بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته خون شناسی آزمایشگاهی و بانک خون

عنوان

پیوند آشیانه استرومایی(هماتون) برای ارزیابی خونسازی در مدل موشی

نگارش

ناصر احمد بیگی لاهیجانی

استاد راهنما

جناب آقای دکتر مسعود سلیمانی

استاد مشاور

جناب آقای دکتر یوسف مرتضوی

زمستان ۱۳۹۰

دانشگاه تربیت مدرس

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای ناصر احمد بیگی لاهیجانی رشته خون شناسی آزمایشگاهی و بانک خون رساله دکتری خود را با عنوان: « پیوند آشیانه استرومایی (هماتون) برای ارزیابی خونسازی در مدل موشی » در تاریخ ۱۳۹۰/۱۱/۵ ارائه کردند.

اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	امضاء
استاد راهنما	دکتر مسعود سلیمانی	
استاد مشاور	دکتر یوسف مرتضوی	
استاد ناظر	دکتر علی اکبر پور فتح اله	
استاد ناظر	دکتر مینا ایزدیار	
استاد ناظر	دکتر احمد قره باغیان	
استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر سعید آبرون	

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 ٤- 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 ۸۷/٤/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/٤/۲۳ 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 **ناصر احمد بیگی لاهیجانی** دانشجوی رشته **خونشناسی آزمایشگاهی وبانک خون** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸٦** مقطع **دکتری** 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 ۱۳۸۷/۱۱/۱۵

آیین نامه چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (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 پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اطلاع دهد.

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

«کتاب حاضر، رساله دکتری نگارنده در رشته **خونشناسی آزمایشگاهی و بانک خون** است‌که در سال **۱۳۹۰** در دانشکده‌پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **جناب آقای دکتر مسعود سلیمانی** و مشاوره **جناب آقای دکتر یوسف مرتضوی** از آن دفاع شده است.»

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت‌چاپ) را به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر درمعرض فروش قرار دهد.

ماده ٤: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت‌مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند 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 ماده ٤ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ٦: اینجانب **ناصر احمد بیگی لاهیجانی** دانشجوی **رشته خون شناسی آزمایشگاهی و بانک خون مقطع‌دکتری** تعهد فوق وضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی:

تاریخ و امضا:

۱۳۹۰/۱۱/۱۵

تقدیم به:

تمام جویندگان علم و همه کسانی که در راه تسکین آلام دردمندان گام بر می‌دارند.

تشکر و قدردانی

اکنون که در سایه الطاف بیکران الهی این تحقیق پایان پذیرفت وظیفه خود می‌دانم از عزیزانی که مرا در این خصوص یاری نموده‌اند به ترتیب زیر سپاسگزاری نمایم.

جناب آقای دکتر مسعود سلیمانی

جناب آقای دکتر یوسف مرتضوی

جناب آقای دکتر محمد واسعی

جناب آقای دکتر یوسف قیصری

سرکار خانم دکتر مینو سعیدی

جناب آقای دکتر سعید آبرون

سرکار خانم آزاده امیدخدا

دوستان و همکاران محترم مرکز تحقیقات بن یاخته

پرسنل محترم آزمایشگاه پاتولوژی بیمارستان شریعتی

پرسنل محترم مرکز پرتو پزشکی نوین

و همچنین از کلیه سروران و همکارانی که نامشان ذکر نشده و به نحوی در انجام این تحقیق مرا یاری نموده‌اند نیز تشکر و قدردانی می‌نمایم.

