بسم الله الرحمن الرحیم

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان‌نامه کارشناسی ارشد

آقای فخرالدین صبا رشته خون شناسی آزمایشگاهی و بانک خون پایان‌نامه کارشناسی ارشد خود را با عنوان « بررسی بیان ژن CXCR4 در سلولهای خونساز $CD34^+$ در مواجهه با نوروترانسمیتر اپی نفرین » در تاریخ ۱۳۹۲/۲/۱۰ ارائه کردند.

بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنند.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

دکتر مسعود سلیمانی (استاد راهنما)

دکتر بهزاد پوپک (استاد مشاور)

دکتر شعبان علیزاده (استاد ناظر)

دکتر امیر آتشی (استاد ناظر)

دکتر سعید آبرون (نماینده تحصیلات تکمیلی)

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی

دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **فخرالدین صبا** دانشجوی رشته **خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۹** مقطع **کارشناسی ارشد** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

امضا
تاریخ ۹۲/۴/۱۸

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

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

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل **پایان نامه کارشناسی ارشد** نگارنده در رشته **خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون** است که در سال **۱۳۹۲** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر مسعود سلیمانی** ، مشاوره **دکتر بهزاد پوپک** از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه 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 ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب **فخرالدین صبا** دانشجوی رشته **خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی
فخرالدین صبا
تاریخ و امضا

۹۲/۴/۱۸

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه

دوره کارشناسی ارشد در رشته خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون

عنوان

بررسی بیان ژن CXCR4 در سلول های خون‌ساز +CD34 بند ناف در مواجهه با کاته‌کولامین اپی نفرین

نگارش

فخرالدین صبا

استاد راهنما

دکتر مسعود سلیمانی

استاد مشاور

دکتر بهزاد پوپک

بهار ۱۳۹۲

تقدیم به

خانواده عزیزم

تشکر و قدردانی:

اینک که با کوشش مستمر و استعانت از الطاف الهی به مرحله دفاع از پایان نامه رسیدم بر خود لازم می دانم که از استاد راهنمایی بسیار خوبم جناب آقایی **دکتر مسعود سلیمانی** به پاس زحمات و تلاش های بی دریغ و بدون چشم داشتشان تشکر کنم و برایشان از خداوند مهربان دلی از جنس بلور، به رنگ آسمان و وسعت دریا خواستارم.

از استاد مشاوره خوبم جناب آقایی **دکتر بهزاد پوپک** نیز سپاس گذارم. برای اساتید محترم گروه هماتولوژی تربیت مدرس **دکتر امیر آتشی، دکتر سعید آبرون و دکتر سعید کاویانی** که به بنده قلمی رسا و اندیشه ژرف آموختند ناب ترین مراتب سپاس و احترام را تقدیمتان می کنم.

از دوستان خوبم آقایان **احمد عادلی، محمد حسین مقدسی و خانم الهام روشندل** تشکر و تقدیر می کنم و امید است با استعانت از درگاه الهی به موفقیت های روزافزون دست یابند.

در نهایت از همه پرسنل و دانشجویان گروه هماتولوژی که در انجام کار پایان نامه بنده را همراهی کردند تشکر می نمایم.

چکیده

جمع آوری سلول های بنیادی خونساز از خون محیطی امروزه به عنوان راهکار مناسبی برای پیوند مغز استخوان استفاده می شود. خروج این سلول ها از مغز استخوان به صورت شبکه ای پیچیده و هماهنگ شده است که عوامل مختلفی می تواند در آن دخالت داشته باشد. در شرایط کلینیکی از G-csf جهت ورود سلول های خونساز به خون محیطی استفاده می شود. این فاکتور به طور گسترده با مکانیسم های مختلف عمل می کند اما نحوه عملکرد آن بر روی مسیر CXCR4/SDF-1 به طور کامل مشخص نشده است. امروزه مطالعات گسترده ای در ارتباط با نقش سیستم عصبی در تنظیم حرکت سلول های خونساز در حال انجام است. از این رو در این پژوهش به نحوه عملکرد G-csf و سیستم عصبی بر روی بیان ژن CXCR4 در سلول های خونساز پرداخته شده است.

