بسم الله الرحمن الرحيم

١٥٩٨٧٦

سازمان انتقال خون ایران

موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد خون شناسی و انتقال خون

عنوان:

دست ورزی ژنتیکی سلول های بنیادی مزانشیمال با بیان موقت ژن حفاظت کننده سلولی HO-1

Genetic manipulation of MSCs with transient expression of cytoprotection gene , HO-1

استاد راهنما: دکتر مهریار حبیبی رودکنار

اساتید مشاور: دکتر ناصر امیری زاده، محمد محمدزاده وردین

نگارش: پژمان حامدی اصل

تاریخ: ۱۳۹۰/۲/۷

شماره:۶۸

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
پژوهشگاه علوم و فناوری اطلاعات ایران
مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
IRANDOC

۱۳۹۰/۳/۲۲

۱۵۹۵۷۶

به پاس عاطفه ی سرشارش

که در این برهوت بدگمانی و شک

چون شبچراغی می درخشد و روح را از تنهایی و نومیدی رهایی می دهد؛

و گرمای امید بخش اش

که در این سردترین روزگاران

ناباوری را تخطئه می کند

تقدیم

به استاد عزیز و مهربانم *دکتر مهریار حبیبی رودکنار*

تقدیر و تشکر:

بر خود لازم می دانم که از رئیس محترم سازمان انتقال خون ایران جناب آقای دکتر ابوالقاسمی و نیز معاون محترم آموزشی و پژوهشی سازمان انتقال خون ایران جناب آقای دکتر قره باغیان که لطف شان همواره شامل حال ما دانشجویان بوده و با تلاش بی وقفه امکانات پژوهشی و تحصیلی را فراهم نمودند سپاسگزاری کنم.

از استاد عزیزم دکتر مهریار حبیبی رودکنار که درس علم و پژوهش و نیز درس اخلاق و زندگی را به من آموختند کمال تشکر و قدردانی خود را ابراز می نمایم.

همچنین از اساتید مشاورم جناب آقای دکتر ناصر امیری زاده و جناب آقای دکتر محمد محمدزاده که در تمام مراحل پایان نامه از راهنمایی ها و تجربه و از دانش بسیارشان مرا بهره مند ساختند تشکر و قدردانی می شود.

از جناب آقای دکتر محمد علی جلیلی و جناب آقای دکتر حسین تیموری که همیشه مشوق بنده حقیر بودند و مرا مورد لطف و عنایت خود قرار دادند صمیمانه تشکر می نمایم.

لازم میدانم از خانم راحله حلبیان و خانم مهشید محمدی پور که در تمام مراحل کارهای تحقیقاتی با دقت و حوصله فراوان مرا صمیمانه یاری نمودند نهایت قدردانی و تشکر خود را ابراز نمایم.

همچنین از همکلاسی های خوبم به ویژه خانم شیما آزادپور و خانم زهرا بخشنده که همکاری و همفکری نزدیکی با بنده داشتند صمیمانه تشکر می نمایم.

لازم می دانم مراتب تشکر و قدردانی خود را از تمامی همکاران و دوستان عزیزم از جمله دکتر علی اصغر کیانی، دکتر کامران عطاردی، دکتر سلطانپور، یحیی یحیوی، مهدی عدالتی، محمد حسین محمدی، مجید ابراهیمی، رضا رنجبران، اکبر هاشمی، خانم دکتر آرزو اودی، خانم مریم امانی، خانم مونا خورشیدفر، خانم بهمنی، خانم جعفری و تمامی اساتید گرامی و ارجمندم و پرسنل آموزشی و پژوهشی و کتابخانه سازمان انتقال خون ایران و بقیه دوستان ابراز نمایم.

در پایان از برادر خوب و مهربانم داریوش حامدی اصل که در مراحل مختلف تحصیل و زندگی یار و یاور و حامی و پشتیبانم بوده است نهایت قدردانی و تشکر خود را ابراز می نمایم.

دست ورزی ژنتیکی سلول های بنیادی مزانشیمال با بیان موقت ژن حفاظت کننده سلولی HO-1

چکیده پژوهش

مقدمه:

سلول های بنیادی مزانشیمال (MSCs) بدلیل سهولت در جداسازی و تکثیر آسان در ex vivo و ظرفیت تمایزی به رده های مختلف سلولی و نیز نقش حمایتی در خونسازی بعنوان یک منبع سلولی ایده آل برای پیوند بکار می روند. در طی فرآیند پردازش و آماده سازی، MSCs بطور اجتناب ناپذیری متحمل شرایط فقدان سرم و هایپوکسی می شوند. از طرف دیگر ، میزان بقاء سلولی بعد از پیوند کاهش می یابد ، برای مثال ، در سکته قلبی در طی روزهای نخستین پیوند تنها عملکرد نواحی حاشیه ای قلب بهبود می یابد. بنابراین ضروری است که مقاومت MSCs را در برابر شرایط سخت ریز محیط پیوندی که به موجب ایسکمی ،هایپوکسی ،پاسخ های التهابی و فاکتورهای پروآپوپتوتیک ایجاد می شوند را افزایش دهیم تا بدین وسیله کارآیی درمان سلولی را بهبود دهیم.