چکیده

مفهوم آشیانه ی سلول های بنیادی که برای اولین بار در سال ۱۹۷۸ توسط شافیلد و همکارانش مطرح شد، حکایت از یک فضای آناتومیکی ویژه و ضروری برای فعالیت های معمول سلول بنیادی شامل خود نوسازی، تمایز، سکون و مهاجرت داشت. اگر چه از سالها پیش نقش حیاتی این آشیانه ها، برای سلول های بنیادی خونساز مطرح شده است، اما جدا سازی ناموفق آنها، مطالعه، دست وزری و استفاده بالینی از این ساختارها را محدود کرده است. در این مطالعه، کمپلکس های سلولی را بر اساس اندازه از نمونه مغز استخوان جدا سازی، سلول های مشتق از آنها را تعیین هویت و سپس به موش های اشعه دیده پیوند شد. قرار گرفتن این کمپلکس ها در شرایط مناسب کشت نشان داد که این کلمپ ها منشاء سلول های بنیادی مزانشیمی و رده های مختلف سلول های خونی می باشند. این کمپلکس ها همچنین توانایی جذب سلول های بنیادی خونساز را به داخل خود داشتند. پیوند این کمپلکس های سلولی به موش های اشعه دیده، نه تنها منجر به بازسازی سیستم خونسازی در طولانی مدت شد، بلکه سلول های استرومایی مغز استخوان را نیز بازسازی و ترمیم کرد. همچنین این کلمپ ها در حفره شکمی بعضی از موش ها ساختارهای لنفوئیدی شکلی ایجاد کردند. نتیجه گیری کلی این است که کمپلکس های جدا شده، خصوصیات آشیانه های سلول های بنیادی هماتوپوتیک را نشان دادند و با روشی که برای جدا سازی آنها در این مطالعه ارائه شد، امکان بررسی بیشتر آنها به وجود خواهد آمد. هم چنین از آنجا که ارتباطات ملکولی بین سلول های بنیادی هماتوپیتیک و عناصر آشیانه، نقش مهمی را در عملکرد این سلول ها ایفا می کنند، استراتژی "پیوند سلول های بنیادی خونساز به همراه آشیانه" می تواند بعضی از محدویت های روش فعلی پیوند که مبتنی بر تزریق سلول ها بصورت سینگل می باشد را بر طرف کند.