برای ارزیابی بیان ژن CXCR4 از سلول های خونساز بند ناف انسانی به عنوان منبع غنی از سلول‌های خونساز CD34+ استفاده شد برای این منظور سلول‌های CD34+ با روش MACs جمع آوری شد و سلول‌های حاصله در چاهک های مختلف با دوز های متفاوتی از اپی نفرین، G-csf ، ایزوپروترنول و پروپرانول مواجهه شدند و در بازهای زمانی ۱،۳،۵ استخراج RNA و سنتز cDNA شد. از Real Time PCR جهت بررسی بیان کمی ژن CXCR4 استفاده شد.

یافته های ما نشان داد که G-csf برای تغییر بیان ژن CXCR4 نیاز به حضور کاته کولامین دارد و عملکرد اصلی کاته کولامین ها وابسته به حضور رسپتورهای بتا است به طوریکه مهار این رسپتورها مانع تغییر بیان ژن CXCR4 در حضور کاته کولامین ها و G-csf می شد.

واژگان کلیدی:سلول های خونساز CXCR4،CD34+، اپی نفرین، ایزوپروترنول، پروپرانولول

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته..... ۱

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۱-۱- تعریف سلول‌های بنیادی خون‌ساز ۲

۱-۱-۲- شناسایی سلول‌های بنیادی خون ساز ۳

۱-۱-۳- مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی خون ساز ۳

۱-۱-۳-۱- سلول‌های +CD133 ..... ۴

۱-۱-۳-۲- مارکر سطحی CD34 ..... ۵

۱-۱-۴- عوامل مختلفی که در خروج سلول‌های بنیادی خون‌ساز از مغز استخوان دخالت دارند. ۵

