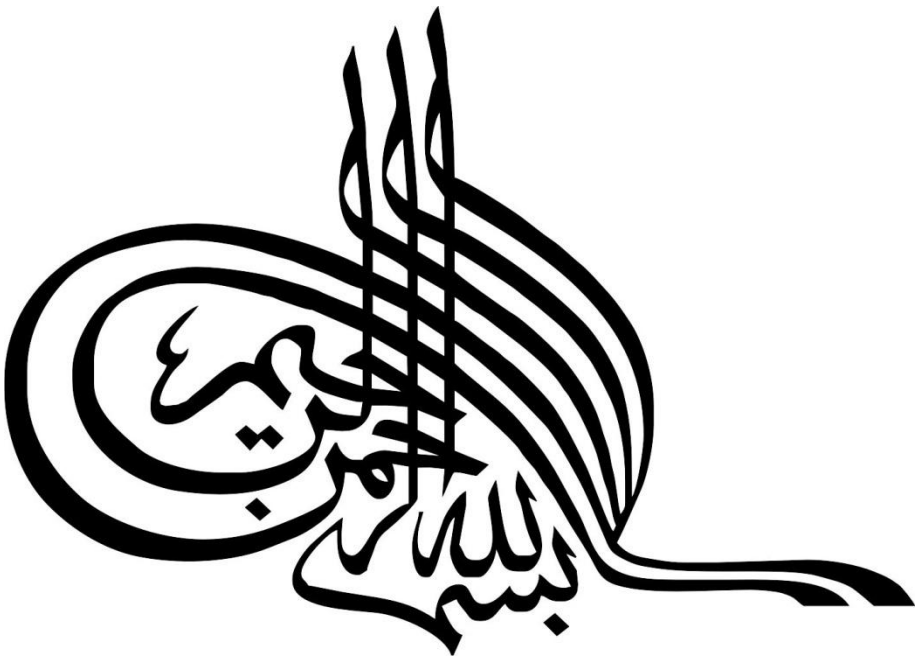

بسم الله الرحمن الرحيم

پردیس دانشگاه گیلان
گروه زیست شناسی
گرایش سلولی و مولکولی

مقایسه میزان آپوپتوز سلولهای بنیادی خونساز بند ناف تکثیر یافته در دو سیستم: تکثیر همراه با سایتوکاین و تکثیر روی سلولهای استرومال مزانشیمی

از:
رویا مهرآسا

استاد راهنما:
دکتر ناصر امیری زاده

اساتید مشاور:
دکتر حمیدرضا وزیری
دکتر آرزو اودی

شهریور ۱۳۹۲

تقدیم به

کسانی که همیشه در کنارم هستند

پدر، مادر

و

برادرم،بهنام.

از استاد راهنمای محترم، گرامی و فرهیخته ام جناب آقای دکتر ناصر امیری زاده

اساتید مشاور؛

سرکار خانم دکتر آرزو اودی که در تمام مراحل انجام این پایان نامه صبورانه در کنارم بوده اند،

جناب آقای دکتر حمیدرضا وزیری که در طول مدت تحصیل همواره مشوقم بوده اند،

اساتید گرامی؛

سرکار خانم دکتر زیور صالحی که با سعه صدر و بزرگواری راهنمایم بوده اند،

جناب آقای دکتر فرهاد مشایخی که در طول دوره تحصیل از علم ایشان بهره بسیار برده ام،

جناب آقای دکتر فرزام اعجمیان که در این دوره تحصیلی از سجایای اخلاقی ایشان بهره بسیار برده ام،

و از دوستان و اساتید گرامی در مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون خصوصا استاد گرامی سرکارخانم دکترمهین نیکو گفتار، دوستان عزیزم خانم مونا خورشیدفر، خانم ناهید نصیری و دوست مهربانم جناب آقای مهندس پویا وطن پور که در تمامی مراحل تدوین این پایان نامه صمیمانه همراهم بوده اند،

کمال سپاس را دارم.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
چکیده فارسی	ز
چکیده انگلیسی	ژ
۱- مقدمه	۲
۱-۱- سلول های بنیادی (Stem Cells)	۲
۱-۱-۱- تقسیم بندی سلول های بنیادی بر اساس توانایی تمایز	۴
۱-۱-۲- تقسیم بندی سلول های بنیادی بر اساس منشاء	۶
۱-۱-۲-۱- سلول های بنیادی جنینی (Embryonic Stem Cells)	۶
۱-۱-۲-۲- سلول های بنیادی بالغ (Adult Stem Cells)	۷
۱-۱-۳- انواع سلول های بنیادی بالغ	۷
۱-۱-۳-۱- سلول های بنیادی خونساز (Hematopietic Stem Cells)	۷
۱-۱-۳-۲- سلول های بنیادی مزانشیم (Mesenchymal Stem Cells)	۹
۱-۱-۳-۳- سلول های بنیادی عصبی (Neural Stem Cells)	۱۰
۱-۱-۳-۴- سلول های بنیادی اپیتلیال (Epithelial Stem Cells)	۱۰
۱-۱-۳-۵- سلول های بنیادی پوست (Skin Stem Cells)	۱۰
۱-۱-۴- تمایز بین بافتی(Trans-differentiation)	۱۱
۱- ۲- پیوند سلولهای بنیادی خونساز (HSCT)	۱۱
۱-۳- استراتژیهای درمانی در (HSCT)	۱۲
۱-۴- پیوند سلولهای بنیادی خونساز خون بند ناف (UCB-HSCT)	۱۳
۱-۴-۱- ویژگیهای بالینی (UCB-HSCT)	۱۳
۱-۴-۲ محدودیتهای (UCB-HSCT)	۱۴
۱-۵- تکثیر سلولهای بنیادی خونساز خون بند ناف (UCB-HSCT Expansion)	۱۵
۱-۵-۱- سایتوکاینهای مورد استفاده برای تکثیر (UCB-HSCT)	۱۶
۱-۵-۲- استفاده از سلولهای استرومال برای تکثیر سلولهای بنیادی خونساز	۱۷
۱-۶- خصوصیات سلولهای بنیادی مزانشیمال (MSCs)	۱۸
۱-۶-۱- منابع جداسازی (MSCs)	۱۸