کلمات کلیدی: آشیانه، سلول های بنیادی خونساز، پیوند مغز استخوان، هماتون

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱.سلول های بنیادی خونساز ۲

۱-۱-۱.تعریف سلول های بنیادی خونساز ۲

۱-۱-۲. عملکرد سلول های بنیادی خونساز ۳

۱-۱-۳. جداسازی و خالص‌سازی سلول های بنیادی خونساز ۳

۱-۱-۳-۱. مارکرهای سطحی سلول بنیادی ٤

۱-۱-۳-۱-۱. سلول‌های بنیادی خونساز CD_{34}^{+} ٤

۱-۱-۳-۱-۲. سایر مارکرهای سلول های بنیادی ٥

۱-۱-۳-۱-۳. مارکرهای سلول های بنیادی خونساز موشی ٥

۱-۱-٤. هتروژنیتی کمپارتمنت سلول های بنیادی خونساز انسانی ٦

۱-۱-٥.سنجش سلولهای بنیادی در شرایط in vivo ۷

۱-۱-٥-۱.مدل موشی ۸

۱-۲.سلول های بنیادی مزانشیمی ۹

۱-۲-۱.تعریف استرومای مغز استخوان و سلول های بنیادی مزانشیمی ۹

۱-۲-۲.روشهای جداسازی سلول های بنیادی مزانشیمی انسانی و خصوصیات فنوتیپیک آنها ۱۰

۱-۲-۳.روشهای جداسازی سلول های بنیادی مزانشیمی موشی و خصوصیات فنوتیپیک آنها ۱۲

۱-۲-٤.خصوصیات عملکردی و ظرفیت‌های تمایزی سلول های بنیادی مزانشیمی ۱۲

۱-۲-۵. مارکرهای سطحی سلول های بنیادی مزانشیمی ۱٤
۱-۲-٦. کاربردهای درمانی سلول های بنیادی مزانشیمی ۱٦
۱-۳.پیوند سلول های بنیادی مغز استخوان ۱۷
۱-۳-۱.پیوند همزمان سلول‌های بنیادی مزانشیمی و سلول‌های بنیادی خونساز ۱۷
۱-۳-۲.پیشینه مطالعاتی در مورد پیوند سلول‌های خونساز و سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۱۸
۱-۳-۳.پیوند سلول های بنیادی خونساز ۲۱
۱-٤. آشیانه سلول های بنیادی خونساز ۲۵
۱-۵.هماتون ۲۷
فصل دوم: مواد و روش ها ۲۹
۲-۱.ابزار مورد نیاز ۳۰
۲-۲. مواد مورد نیاز ۳۲
۲-۳. آماده کردن محلولها و بافرها ۳۴
۲-۳-۱. تهیه بافر فسفات با pH = ٤/٦ ..... ۳٤
۲-۳-۲.تهیه بافر نمکی PBS ۰/۱۵ مولار با pH = ۷/۲ ..... ۳٤
۲-۳-۳. تهیه اسید سولفوکرومیک ۳٤
۲-۳-٤. تهیه رنگ تریپان بلو ۳۵
۲-۳-۵.تهیه محلول تریپسین ۰/۲۵ ٪ ، EDTA ۰/۰۲٪ ۳۵
۲-۳-٦. طرز تهیه محلول هماتوکسیلین ۳٦
۲-۳-۷. طرز تهیه ائوزین الکلی ۳٦
۲-٤. طرز تهیه محیط کشت ۳۷

۲-٤-۱. محیط کشت DMEM ۳۷
۲-۵.شستشوی وسایل و استریل کردن آنها ۳۷
۲-٦. شمارش سلولی ۳۸
۲-۷.تعیین درصد زنده بودن سلولها ۳۸
۲- ۸.نمونه گیری و استخراج سلول ۳۹
۲-۸-۱. استخراج سلول های تک هسته ای از مغز استخوان ۳۹
۲-۸-۲.روش فیلتر برای جداسازی کلمپ‌ها ۳۹
۲-۸-۳.جداسازی سلول‌های Sca-1 از نمونه مغز استخوان ٤۰
۲-۹.جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی و کشت آنها ٤۰
۲-۹-۱. برداشت سلول های بنیادی مزانشیمی از فلاسک ٤۱
۲-۹-۲. تعیین مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان ٤۱
۲-۹-۳. کشت سلول های بنیادی مزانشیمی در محیط های تمایزی ٤۲
۲-۹-٤. تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به ادیپوسیت ٤۲
۲-۹-۵. تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست ٤۲
۲-۱۰. مدل حیوانی و پیوند ۴۳
۲-۱۰-۱.پرتو دهی موش‌ها ٤۳
۲-۱۰-۲.طریقه پیوند سلول‌های Sca-1 به حیوان مدل ٤۳
۲-۱۰-۳.طریقه پیوند کلمپ ها به حیوان مدل ٤٤
۲-۱۰-٤.نگهداری موش‌های پیوندی ٤٤
۲-۱۱.بررسی خونسازی ناشی از کلمپ‌ها ٤٤
۲-۱۱-۱.نحوه جداسازی فمور برای بررسی هیستولوژی ٤۵