۱-۱-۴-۱- سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها ۶

۱-۱-۴-۲- مسیر SDF-1/CXCR4 ..... ۹

۱-۱-۴-۳- مولکول‌های چسبنده ۱۱

۱-۱-۴-۴- فعالیت پروتئولیتیکی ۱۴

۱-۱-۴-۵- بازسازی استخوان ۱۵

۱-۱-۵- سیستم عصبی ۱۷

۱-۱-۵-۱- مانع اندوتلیال ۱۸

۱-۱-۶- محرک های مختلف دخیل در سلول های و پروژنیتورهای خونساز ۱۹

۱-۱-۶-۱- نقش پروتئازها: ۱۹

۱-۱-۶-۲- نقش ماکروفاژهای مغز استخوان: ۲۰

۱-۱-۶-۳- نقش کمپلمان، مسیر ترومبولیتیک و اسفنگوزین ۱- فسفات: ۲۰

۱-۱-۶-۴- نقش فیبرهای عصبی بتا آدرنرژیک ۲۰

۱-۱-۶-۵- سیکلوفسفامايد: ۲۱

۱-۱-۶-۶- آنتاگونیست های CXCR4 ..... ۲۲

۱-۱-۶-۷- آنتی بادی های آلفا ۴ اینتگرین (CD49d) ۲۲

۱-۱-۷- تعریف سیستم عصبی: ۲۳

۱-۱-۸- کار دستگاه عصبی: ۲۳

۱-۱-۹- بخش‌های دستگاه عصبی: ۲۳

۱-۱-۱۰- بافت عصبی: ۲۴

۱-۱-۱۱- ساختمان دستگاه اعصاب ۲۴

۱-۱-۱۲- نورون چیست؟ ۲۴

۱-۱-۱۲-۱- جسم سلولی: ۲۵

۱-۱-۱۲-۲- دندریت: ۲۵

۱-۱-۱۲-۳- آکسون: ۲۵

۱-۱-۱۳- انواع نورون ها(بر اساس عملکرد) ۲۶

۱-۱-۱۴- سیناپس چیست؟ ۲۶

۱-۱-۱۵- بیان رسپتورهای عصبی در سلول‌های خون‌ساز بنیادی ۲۷

۱-۱-۱۵-۱- رسپتورهای اُرکسین ۲۷

۱-۱-۱۵-۲- رسپتورهای تاکی کینین ۲۸

۱-۱-۱۵-۳- رسپتورهای پپتید مرتبط به ژن کلسی تونین ۲۸
۱-۱-۱۵-۴- رسپتورهای اُپیوئید ۲۹
۱-۱-۱۵-۵- رسپتور های آدرنرژیک و دوپامینی: ۳۰
۱-۱-۱۵-۶- دیگر رسپتورهای نوروترانسمیترها ۳۱
۱-۱-۱۶- رفتار سیستم عصبی در حرکت هماتوپوئیتیک استم سل ۳۳
۱-۱-۱۶-۱- نقش سیستم عصبی در مسیر SDF-1/CXCR4 ۳۴
۱-۱-۱۶-۲- نقش سیستم عصبی در آنزیم‌های پروتئولیتیک: ۳۵
۱-۱-۱۶-۳- نقش سیستم عصبی در بازسازی استخوانی جهت موبلایز HSC: ۳۵

فصل ۲: مواد و روش‌ها بر منابع ۳۸

۲-۱- مواد و وسایل مورد نیاز ۳۹
۲-۱-۱- وسایل مورد نیاز ۳۹
۲-۱-۲- مواد مصرفی ۴۰
۲-۱-۳- آماده سازی مواد و بافرهای مورد نیاز ۴۱
۲-۱-۳-۱- تهیه PBS بدون یون‌های کلسیم و منیزیم ۴۱
۲-۱-۳-۲- آماده سازی PBS حاوی EDTA ۴۲
۲-۱-۴- تهیه و آماده سازی فاکتورهای رشد ۴۲
۲-۱-۴-۱ تهیه Stock فاکتور رشد SCF ۴۳
۲-۱-۴-۲- تهیه Stock فاکتور رشد TPO ۴۳
۲-۱-۴-۳- مراحل جداسازی سلول‌های +CD34 ۴۳
۲-۱-۵- جداسازی سلول‌های تک هسته ای از خون بند ناف: ۴۳
۲-۱-۵-۱- جداسازی سلول‌های +CD34 از سلول‌های تک هسته ای جدا شده از بند ناف ۴۵
۲-۱-۵-۲- شمارش سلول‌های +CD34 ۴۵
۲-۱-۵-۳- تایید مارکر CD34 سلول‌های جدا شده از خون بنده ناف ۴۶
۲-۱-۶- استخراج RNA ۴۶
۲-۱-۶-۱- کنترل کیفی RNA استخراج شده ۴۶
۲-۱-۶-۲- مراحل کار استخراج RNA با ستون ۴۷
۲-۱-۶-۳- فرایند حذف RNase ۴۸
۲-۱-۷- واکنش ترانس کریپشن معکوس ۴۹
۲-۱-۸- سنتز cDNA با کیت Fermentas ۵۰
۲-۱-۸-۱- انواع پرایمر مورد استفاده در سنتز cDNA ۵۰
۲-۱-۸-۲- پرایمر الیگوتایمدین ۵۰
۲-۱-۸-۳- پرایمرهای تصادفی ۵۰
۲-۱-۸-۴- پرایمرهای اختصاصی توالی ۵۱
۲-۱-۹- واکنش زنجیره ای پلیمرازی (PCR) ۵۲
۲-۱-۱۰- مواد لازم برای انجام PCR ۵۳
۲-۱-۱۰-۱- پرایمر ۵۳
۲-۱-۱۰-۲-DNA الگو ۵۴
۲-۱-۱۰-۳-DNA پلی مراز (مقاوم به حرارت) ۵۴
۲-۱-۱۰-۴- بافر PCR ۵۴
۲-۱-۱۰-۵- منیزیوم (MgCL2) ۵۵