۱-۶-۲- چند قوه ای بودن (MSCs) ۱۹
۱-۶-۳- مارکرهای سطحی و پروتئینهای بیان شونده در (MSCs) ۱۹
۱-۶-۴- افزایش بقا پیوند توسط (MSCs) ۲۰
۱-۷- چرخه سلولی (Cell Cycle) ۲۰
۱-۷-۱- چرخه سلولی در سلول های بنیادی خونساز ۲۲
۱-۸- نیچ (Niche) مغز استخوان ۲۲
۱-۹- فاکتورهای موثر بر حفظ خصوصیات همانند سازی و بقا (HSCs) ۲۴
۱-۱۰- مرگ برنامه ریزی شده سلول (Apoptosis) ۲۷
۱-۱۰-۱- آپوپتوز در سلول های بنیادی خونساز (HSCs) ۳۱
۱-۱۱- اهداف پایان نامه ۳۲
۲- مواد و روشها ۳۴
۲-۱- فهرست مواد مورد نیاز ۳۴
۲-۲- فهرست تجهیزات مورد نیاز ۳۶
۲-۳- آماده کردن بافرها و محیط های مورد استفاده ۳۸
۲-۳-۱- تهیه محیط کشت (DMEM-Low Glucose) ۳۸
۲-۳-۲- تهیه محیط تمایزی استئوبلاستی ۳۸
۲-۴- جداسازی سلولهای بنیادی ۳۹
۲-۴-۱- جداسازی سلولهای تک هسته ای (MNC) از خون بند ناف ۳۹
۲-۴-۲- جداسازی سلولهای CD_{34}^{+} از خون بند ناف به روش MACS ۳۹
۲-۴-۳- ارزیابی درجه خلوص سلولهای CD_{34}^{+} جدا شده از خون بند ناف با استفاده از روش فلوسایتومتری ۴۰
۲-۴-۴- جدا سازی سلول های بنیادی مزانشیمی از نمونه مغز استخوان ۴۰
۲-۴-۵- تعیین درصد زنده بودن سلولهای بنیادی مزانشیمی ۴۱
۲-۴-۶- تریپسینه کردن سلولهای بنیادی مزانشیمی ۴۱
۲-۴-۷- کشت و تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیمی ۴۲
۲-۴-۸- نحوه فریز کردن سلولهای بنیادی مزانشیمی ۴۲
۲-۴-۹- فلوسایتومتری برای بررسی مارکرهای سطحی سلولهای بنیادی مزانشیمی ۴۳