۲-۱۱-۲. بررسی برش‌های بافتی از فمورهای جدا شده..... ٤٥
۲-۱۱-۲-۱. فیکس کردن..... ٤٥
۲-۱۱-۲-۲. آبگیری..... ٤٥
۲-۱۱-۲-۳. شفاف کردن..... ٤٥
۲-۱۱-۲-٤. آغشته کردن..... ٤٦
۲-۱۱-۲-٥. قالب گیری..... ٤٦
۲-۱۱-۲-٦. برش گیری..... ٤٦
۲-۱۱-۲-۷. رنگ آمیزی..... ٤٦
۲-۱۱-۳. ایمونو هیستوشیمی به کمک آنتی بادی علیه پروتئین GFP..... ٤۷
۲-۱۱-٤.کشت کلنی‌ها در محیط متیل سلولز..... ٤۸
فصل سوم: نتایج..... ۴۹
۳-۱. بررسی نتایج حاصل از جداسازی و تعیین هویت کلمپ ها در in vitro..... ۵۱
۳-۲.تعیین هویت سلول های فیبروبلاستی حاصل از کشت کلمپ ها..... ۵۴
۳-۲-۱.نتایج حاصل از کشت سلول های بنیادی مزانشیمی در محیط های تمایزی..... ٥٤
۳-۲-۲.نتایج حاصل از فلوسایتومتری سلولهای بنیادی مزانشیمی بدست آمده از کلمپ ها..... ٥٥
۳-۲-۳. نتایج حاصل از مقایسه تعداد سلول بنیادی مزانشیمی حاصل ازکشت بخش سلولی باقی مانده در پشت فیلتر و قسمت عبور کرده از آن..... ٥٦
۳-۳.تعیین هویت سلول های بنیادی خونساز موجود در کلمپ ها..... ۵۷
۳-۳-۱. تشکیل کلونی در محیط متیل سلولز..... ۵۷
۳-۳-۲.نتایج حاصل از فلوسایتومتری سلول های حاصل از CFU ها..... ۵۹
۳-٤. نتایج حاصل از لانه گزینی سلول های هماتوپوتیک در کلمپ..... ۶۰

۳-۵.نتایج حاصل از پیوند کلمپ ها ۶۰

۳-۵-۱.تعیین دوز اشعه برای تخلیه مغز استخوان..... ٦٢

۳-۵-۲.نتایج حاصل از پیوند کلمپ ها در کوتاه مدت ٦٢

۳-۵-۳.نتایج حاصل از پیوند کلمپ ها در بلند مدت..... ٦٦

فصل چهارم: بحث، نتیجه گیری و **پیشنهادها** ۶۹

٤-۱.بحث ۷۰

٤-۲.نتیجه گیری ۷۵

٤-۳. پیشنهادها ۷۵

منابع ۷۷

چکیده انگلیسی ۹۰

فهرست شکل ها

شکل ۳-۱.طراحی شماتیک از مطالعه انجام شده ۵۰

شکل ۳-۲. طراحی شماتیک از جداسازی کلمپ ها ۵۱

شکل ۳-۳.مشاهده میکروسکپی کمپلکس های سلولی ۵۳

شکل۳-٤. تعیین هویت سلول های استرومایی مشتق از کلمپ های سلولی ۵۵

شکل ۳-۵. نسبت سلول های بنیادی مزانشیمی به دست آمده از زیر و روی فیلتر ۵۷

شکل ۳-٦. تعیین هویت سلول های هماتوپوتیک مشتق از کلمپ ها ۵۸

شکل ۳-۷. نتایج حاصل از فلوسایتومتری سلول های مشتق از CFU ۵۹

شکل ۳-۸. بررسی پتانسیل لانه گزینی سلول های بنیادی خونساز به داخل کلمپ ها ٦۱

شکل ۳-۹. طرح شماتیک از بررسی پتانسیل خونسازی کلمپ ها ٦۱

شکل ۳-۱۰. بررسی کیفی کایمریسم در کوتاه مدت ٦٤

شکل ۳-۱۱. بررسی کمی کایمریسم در کوتاه مدت ٦۳

شکل ۳-۱۲. تولید بافت لنفوئیدی مانند در حفره شکمی ٦٦

شکل ۳-۱۳. بررسی کیفی کایمریسم در بلند مدت ٦۷

شکل ۳-۱٤. بررسی کمی کایمریسم در بلند مدت ٦۸

فصل اول

مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱.سلول‌های بنیادی خونساز

۱-۱-۱.تعریف سلول‌های بنیادی خونساز

خصوصیات برجسته سلول‌های بنیادی خونساز[1] در سال ۱۹۶۳ توسط سیمینو ویـتچ و همکـاران معین شد. این گروه در مُدل موشی، مدرکی دال بر حضور سلول های بنیادی خونساز در مغز اسـتخوان ارائه دادند. این سلول های بنیادی خونساز می‌توانستند سیستم خونـسازی را نوسـازی کننـد و از اینـرو حیوان اشعه دیده را از مرگ نجات بدهد. پیوندهای متوالی نـشان داد کـه سـلول‌هـای بنیـادی خونـساز توانایی خود نو سازی [2] را دارند.