۲-۱-۱۱- مراحل PCR ۵۵
۲-۱-۱۲- انجام Real Time PCR برای بررسی کمی CXCR4 ..... ۵۷
۲-۱-۱۳- الکتروفورز و اصول آن: ۵۸
۲-۱-۱۳-۱- اصول رنگ آمیزی ژل آگاروز ۵۹
۲-۱-۱۳-۲- بافر مورد استفاده در الکتروفورز ۵۹

فصل ۳:نتایج و یافته ها ۶۰

۳-۱- نتایج حاصل از جداسازی سلول‌های +CD34 از خون بند ناف ۶۱
۳-۱-۲- نتایج حاصل از بیان ژن CXCR4 در سلول‌های +CD34 مواجهه شده با G-csf ۶۲
۳-۱-۳- نتایج حاصل از بیان ژن CXCR4 در سلول‌های +CD34 مواجهه شده با اپی‌نفرین: ۶۳
۳-۱-۴- نتایج حاصل از بیان ژن CXCR4 در سلول‌های +CD34 مواجهه شده با اپی‌نفرین و G-csf ..۶۴
۳-۱-۵- نتایج حاصل از بیان ژن CXCR4 در سلول‌های +CD34 مواجهه شده با اپی‌نفرین- G-csf و پروپرانولول ۶۵
۳-۱-۶- نتایج حاصل از بیان ژن CXCR4 در سلول‌های +CD34 مواجهه شده با ایزوپروترنول ۶۶
۳-۱-۷- نتایج حاصل از بیان ژن CXCR4 در سلول‌های +CD34 مواجهه شده با G-csf و ایزوپروترنول۶۷
۳-۱-۸- میانگین CT ژن CXCR4 در مواجهه با دوزهای مختلف کاته کولامین در سلول های خونساز +CD34 ..... ۶۸

فصل ۴: ۷۰

۴-۱- بحث ۷۱
۴-۲- نتیجه گیری: ۷۷
۴-۳- پیشنهادات: ۷۹
چکیده انگلیسی ۱۰۳

فهرست جداول

جدول ۲-۱- آماده سازی PBS ۴۲
جدول ۲-۲- حجم بافر RLT Plus برای لیز سلول‌ها ۴۷
جدول ۲-۳- مقادیر مورد استفاده جهت انجام سنتز cDNA ۵۱
جدول ۲-۴- چرخه دمایی سنتز cDNA ۵۲
جدول ۲-۵- زمان بندی و دمای هر مرحله از PCR ۵۶
جدول ۲-۶- توالی پرایمرهای مورد استفاده در RT-PCR ۵۶
جدول ۲-۷- مقادیر مورد استفاده جهت انجام CXCR4 Real time PCR ۵۷
جدول ۲-۸- چرخه دمایی Real Time PCR بیان CXCR4 ..... ۵۷
جدول ۳-۱- میانگین CT بیان ژن CXCR4 در مواجهه با کاته کولامین اپی نفرین و G-csf و پروپرانولول(PP) در ساعت های مختلف ۶۹
جدول ۳-۲- میانگین CT بیان ژن CXCR4 در مواجهه با کاته کولامین ایزوپروترنول(Iso) و G-csf و در ساعت های مختلف ۶۹

فهرست نمودارها

نمودار ۱-۳- تغییرات بیان ژن CXCR4 در سلول های +CD34 ..... ۶۸
نمودار ۳-۲- تغییرات بیان ژن CXCR4 در حضور اپی‌نفرین..... ۶۹
نمودار۳-۳- تغییرات بیان ژن CXCR4 در سلول های +CD34 در مواجهه همزمان با اپی‌نفرین و G-CSF
..... ۷۰
نمودار۴-۳- مواجهه سلول های +CD34 با اپی نفرین-Gcsf-پروپرانولول..... ۷۱
نمودار۳-۵- تغییرات بیان ژن CXCR4 در مواجهه با ایزوپروترنول..... ۷۲
نمودار۳-۶- تغییرات بیان ژن CXCR4 در مواجهه با ایزوپروترنول و G-csf..... ۷۳