۲-۴-۱۰- تعیین خصوصیات تمایزی سلولهای مزانشیمی (تمایز به رده استئوبلاستی)..... ۴۴
۲-۴-۱۱- رنگ آمیزی آلیزارین رد..... ۴۴
۲-۴-۱۲- رنگ آمیزی آلکالن فسفاتاز..... ۴۴
۲-۵- کشت سلولهای بنیادی..... ۴۵
۲-۵-۱- کشت سلولهای CD_{34}^{+} جدا شده از خون بند ناف در محیط حاوی سایتو کاین..... ۴۵
۲-۵-۲- کشت سلولهای CD_{34}^{+} جدا شده از خون بند ناف بر روی لایه سلولهای مزانشیمی (هم کشتی).. ۴۵
۲-۵-۳- روش سنجش کلونی (CFU-assay)..... ۴۶
۲-۶- بررسی چرخه سلولی سلول های CD_{34}^{+} تکثیر یافته جدا شده از خون بند ناف توسط فلوسایتومتری با رنگ آمیزی پروپیدیوم آیوداید (PI)..... ۴۶
۲-۷- بررسی میزان آپوپتوز سلول های CD_{34}^{+} تکثیر یافته جدا شده از خون بند ناف توسط فلو سایتومتری با رنگ آمیزی انکسین V..... ۴۷
۳- نتایج..... ۴۹
۳-۱- جداسازی و تکثیر سلول های مزانشیمی..... ۴۹
۳-۱-۱- ارزیابی توانائی تمایز سلول های مزانشیمی به استئوبلاست..... ۴۹
۳-۱-۲- تایید ماهیت سلولهای بنیادی مزانشیمی با استفاده از فلوسایتومتری..... ۵۰
۳-۲- ارزیابی درجه خلوص سلولهای CD_{34}^{+} جدا شده از خون بند ناف با استفاده از فلو سایتو متری..... ۵۲
۳-۳- تکثیر (Expansion) سلولهای CD_{34}^{+} جدا شده از خون بند ناف..... ۵۳
۳-۳-۱- بررسی میزان تکثیر (Expansion) کل سلولهای هسته دار(TNC) جدا شده از خون بند ناف در محیط کشت حاوی سایتو کاین بدون لایه استرومال مزانشیمی..... ۵۴
۳-۳-۲- بررسی میزان تکثیر (Expansion) سلولهای CD_{34}^{+} جدا شده از خون بند ناف در محیط کشت حاوی سایتو کاین بدون لایه استرومال مزانشیمی..... ۵۵
۳-۳-۳- بررسی میزان تکثیر کل سلولهای هسته دار(TNC) جدا شده از خون بند ناف در محیط هم کشتی با لایه استرومال مزانشیمی دارای سایتو کاین..... ۵۶
۳-۳-۴- بررسی میزان تکثیر (Expansion) سلولهای CD_{34}^{+} جدا شده از خون بند ناف در محیط هم کشتی با لایه استرومال مزانشیمی دارای سایتو کاین..... ۵۷
۳-۳-۵- بررسی میزان تکثیر (Expansion) سلولهای CD_{34}^{+} و TNC جدا شده از خون بند ناف در محیط هم کشتی با لایه استرومال مزانشیمی بدون سایتو کاین..... ۵۸

۳-۳-۶- مقایسه میزان تکثیر کل سلولهای هسته دار(TNC) جدا شده از خون بند ناف در شرایط مختلف کشت (سایتوکاینی، لایه استرومال مزانشیمی)..... ۵۹
۳-۳-۷- مقایسه میزان تکثیر (Expansion) سلولهای CD_{34}^{+} جدا شده از خون بند ناف در شرایط مختلف کشت (سایتوکاینی، لایه استرومال مزانشیمی)..... ۶۰
۳-۳-۸- بررسی و مقایسه میزان توان کلنی زائی (CFU-assay) سلولهای CD_{34}^{+} جدا شده از خون بند ناف تازه و تکثیر شده در شرایط مختلف کشت..... ۶۱
۳-۴- بررسی و مقایسه چرخه سلولی سلول های CD_{34}^{+} جدا شده از خون بند ناف تکثیر یافته در شرایط مختلف کشت..... ۶۲
۳-۵- بررسی و مقایسه میزان آپوپتوز سلول های CD_{34}^{+} جدا شده از خون بند ناف تکثیر یافته در شرایط مختلف کشت..... ۶۴
۴- بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادات..... ۶۷
۴-۱- بحث..... ۶۷
۴-۲- نتیجه گیری..... ۷۱
۴-۳- پیشنهادات..... ۷۲
فهرست منابع..... ۷۴

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱- پروتئین های مسیر خارجی آپوپتوز، اختصارات و مجموعه لغات جانبی..... ۲۸

جدول ۱-۲- پروتئین های مسیر داخلی آپوپتوز، اختصارات و مجموعه لغات جانبی..... ۳۰

جدول ۳-۱- مشخصات سلول های CD_{34}^{+} جدا شده از خون بند ناف به صورت (n=3) Mean±SD..... ۵۲

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار ۳-۱- میزان چند برابر شدن کل سلولهای هسته دار جدا شده از خون بند ناف در محیط کشت حاوی سایتوکاین بدون لایه استرومال در روزهای مختلف کشت..... ۵۵

نمودار ۳-۲- میزان چند برابر شدن سلولهای CD_{34}^{+} جدا شده از خون بند ناف در محیط کشت حاوی سایتوکاین بدون لایه استرومال در روزهای مختلف کشت..... ۵۶

نمودار ۳-۳- میزان چند برابر شدن کل سلولهای هسته دار جدا شده از خون بند ناف در محیط هم کشتی با لایه استرومال حاوی سایتوکاین در روزهای مختلف کشت..... ۵۷

نمودار ۳-۴- میزان چند برابر شدن سلولهای CD_{34}^{+} جدا شده از خون بند ناف در محیط هم کشتی با لایه استرومال حاوی سایتوکاین در روزهای مختلف کشت..... ۵۸

نمودار ۳-۵- میزان چند برابر شدن سلولهای CD_{34}^{+} جدا شده از خون بند ناف در محیط هم کشتی با لایه استرومال بدون سایتوکاین در روزهای مختلف کشت..... ۵۹

نمودار ۳-۶- مقایسه میزان چند برابر شدن کل سلولهای هسته دار (TNC)جدا شده از خون بند ناف در شرایط مختلف کشت..... ۶۰

نمودار ۳-۷- مقایسه میزان چند برابر شدن سلولهای CD_{34}^{+} جدا شده از خون بند ناف در شرایط مختلف کشت..... ۶۱