بر پایه این آزمایشات، سلول‌های بنیادی خونساز به‌عنوان سلول‌هایی بـا توانـایی خـود سـازی در مقابل تمایز، تعریف می‌شوند. آنها خاصیت چند قوه‌ای (یعنی یک سلول بنیادی می‌تواند دست کـم ۱۰-۸ رده متمایز از سلول‌های بالغ را بوجود بیاورد) و ظرفیت تکثیری بالایی دارند و در یک حالت پیوسـته و یکنواخت سیستم خونسازی بالغین را به آرامی بوجود می‌آورند[۱].

روش قطعی برای ارزیابی سلول‌های بنیادی براساس ظرفیت تکثیری‌شان، ایجاد سیستم خونـساز سالم در گیرندگان واجد شرایط پس از پیوند می‌باشد[۲]. در موش فنوتیپ و عملکرد سلول‌های بنیـادی خونساز با استفاده از ارزیابی‌های رقابتی در ایجاد دوبـاره جمعیـت خونـساز در بـدن مـوش، مـشخص

[1] Hematopoietic Stem Cell

[2] Self renewal

شده‌اند[۳-۵]. اندازه‌گیری فعالیت سلول‌های بنیادی خونساز انسانی به واسطه توسعه ارزیابی‌های گزنوترانسپلنتیشن[1] در جنین گوسفند[۶-۷] یا موش دارای نقص ایمنی، بسیار آسان شده است[۸-۱۰].

۱-۱-۲. عملکرد سلول‌های بنیادی خونساز

عملکرد سلول بنیادی خونساز به توانایی این سلول در ساخت تمامی رده‌های خونی در طول مدت زندگی اطلاق می‌شود. به صورت تجربی این امر با توانایی این سلول برای دوباره ساختن سیستم خونساز در موش اشعه دیده اثبات می‌شود. تنها سلول بنیادی خونساز با توانایی طولانی مدت[2] توانایی خود نو سازی غیر محدود را دارد و به این ترتیب می‌تواند تمامی رده‌های خونی را در طول زندگی بسازد.

۱-۱-۳. جداسازی و خالص‌سازی سلول‌های بنیادی خونساز

سلول‌های بنیادی خونساز با استفاده از تکنیک‌های مختلفی که عبارتند از: متراکم کردن با استفاده از سانتریفیوژ کردن، فعال‌سازی و یا وضعیت چرخه سلولی و بیان آنتی‌ژن سطحی، جدا و خالص شده است. یک نکته مهم در جداسازی سلول‌های بنیادی خونساز این است که ارتباط تنگاتنگی میان سلول‌های خالص شده از نظر ساختار سلولی و قابلیت پتانسیل عملکردی به‌عنوان یک سلول بنیادی وجود دارد[۱۱].

[1] Xenotransplantation

[2] Long Term Culture – Initiating Cell

۱-۱-۳-۱. مارکرهای سطحی سلول بنیادی

آنالیز سیستماتیک عملکرد سلول‌های خونساز بیان کننده یک آنتی‌ژن ویژه سطح سلول یا سایر مارکرها، منجر به شناسایی جمعیت‌های نادر خالص شده از نظر فعالیت سلول بنیادی (SRC[1] یا LTC-IC[2]) شد. سلول‌های بنیادی خونساز تعدادی از آنتی‌ژن‌های سطحی را بیان نمی‌کند (مارکرهای رده) این مارکرها مشخص کننده مراحل انتهایی سلول‌های خونساز تمایز یافته می‌باشند. بدین ترتیب برداشت چنین سلول‌های مثبتی از نظر مارکرهای رده، باعث می‌شود سلول‌های نابالغ به‌طور غالب در سوسپانسیون باقی بمانند.

