش منابع انتهای کتاب نیز مراجعه نمایند. راپایان از دانشجویان و اندیشمندان عزیز خواهشمندم تا در حین مطالعه این کتاب هرگونه انتقاد یا پیشنهاد خود را به ایمیل دانشگاهی مؤلفین به نشانی cz.fathi@tabrizu.ac.ir یا farahradizadeh@tabrizu.ac.ir ارسال نمایند که به طور قطع به مؤلفین در پربار شدن آن در تجدید چاپ‌های بعدی کمک، شایانی خواهد نمود.

مؤلفین

بهار ۱۳۹۸