نمودار ۳-۸- مقایسه توان کلنی زائی (CFU-assay) سلولهای CD_{34}^{+} جدا شده از خون بند ناف پس از ۱۰ روز تکثیر در شرایط مختلف کشت..... ۶۲

نمودار ۳-۹- مقایسه چرخه سلولی سلول های CD_{34}^{+} جدا شده از خون بند ناف پس از ۱۰ روز تکثیر در شرایط مختلف کشت..... ۶۴

نمودار ۳- ۱۰- مقایسه میزان آپوپتوز سلول های های CD_{34}^{+} جدا شده از خون بند ناف پس از ۱۰ روز تکثیر در شرایط مختلف کشت..... ۶۵

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- ویژگی ها و منابع سلول های بنیادی ۲

شکل ۱-۲- خود نو سازی سلول های بنیادی ۳

شکل ۱-۳- سلسله مراتب سلول های بنیادی ۵

شکل ۱-۴- توانائی تمایز سلول های بنیادی جنینی ۶

شکل ۱-۵- سلول های بنیادی خونساز ۸

شکل ۱-۶- سلول های بنیادی مزانشیمی ۹

شکل ۱-۷- چرخه سلولی ۲۱

شکل ۱-۸- Prevascular & Endosteal Niche ۲۳

شکل ۱-۹- نقش Niche استئوبلاستی در تنظیم حالت سکون HSC ۲۶

شکل ۱-۱۰- مسیرها و رخدادهای آپوپتوز ۲۷

شکل ۳-۱- نمائی از سلول های مزانشیمی در روزهای مختلف کشت ۴۹

شکل ۳-۲- رنگ آمیزی آلیزارین رد و آلکالن فسفاتاز ۵۰

شکل ۳-۳- بررسی بیان مارکرهای سطحی سلولهای مزانشیمی مغز استخوان با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری ۵۱

شکل ۳-۴- بررسی مارکرهای CD_{34} و CD_{38} سلولهای بنیادی خونساز جدا شده از خون بند ناف با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری ۵۲

شکل ۳-۵- تصویر میکروسکوپی هم کشتی سلولهای خونساز و لایه استرومال مزانشیمی در محیط حاوی سایتوکاین ۵۳

شکل ۳-۶- بررسی مارکرهای CD_{34} و CD_{38} سلولهای بنیادی خونساز خون بند ناف پس از ۱۰ روز تکثیر در شرایط مختلف کشت ۵۴

شکل ۳-۷- تصاویر میکروسکوپی CFU-assay در محیط متاکالت (بزرگنمائی ×۴۰) ۶۲

شکل ۳-۸- بررسی چرخه سلولی سلول های CD_{34}^{+} جدا شده از خون بند ناف پس از ۱۰ روز تکثیر در شرایط مختلف کشت ۶۳

شکل ۳-۹- بررسی میزان آپوپتوز سلول های CD_{34}^{+} جدا شده از خون بند ناف پس از ۱۰ روز تکثیر در شرایط مختلف کشت ۶۵

چکیده:

مقایسه میزان آپوپتوز سلولهای بنیادی خونساز بندناف تکثیر یافته در دو سیستم : تکثیر همراه با سایتوکاین و تکثیر روی سلولهای استرومال مزانشیمی.

رویا مهرآسا

خون بند ناف (UCB) به عنوان یک منبع از سلول های بنیادی خونساز (HSC) در درمان بیماری های خونی استفاده می شود. به دلیل ناکافی بودن تعداد سلول های CD_{34}^{+} خون بند ناف و کاربرد این منبع سلولی در پزشکی، تکثیر این سلول ها در دارای اهمیت می باشد. سلول های استرومائی مزانشیمی (MSC_s) در حفظ و نگهداری HSC_s نقش مهمی داشته و به عنوان لایه تغذیه کننده در تکثیر HSCs جدا شده از خون بند ناف مورد استفاده قرار می گیرند. در این تحقیق آپوپتوز و توزیع چرخه سلولی سلول های تکثیر یافته در شرایط هم کشتی با MSC_s و سایتوکاین ها آنالیز و نتایج مقایسه گردید.

کشت آزمایشگاهی $CB\text{-}HSC_s$ در سه شرایط مختلف برای ۱۴ روز انجام گردید:

سایتوکاین ها (SCF,TPO,Flt_3L) با MSC_s، سایتوکاین ها بدون MSC_s و هم کشتی با MSC_s بدون سایتوکاین ها. تکثیر از طریق اندازه گیری کل سلول های هسته دار (TNC_s)، سلول های CD_{34}^{+} و واحد شکل گیری کلونی (CFU) پیگیری گردید. آنالیز سلول ها توسط رنگ آمیزی انکسین V و پروپیدیوم آیوداید به منظور تعیین میزان آپوپتوز و توزیع چرخه سلولی در سلول های تکثیر شده انجام گردید.