۱-۱-۳-۱-۱.سلول‌های بنیادی خونساز CD_{34}^{+} انسانی

کشف سیالوموسین CD_{34}^{+} به‌عنوان یک آنتی‌ژن سطحی سلول خونساز، مطالعات بر روی تکامل خونسازی انسان را تسریع بخشیده و تغییر داد[۱۲]. بیان آنتی‌ژن CD_{34}^{+} در سطح سلول سریعاً به ویژگی متمایزکننده‌ای تبدیل شده است که از آن به‌عنوان اساس شمارش، جداسازی و دستکاری سلول‌های بنیادی انسان استفاده می‌شود چرا که CD_{34}^{+} در تمایز سلول‌ها به سلول‌های بالغ، کاهش می‌یابد[۱۳-۱٤]. علاوه بر اینکه بر روی سلول‌های بنیادی و پروژینتورهای اولیّه در طول خونسازی انسانی بیان می‌شود[۱۵]. آنتی‌ژن CD_{34}^{+} در خارج از سیستم خونساز بر روی سلول‌های اندوتلیال عروق و برخی از فیبروبلاست‌ها نیز بیان می‌شود[۱٦-۱۹].

این توزیع، عملکردی را در خارج سیستم خونساز پیشنهاد می‌کند. مطالعات پیوند در گونه‌های متعدد، شامل بابون‌ها و موش‌ها نشان داد که نوسازی مغز استخوان طولانی مدت می‌تواند به وسیله

[1] SCID – repopulating Cell

[2] Long Term Culture – Initiating Cell

سلول‌های انتخاب شده از نظر CD_{34}^{+} انجام شود. بدین ترتیب تمام پروتکل‌های آزمایشگاهی و بالینی مربوطه، برای سلول‌های CD_{34}^{+} خالص شده توسط روش‌های انتخابی گوناگون، طراحی می‌شوند.

۱-۱-۳-۱-۲. سایر مارکرهای سلول بنیادی

CD_{133} پنج گلیکوپروتئین غشاء گذر مشابه (PROML1) را ارائه می‌دهد [۲۰-۲۳]. مطالعات متعدد نشان دادند که سلول‌های CD_{133}^{+} ، CD_{34}^{+} ، c-kit و سایر مارکرهای سطحی را با هم بیان می‌کنند[۲٤-۲۵]. این مطالعات به‌طور واضح نشان دادند که CD_{133} یک مارکر سطح سلولی برای شناسایی سلول‌های بنیادی خونساز انسانی است امّا اینکه چرا استفاده از این مارکر هیچ مزیتی را نسبت به CD_{34}^{+} فراهم نمی‌کند ناشناخته باقی مانده است[۲٦]. مارکر جدید دیگری که امکان جداسازی سلول‌های بنیادی خونساز انسانی را فراهم می‌کند، گیرنده ۲ فاکتور رشد عروق (KDR) می‌باشد[۲۷].

سلول KDR^{+} به‌طور واقعی Lin^{-} هستند و به‌طور کلی در جمعیت‌های خالص شده از سلول‌های بنیادی خونساز یعنی سلول‌های CD_{38}^{-} CD_{34}^{+}، CD_{90}^{+} و CD_{117}^{low} وجود دارند. گزارش شده است که سلول‌های $CD_{34}^{+}KDR^{+}$ که به میزان زیادی جدا شده، سلول‌های بنیادی خونساز قلمداد می‌شوند (SRC و E-LT C-IC یا CAFC). برعکس، پیشسازهای خونساز بدون فعالیت خود تجدیدپذیری به سلول $CD_{34}^{+}KDR^{-}$ محدود می‌شوند. نشان داده شده است که چندین مارکر دیگر در تقسیم بعدی جمعیت سلولی به جمعیت‌های یکسان از نظر عملکردی سودمند هستند مانند CD_{90} ، CD_{117} و CD_{38} [۲۸-۲۹].