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱- عملکرد فاکتور رشد G-csf در خروج سلول های خونساز..... ۲۱
شکل ۱-۲- بیان رسپتورهای عصبی بر روی سلول های خونساز..... **۳۲**
شکل ۱-۲- عملکرد سیستم عصبی در حرکت سلول های خونساز..... ۳۷
شکل ۳-۱- نتایج فلوسیتومتری بعد از جداسازی سلول های +CD34 را نشان می دهد..... ۶۲

فصل اول

مقدمه و

مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱- مقدمه

۱-۱-۱- تعریف سلول‌های بنیادی خون‌ساز

سلول‌های بالغ خون دوره زندگی محدودی دارند و مدام توسط تکثیر و تمایز جمعیت خیلی کوچکی از سلول‌های بنیادی پر ظرفیتی خون‌ساز[1] جایگزین می‌شود[۱]. این سلول‌ها در درجه اول در BM بالغین سالم یافت می‌شوند. سلول‌های بنیادی خون ساز سلول‌های چند قوه ای نادری هستند، که دارای توانایی خود نوسازی بوده و دارای قدرت تولید تمام رده های سلولی خونی می‌باشد[۱].

خصوصیات برجسته HSC در سال ۱۹۶۳ توسط سیمینو وتیچ و همکاران معین شد. در مدل موش، این گروه مدرکی دال بر حضور HSC در مغز استخوان ارائه دادند. این HSC می‌توانست سیستم خون‌سازی را نوسازی کند و از این رو حیوان اشعه دیده را از مرگ نجات بدهد. پیوند های متوالی نشان داد که HSC توانایی خود تجدید پذیری در مقابل تمایز، تعریف می‌شوند[۱].

1.Hematopoietic stem cell

۱-۱-۲- شناسایی سلول‌های بنیادی خون ساز

طی زندگی پس از تولد سلول‌های بنیادی خون ساز، جز کوچکی از سلول‌های مغز استخوان را با مقادیر تقریبی متغیر ۰.۰۵-۰.۵ ٪ تشکیل می‌دهند[۲]. شناسایی سلول‌های بنیادی خون ساز به کمک مارکرهای سطحی و از طریق سنجش‌های عملکردی انجام می‌گیرد. بیشترین معیاری که جهت شناسایی این سلول‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد، توانایی این سلول‌ها در تولید سلول‌های خونی در شرایط مناسب آزمایشگاهی است. تکامل سیستم‌های کشت آزمایشگاهی برای مطالعه خون سازی، در شرایط مناسب آزمایشگاهی است[۲]. تکامل سیستم‌های کشت آزمایشگاهی برای مطالعه خون سازی، که اوج آن بین سال‌های ۱۹۶۵ و اواخر دهه ۱۹۷۰، امکان شناسایی و شمارش انواع مختلف پیش ساز های سلولی را که در حال حاضر به یک یا رده های دیگر تکاملی متعهد شده اند را فراهم می‌کند[۳]. سنجش تشکیل کلونی امکان شمارش پیش سازهای بالغ‌تری که قادر به تشکیل کلونی در شرایط کشت مناسب را در محیط نیمه جامد همانند متیل سلولز دارند، را می‌دهد. این محیط‌های نیمه جامد تحرک سلول‌ها را کاهش داده و این امکان را فراهم می‌کند، که هر یک از سلول‌ها به کلون‌هایی تکامل یابند. هنگامی که تعداد سلول‌های تشکیل دهنده این کلونی‌ها کمتر از ۵۰ عدد باشند به عنوان بک خوشه منفرد به حساب آمده و اگر تعداد آن‌ها بعد از دوره‌ی ۱۴-۷ روزه بیش از ۵۰ عدد باشد، به عنوان کلونی‌های سلول‌های تکامل یافته ، به حساب می‌آید[۳].