بیشترین تکثیر سلول های CD_{34}^{+} در روز ۱۰ام تکثیر مشاهده گردید. میانگین تغییرات TNC و سلول های CD_{34}^{+} در روز ۱۰ام در سیستم هم کشتی با سایتوکاین ها مشخصاً بیشتر از کشت سایتوکاینی بدون MSC_s و سیستم هم کشتی بدون سایتوکاین ها بود ($n=6$, $p<0.05$).

بیشترین میزان آپوپتوز و کمترین تعداد سلول ها در فاز G_0/G_1 در شرایط کشت با سایتوکاین بدون لایه تغذیه کننده مشاهده گردید ($P<0.005$).

تکثیر HSC_s خون بند ناف روی MSC_s منجر به تکثیر بیشتر سلول ها و کاهش میزان آپوپتوز گردید.

کلید واژه: تکثیر بند ناف، آپوپتوز، هم کشتی، سلول بنیادی مزانشیم.

Abstract:

Comparison of apoptosis rate in expanded cord blood hematopoietic stem cells in two systems: expansion with cytokines and co-cultured with mesenchymal stromal cell

Roya Mehrasa

Background: Umbilical cord blood (UCB) has been used as a source of hematopoietic stem cells (HSC) for transplantation in hematologic diseases. Because of insufficient number of cord blood CD34+ cells, expansion of these cells seems to be important for clinical application.

Mesenchymal stromal cells (MSCs), playing an important role in HSCs maintenance, were used as the feeder layer. Apoptosis and cell cycle distribution of expanded cells were analyzed in MSCs co-culture and Cytokine conditions and results were compared.

Methods: Ex vivo cultures of CB-HSCs were performed in three culture conditions for 14 days: cytokines (SCF, TPO and Flt3L) with MSCs feeder layer, cytokines without MSCs feeder layer and co-culture with MSCs without cytokines. Expansion was followed by measuring total nucleated cells (TNCs), $CD34^+$ cells and colony-forming unit (CFU) output. Flow cytometric analysis of stained cells by anexin V and propidium iodide was performed to detection of apoptosis rate and cell cycle distribution in expanded cells.

Results: Maximum CB-$CD34^+$ cells expansion was observed in day 10 of expansion. The mean fold change of TNC and CD34+ cells at day 10 in the co-culture system with cytokines was significantly higher than the cytokine culture without MSCs feeder layer and co-culture system without cytokines ($n=6$, $P<0.05$).

The highest apoptosis rate and the least number of cells in Go/G1 phase were observed in cytokine culture without feeder layer ($p<0.005$).

Conclusion: expansion of cord blood HSCs on MSCs as a feeder layer resulted in higher cell gain and reduction apoptosis rate.

Key words: Cord blood expansion, apoptosis, co-culture, mesenchymal stem cell

فصل اول

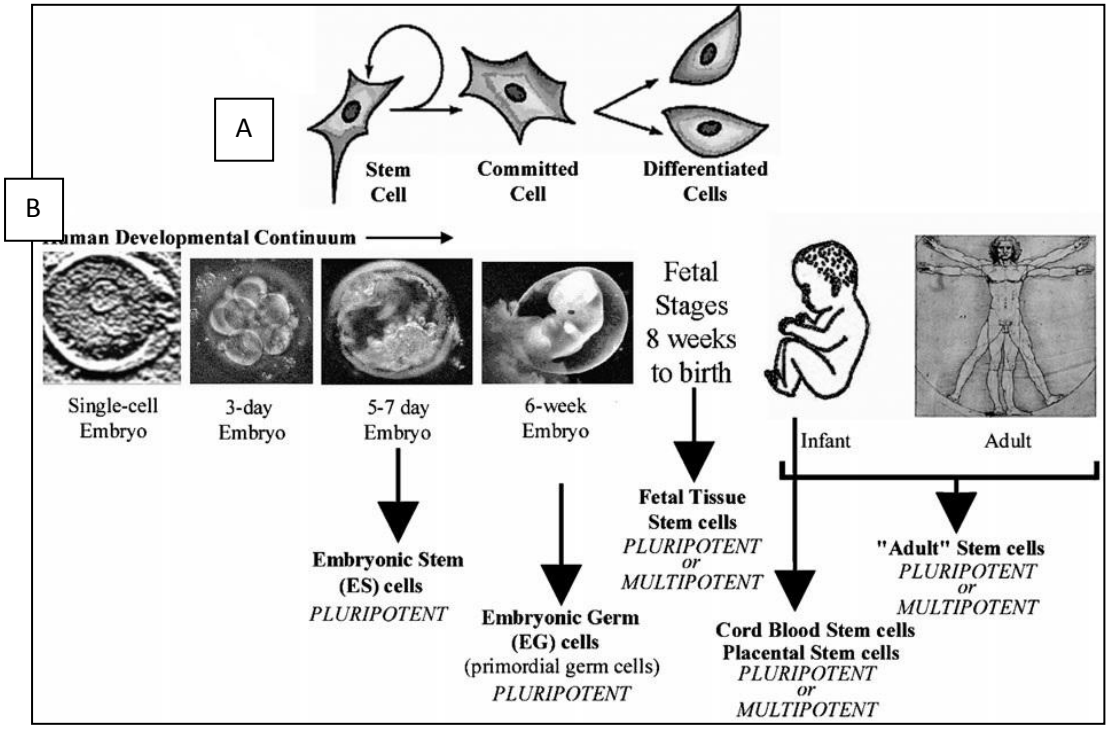
مقدمه

و بازنگری متون

۱- مقدمه:

۱-۱- سلول های بنیادی (Stem cells):

سلول بنیادی به عنوان یک سلول با قابلیت بالای خودنوسازی (Self renewallity) و نیز در عین حال تولید سلول هـای بـالغ با عملکرد اختصاصی - در واقع سلول های اختصاصی ارگان - تعریف می گـردد. سلول های بنیادی را می توان از بافـت هـــای مختلف بدن انسان در تمـام مراحل زندگی، قبل و بعد از تولد بدست آورد (شکل ۱-۱) (Gabi Nindl Waite, 2007).



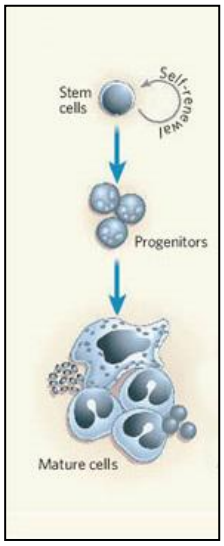
شکل ۱-۱- ویژگی ها و منابع سلول های بنیادی. A) سلولهای بنیادی یک ذخیره از سلولهای حاضر و قابـل دسـترس را از طریق تکثیر مداوم ایجاد می کنند و به پیام ها برای تمایز به انواع مختلف سلولهای تخصص یافته پاسـخ مـی دهنـد.B) منـابع سلولهای بنیادی شامل: جنین اولیه، سلولهای جوانه جنینی، سایر بافتهای جنینی، بند ناف، خون بند ناف، جفت و بافتهای بعـد از تولد می باشد (Gabi Nindl Waite, 2007).

همه سلول های بنیـادی صرف نظر از منشأ دارای ۳ خصوصیت کلی می باشند:

الف) قابلیت تقسیم شدن و خود نوسـازی طولانی مدت (Long-term self renewal):

سلول های بنیـادی به صـورت مداوم و نامتقـارن(Asymmetric) تقسیم می گردند. یکی از دو سلول خواهری بـا خصوصـیات سلول بنیادی(Stemness) و کاملاً شبیه به سلول مادر اولیه باقی می ماند. این خصوصیت جهت حفظ منبع سلول های بنیادی امری ضروری است و به پلاریزاسیون دوک میتوز و موقعیت نسبی آن در حین تقسیم سلولی بسـتگی داشـته تـا اینکـه سـلول

دختر ناشی از تقسیم اجزای سلولی مشابه و یا بسیار متفاوتی را بـه ارث ببـرد. ایـن در حالـــی اسـت کـه سـلول دیگـر جهـت تقسیمات بعدی و تولید سلول هـای اختصاصی تر انتخاب می شود (شکل ۱-۲) (Murrell et al., 2005).



شکل ۱-۲- خود نو سازی سلول های بنیادی. سلولهای بنیادی نرمال تنها سلولهایی هستند که در تمام طول عمر یک موجود خودنوسازی(یکی از دو سلول خواهری کاملا شبیه سلول مادر اولیه باقی می ماند) انجام می دهند و جمعیت های سلولی بالغ را که برای عملکرد بافت و نگهداری آن لازم است را تولید می کند (Passegue, 2006).

ب) غیر تمایز یافته می باشند:

این سلول ها از هیچ ساختار اختصاصی بافتی، که باعث عملکردی اختصاصی شود، برخوردار نمی باشند. بـه عنـوان مثـال یـک سلول بنیادی نمی تواند همراه با سلول مجاورش (مثل یک سلول ماهیچه قلب) عمل پمپ کردن خون بـه تمـام بـدن را انجـام دهد یا مانند گلبول قرمز خون، مولکول های اکسیژن را در جریان خون حمل نماید. این در حالی است که همین سـلول هـای بنیـادی غیر تمایز یافته دارای توانایـی ایجاد سلول های اختصاصی از جمله سلول های ماهیچه قلب، سلول هـای خـونی و نیـز عصبی می باشند (Murrell et al., 2005).

پ) قابلیت ایجاد انواع سلول های اختصاصی:

این سلول ها می توانند سلول های پیشساز و در نهایت سلول های بالغ تمایز یافته را به وجود آوردند. در واقع وقتی که یک سلول بنیادی غیر اختصاصی، سلول های اختصاصی را ایجاد می نماید، این فرآیند تمایز (Differentiation) نامیده می شود. در مسیر تمایز، سلول معمولاً مراحل مختلفی را طی نموده و در هر مرحله اختصاصی تر می گردد. سیگنال های داخلی و خارجی متفاوتی وجود دارند که هر کدام از مراحل مذکور را پیش می برند. پیام های داخلی توسط ژن های سلولی که در سراسر رشته های بلند DNA پراکنده می باشند و دستورالعمل های کد شده جهت همه عملکردها و ساختارهای سلولی را حمل می نمایند، کنترل می گردد. پیام های خارجی دخیل در تمایز سلولی شامل مواد شیمیایی مترشحه از سایر سلول ها، تماس های فیزیکی با سلول های مجاور و مولکول های معین در ریز محیط (Microenvironment) - مولکول های ترکیباتی مانند یک ماده غذایی و فاکتورهای رشد موجود در مایع بین سلولی در یک ارگانیسم که نقش مهمی را در تعیین خصوصیات یک سلول ایفا می نمایند - می باشند. برهمکنش های پیام ها در طی تمایز سبب می گردد که DNA سلولی مارکرهای اپی ژنتیک(Epigenic) - پروتئین های تنظیمی که ژن ها را در طی تقسیم سلولی خاموش یا روشن می کنند - را کسب نموده تا بیان DNA در سلول ها و به دنبال آن تقسیم سلولی محدود گردد. لازم به ذکر است که سلول های بنیادی از قابلیت بازسازی یک بافت معین در بدن برخوردار می باشند. جهت این امر، سلول های بنیادی در بافت های معین جایگزین می شوند که بتوانند در پاسخ به عوامل اختصاصی به سمت تمایز به سلول های آن بافت پیش روند و عملکرد آن بافت را به دست می آورند (Murrell et al., 2005).

۱-۱-۱- تقسیم بندی سلول های بنیادی بر اساس توانایی تمایز:

الف) Totipotent Stem Cell:

این سلول های بنیادی از توانایی ایجاد همه انواع سلول های بدن و نیز انواع سلول هایی که بافت های خارج جنینی (Extra-embryonic) از جمله جفت (Placenta) را می سازند، برخوردار می باشند (شکل ۱-۳) (Thomson et al., 1998).

ب) Pluripotent Stem Cell:

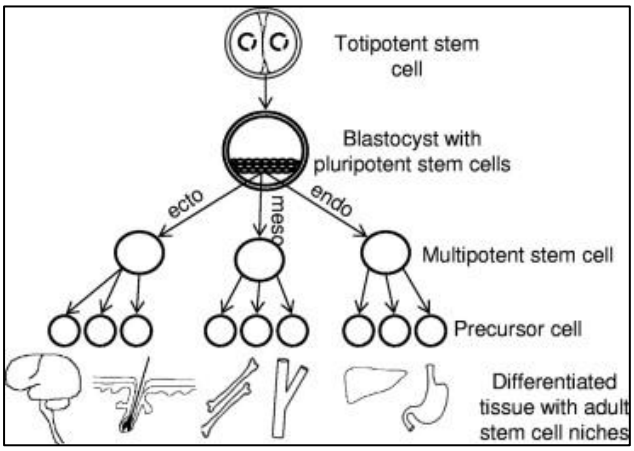
این سلول ها توانایی ایجاد همه انواع مختلف سلولی بدن را داشته ولی نمی توانند بافت های خارج جنینی از جمله آمنیون(Amnion)، کوریون (Chorion) و دیگر اجزای جفت را تولید نمایند (شکل ۱-۳) (Gabi Nindl Waite, 2007).

پ) Multipotent Stem Cell:

توانایی تولید بیش از یک نوع سلول بدن - تعداد کمی از سلول ها و بافت ها - ویژگی این نوع سلول بنیادی می باشد که به طور معمول به یک لایه زاینده ویژه از جمله سلول های استرومای مغز استخوان و یا سلول های بنیادی مزانشیمی محدود می گردد شکل (۱-۳) (Caveleri and Scholar, 2003).

ت) Unipotent Stem Cell:

این نوع از سلول های بنیادی تنها توانایی تمایز به یک رده سلولی را دارا می باشند (شکل ۱-۳) (Thomson et al., 1998).



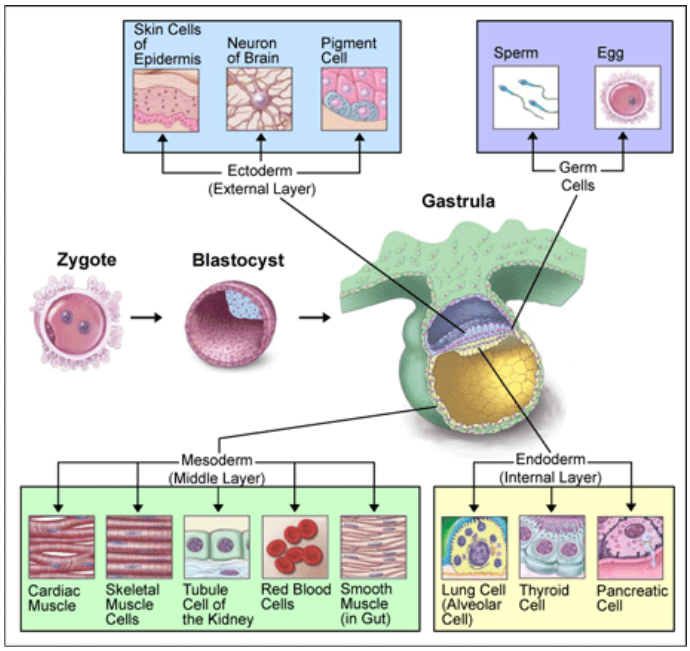
شکل ۱-۳- سلسله مراتب سلولهای بنیادی. سلولهای Totipotent می توانند همه انواع سلولهای بدن را تولید کنند، سلولهای Pluripotent می توانند همه انواع سلولهای بدن به جز سلولهای تروفوبلاست را تولید کنند، سلولهای Multipotent می توانند سلولهای یکی از سه لایه زاینده و سلولهای پیشساز را تولید کنند و سلولهای Unipotent متعهد به تولید یک سلول نهائی و تمایز یافته در یک بافت می باشد (Ritfeld et al., 2011).