۱-۱-۳-۱-۳. مارکرهای سلول‌های بنیادی خونساز موشی

مارکرهای سلول‌های بنیادی خونساز موشی شامل c-kit,sca-1 می‌باشد. سلول‌های موشی CD_{34} را بیان نکرده و CD90 را به طور ضعیف بیان می‌کنند. همچنین مارکرهای رده‌های مختلف در انسان و موش متفاوت بوده و شامل B220 , CD3 برای رده لنفوسیت، CD11b برای رده منوسیت و Gr1 برای رده گرانولوسیتی می‌باشد.

۱-۱-٤. هتروژنیتی کمپارتمنت سلول‌های بنیادی خونساز انسانی

در ابتدا، تصور می‌کردند که در انسان تنها سلول‌هایی که CD_{34}^{+} را بیان می‌کنند فعالیت سلول‌های بنیادی خونساز را از خود نشان می‌دهند به‌طوری که اغلب از سلول‌های CD_{34}^{+} برای پیوند سلول خونساز در کلینیک استفاده می‌کردند. اخیراً انواع گوناگونی از سلول‌های بنیادی خونساز انسانی را کشف کردند که CD_{34}^{+} را که بتوان ردیابی کرد، بیان نمی‌کنند. مطالعات Xenograft repopulation صورت گرفته با استفاده از جنین گوسفند و موش‌های دارای نقص ایمنی، در شناسایی سلول‌های بنیادی CD_{34}^{-} انسانی، اهمیت بسیار زیادی دارند. به‌طوری که فعالیت یا فعالیت کلونی‌زایی کمی را در جمعیت سلولی $Lin^{-}\ CD_{34}^{-}$ نشان دادند[۳۰]. با استفاده از مدل Xenograft گوسفندی، زنجانی و همکاران نشان دادند که سلولهای $Lin^{-}\ CD_{34}$ حاوی سلول‌های بنیادی هستند که قادر به repopulation طولانی مدت و تمایز به رده‌های مختلف در in vivo هستند[۳۱]. علاوه بر این، این سلول‌ها قادر به repopulate ثانویه در گیرندگان هستند، که وجود پتانسیل خود تجدید پذیری سلول‌های پیوندی را تصدیق می‌کند. در حقیقت تعداد بیشماری از سلول‌های CD_{34}^{+} در گوسفند پیوند شده، یافت شده‌اند.

این نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی موجود در بخش سلولی $Lin^{-}\ CD_{34}^{-}$ بسیار ابتدایی‌تر از سلول‌های CD_{34}^{+} هستند. با استفاده از مدل NOD/SCID ، یک سلول ایجاد کننده جمعیت خونساز انسانی جدید گزارش شده است که مارکرهای اختصاصی رده و آنتی‌ژن CD_{34}^{+} را بیان نمی‌کند[۳۲]. همانند مدل گوسفندی، تکامل سلول‌های CD_{34}^{+} همچون پیشساز تمایز یافته in vivo نشان داده است به‌طوری که CD_{34}^{-} ممکن است ابتدایی‌تر از سلول‌های بنیادی CD_{34}^{+} باشند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که وجود CD_{34}^{-} – SRC در بخش سلولی $Lin^{-}\ CD_{34}^{-}\ CD_{38}^{-}$، سلول repopulating جدیدی در سلسله خونساز انسانی ارائه می‌دهد. در حقیقت بخش سلولی $Lin^{-}\ CD_{34}^{-}$ موش‌ها و انسان‌ها حاوی سلول‌های repopulating هستند که محافظت تکاملی این جمعیت جدید از سلول بنیادی را نشان می‌دهد[۳۱-۳۲]. شناسایی CD_{34}^{-} SRC در بخش $Lin^{-}\ CD_{34}^{-}$ نشان می‌دهد که بخش سلول های