۱-۱-۳- مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی خون ساز

فنوتیپ سطحی سلول‌های بنیادی خون ساز به خوبی شناخته نشده است. اولین سلول‌های خون ساز جدا شده فنوتیپ +CD34، +CD90 و -Lin- هستند، در حالی که Lin مربوط به مارکرهای اختصاصی رده سلولی میلوئیدی، لنفوسیت های B، T و سلول‌های کشنده طبیعی است[۴]. علاوه بر مارکر CD34 ، سلول‌های HSC با وجود CD133(AC133) و عدم حضور CD38 و HLA-DR ثابت شده اند. در زیر به اختصار هر یک از مارکرهای نامبرده توضیح داده

می‌شود[۴].

۱-۱-۳-۱- سلول‌های +CD133

CD133[1] اولین عضو شناخته شده از خانواده پرومینین به حساب می‌آید، که به عنوان پروتئین‌های غشایی پنج بار غشا گذار شناخته می‌شوند. هنوز عملکرد اختصاصی و لیگاندهای پرومینین ها تا حدودی ناشناخته است. بیان محدود این آنتی ژن در جمعیت پیش سازهای +CD34 مغز استخوان، خون محیطی بزرگسالان و همچنین سلول‌های کبد جنینی اشاره به عملکرد آن‌ها به عنوان مارکر پیش ساز هماتوپوئیتیک دارد[۴].

سلول‌های +CD133 قادر به نوسازی طولانی مدت در حیوانات زنوگرافت[2] بوده، و اعتقاد بر این است که این سلول‌ها بسیار ابتدایی‌تر از سلول‌های +CD34هستند. نشان داده شده است AC133 بر روی سلول‌های اندوتلیال و فیبروبلاست یافت نمی‌شوند. CD133 در سلول‌های خون ساز، پیش ساز های اندوتلیال، گلایوبلاستوما، سلول‌های بنیادی عصبی و گلیال بیان می‌شود. به علت جایگاه برآمدگی‌های غشای پلاسمایی از قبیل میکرو ویلی سلول‌های اپی‌تلیال، یک نقش عملکردی به CD133 به عنوان سازمان دهنده توپولوژی غشای پلاسمایی نسبت داده شده است. علاوه بر این CD133 به عنوان مارکر استم سل به حساب می‌آید. در رده های خون‌ساز در انسان که همراه با بیان پایدار AV133 هستند، بیان آنتی ژن AC133 محدود به سلول‌های +CD34 بوده، اگرچه رونوشت‌های CD133 در بسیاری از رده های سلولی انسانی و سلول‌های تمایز یافت می‌گردند. به علاوه، سلول‌های +CD34+/AC133 دارای ظریفت کلونی زایی و میزان پیوند بالاتری نسبت به سلول‌های +AC133+/CD34 هستند[۴].

---

[1] Prominin-1
[2] Xenograft

علاوه بر سیستم هماتوپوئیتیک، CD133 وCD34 بـر روی سـلول‌هـای پـیش سـاز انـدوتلیال (EPCs)[1] نیز بیان می‌شوند. این مارکرها نقشی را در رگ زایی و طی رشد تومور و ترمیم زخم ایفا می‌کنند. CD133 به عنوان مارکر سلول‌های سرطانی نیز به حساب می‌آید[۵].

۱-۱-۳-۲- مارکر سطحی CD34

کشف سیالوموسین CD34 به عنوان یک آنتی ژن سطحی سلول خون‌ساز، مطالعـات بـر روی تکامل خون‌سازی انسان را تسریع بخشیده و تغییر داد. CD34 شایع‌ترین مارکری است ، که جهت شناسایی سلول‌های بنیادی خون‌ساز استفاده می‌گردد. این آنتی ژن بـر روی سـلول‌هـای ابتـدایی بیان شده و بیان آن به دنبال تمایز به سلول‌های بالغ‌تر کاهش می‌یابد[۶].