۱-۱-۲- تقسیم بندی سلول های بنیادی بر اساس منشأ:

۱-۱-۲-۱- سلول های بنیادی جنینی (Embryonic Stem Cell):

سلول های اولیه غیر تمایز یافته مشتق از جنین قبل از مرحله لانه گزینی (۵ روزه) می باشند که در انسان human Embryonic Stem Cell (hESCs) نامیده می شوند و در واقع سلول های بنیادی Pluripotent می باشند که از جنین انسانی در مرحله بلاستوسیست (Blastocyst) (مرحله جنینی قبل از لانه گزینی با حدود ۱۵۰ سلول که از طریق تقسیم سلولی متعاقب لقاح پدید می آید.) مشتق می شوند. بلاستوسیست در واقع جسمی کروی متشکل از یک لایه خارجی از سلول به نام تروفوبلاست (Trophoblast)، حفره ای پر از مایع(Blastocael) و توده داخلی سلولی(Inner Cell Mass) می باشد و می تواند به سلول های هر سه لایه جنینی شامل اکتودرم، مزودرم و اندودرم تبدیل گردد.

hESC قادر به تقسیم طویل المدت و بدون تمایز در محیط کشت می باشد. در حقیقت تنها سلول های بنیادی که می توانند در محیط کشت تکثیر یابند بدون اینکه خصایص بنیادی خود را از دست دهند، سلول های بنیادی جنینی هستند (Rossant, 2007; Schenke-Layland et al., 2007).



شکل ۱-۴- توانائی تمایز سلول های بنیادی جنینی. سلولهای بنیادی جنینی توانائی تولید تمام اندامها و ارگانهای یک موجود زنده را دارند (Winslow and Duckwall, 2001).

۱-۱-۲-۲- سلول های بنیادی بالغ (Adult Stem Cells):

این سلول های بنیادی، سلول های تمایز نیافته و نسبتاً کمیاب می باشند که در بسیاری از ارگان ها و بافت های تمایز یافته از جمله مغز استخوان، خون محیطی، عروق خونی، ماهیچه اسکلتی، پوست، دندان، قلب، روده، کبد، اپیتلیال تخمدان و بیضه حضور دارند و دارای ظرفیتی محدود جهت خودنوسازی و تمایز هستند. این سلول ها در ظرفیت تمایزی با یکدیگر متفاوت می باشند ولی معمولاً به سلول های مختلفی در ارگان منشأ تمایز می یابند. به عبارت دیگر سلول های بنیادی بالغ سلول هایی تمایز نیافته می باشند که در میان سلول های تمایز یافته در یک بافت یا ارگان یافت می گردند. سلول های مذکور از بخش های مختلف بدن مشتق شده و برحسب محل جداسازی دارای خصوصیات متفاوت می باشند. عقیده بر این است که این سلول ها در یک ناحیه اختصاصی از هر بافت به نام نیچ سلول های بنیادی (Stem Cells Niche) حضور دارند و برای مدت طولانی به صورت خاموش (Quiescent) و غیر قابل تقسیم باقی مانده تا در صورت نیاز جهت تولید سلول های بیشتر برای حفظ بقای بافت یا در صورت بیماری یا آسیب بافتی فعال گردند. نقش اولیه این سلول ها در یک ارگانیسم زنده حفظ بقا و ترمیم بافتی است که در آن یافت می گردند (Gabi Nindl Waite, 2007).

۱-۱-۳- انواع سلول های بنیادی بالغ:

در یک حیوان زنده سلول های بنیادی بالغ به منظور تقسیم برای دوره ای طولانی در دسترس می باشند و در هنگام نیاز قادرند انواع سلول های بالغ با شکل، ساختار و عملکرد اختصاصی یک بافت خاص را ایجاد نمایند. انواع سلول های بنیادی بالغ هم در بدن(in-vivo) و هم در محیط کشت (in-vitro) شناسایی شده اند.

۱-۱-۳-۱- سلول های بنیادی خونساز (Hematopoietic stem cell):

این سلول های بنیادی Pluripotent بوده و انواع مختلف سلول های خونی شامل گلبول قرمز (Red Blood Cell)، لنفوسیت B (B.Lymphocyte)، لنفوسیت T (T.Lymphocyte)، سلول های کشنده طبیعی (Natural Killer Cells)، نوتروفیل (Neutrophil)، بازوفیل (Basophil)، ائوزینوفیل (Eosinophil)، منوسیت (Monocyte) و