بیان آنتی ژن CD34 در سطح سلول سریعاً به ویژگی متمایز کننده ای تبدیل شده است کـه از آن به عنوان اساس شمارش، جداسازی و دستکاری سلول‌های بنیادی انسان اسـتفاده مـی‌شـود چرا که CD34 در تمایز سلول‌ها به سـلول‌هـای بـالغ، کـاهش مـی‌یابـد. عـلاوه بـر اینکـه بـر روی سلول‌های بنیادی و پروژنیتورهای اولیه در طول خون‌ساز انسانی بیان می‌شود. آنتی ژن CD34 در خارج از سیستم خون‌ساز بر روی سلول‌های اندوتلیال عروق و برخی از فیبروبلاست های نیز بیـان می‌شود[۶].

۱-۱-۴- عوامل مختلفی که در خروج سلول‌های بنیادی خون‌ساز از مغز استخوان دخالت دارند.

جایگاه اصلی سلول‌های بنیادی خون‌ساز در بـالغین، مغـز اسـتخوان اسـت ولـی دارای قـدرت

[1] Endothelial Progenitor Cell

حرکت به خون محیطی‌اند و توان برگشت دوباره بـه مغـز اسـتخوان را دارنـد. در واقـع، نـه تنهـا لکوسیت‌های بالغ از منبع ذخیره ای خود در مغز استخوان وارد خون محیطی شوند بلکه سلول‌های بنیادی خون‌ساز و پروژنیتورها نیز چنین توانایی را دارند[۷]. خون بند ناف انسـانی حـاوی مقـادیر فراوانی از HSC است ، با این حال در خون محیطی بالغین شمار این سلول‌ها ٪ ۰.۰۶ سـلول‌هـای هسته دار است[۸, ۹]. مطالعات نشان داده که وجود التهاب، عفونت، خونریزی، تزریق دارو هـای سیتوتوکسیک و حتی استرس فیزیولوژیک می‌تواند سلول‌های خون‌ساز را از مغز استخوان به طرف بافت آسیب دیده جذب کند[۱۳,۱۲,۱۱,۱۰]. این سلول‌ها پس از ورود به بافت‌ها تمایز پیدا کـرده و به سلول‌های ایمنی مورد نیاز تبدیل می‌شوند. نحوه مهاجرت و لانه گزینی سلول‌های بنیـادی را همکاری محکم CXCR4 و SDF1 می‌دانند که در ادامه به طور مفصل توضـیح داده مـی‌شـود.در شرایط استرسی مثل تزریق (G-csf) حرکت سلول‌های بنیادی و پروژنیتور خون‌ساز بسیار بیشـتر شده و با سرعت و قدرت بالای از مغز استخوان به داخل خون محیطی حرکت می‌کنند[۹, ۱۴]. از عوامل دیگر که می‌تواند منجر به حرکت سـلول بنیـادی شـود مـی‌تـوان بـه IL8، ADAM3100، SDF1 و نوروترانسمیترها اشاره کرد[۱۸,۱۷,۱۶,۱۵]. سلول‌های بنیادی خون‌ساز به طور محکمـی در مغز استخوان لانه گزیده اند و آزاد شدنشان به خون محیطی فرایندی آسـان نیسـت و نیـاز بـه دخالت مجموعه ای از عوامل مثل کموکاین‌هـا، آنـزیم‌هـا، مولکـول‌هـای چسـبنده، رسـپتورهـای اختصاصی است تا بتوان فرایند حرکت را تسهیل کنند[۱۹]. بنابراین در این بخش سعی شده است به طور کلی و اجمالی به مجموعه عواملی دخیل در حرکت سلول‌هـای بنیـادی خـون‌سـاز از مغـز استخوان به خون محیطی اشاره شود.

۱-۱-۴-۱- سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها

چون خون محیطی می‌تواند منبع مناسبی برای جمع آوری سلول‌های بنیادی +CD34 باشـد، لذا امروزه در بحث پیوند مغز استخوان به فراوان از آن یاد می‌شود و سعی در گسـترش روش‌هـای