هدف:

در این مطالعه ، بمنظور دستیابی به اهدافی که اشاره کردیم ما MSCs را به یک عامل سایتوپروتکتیو قوی مانند " هم اکسیژناز " (HO-1) مجهز می کنیم.

مواد و روش‌ها:

به منظور القاء HO-1، رده سلولی A549 را در معرض اشعه UV قرار دادیم. cDNA کامل HO-1 را بوسیله پرایمرهای اختصاصی جداسازی کردیم و به وکتور پروکاریوتی TOPO با استفاده از واکنش کلونینگ TOPO کلون کردیم. سپس بوسیله واکنش نوترکیبی LR ژن هدف به وکتور بیانی آدنوویروس منطبق با سیستم Gateway انتقال داده شد. ویروس نوترکیب در رده سلولی یوکاریوتی مناسب ساخته شد. MSCs بوسیله ویروس نوترکیب بیان کننده HO-1 آلوده سازی شدند. سلول های دست ورزی شده با HO-1 را بمنظور ارزیابی بقاء سلولی و آپوپتوز با شرایط هایپوکسی، فقر سرمی و استرس های اکسیداتیو مواجه کردیم.

یافته‌ها:

MSCs آلوده شده با آدنوویروس نوترکیب بیان کننده HO-1 از طریق آنالیزهای RT-PCR و وسترن بلات بررسی شدند. بعد از مواجهه با شرایط هایپوکسی، فقر سرمی و استرس های اکسیداتیو، سلول های دست ورزی شده با HO-1 در مقایسه با کنترل بقاء سلولی بیشتر و آپوپتوز کمتری داشتند.

MSCs-HO-1 ظرفیت تمایزی به رده های آدیپوسیت و اوستئوبلاست را حفظ کردند.

نتیجه‌گیری:

بیان موقت HO-1 در MSCs، بقاء سلولی در برابر استرس هایی که بطور اجتناب ناپذیری MSCs با آنها مواجه می شوند را افزایش می دهد و ممکن است منجر به پیشبرد کارآیی درمان سلولی شود.

کلمات کلیدی:

MSCs ، HO-1، استرس اکسیداتیو، هایپوکسی، فقر سرمی، آپوپتوز، آدنوویروس نوترکیب.

فهرست مطالب

عنوان ..... صفحه

۱- دلایل انتخاب موضوع ۱

۲- بیان مسئله ۳

۳- بازنگری منابع و اطلاعات موجود ۶

۳-۱- تاریخچه موضوع ۶

۳-۱ -۱- سلول بنیادی مزانشیمال (MSC) ۸

۳-۱-۲- توصیف سلول بنیادی مزانشیمال ۹

۳-۱-۳- ویژگی های MSCs به منظور کاربردهای بالینی ۱۱

۳-۱-۳-۱- سهولت در جداسازی و تکثیر آسان MSCs در in vitro ۱۱

۳-۱-۳-۲- ظرفیت تمایزی MSCs به رده های مختلف سلولی در in vitro و in vivo ۱۲

۳-۱-۳-۳- نقش MSCs در خونسازی ۱۵

۳-۱-۳-۴- نقش MSCs در سرکوب ایمنی ۱۶

۳-۱-۳-۵- ویژگی مهاجرتی MSCs ۱۷

۳-۲- سیستم هم اکسیژناز-۱ (Heme Oxygenase-1) ۱۹

۳-۲-۱- ویژگی های محافظت سلولی HO-1 در پیوند ۲۱

۳-۳- کلونینگ (همسانه سازی) ۲۶

۳-۳-۱- فناوری Gateway ۲۶

۳-۳-۲- TOPO Cloning ۳۰

۳-۳-۳- وکتور آدنوویروسی (p Ad/CMV/V5-DEST) ۳۵

۳-۳-۳-۱- رده سلولی 293A ۳۷

۳-۳-۳-۲- وکتور آدنوویروسی چگونه کار می کند ۳۸

۳-۳-۳-۳- بیان (Expression) ۳۸
۴- نقد متون ۴۰
۵- اهداف کلی، اهداف اختصاصی، فرضیات ۴۴
۵-۱- هدف کلی: ۴۴
۵-۲- اهداف اختصاصی: ۴۴
۵-۳- فرضیات : ۴۴
۶- متغیرهای تحقیق، ابزار و نحوه سنجش آن‌ها ۴۵
۷- نوع مطالعه ۴۵
۸- جامعه مورد مطالعه، حجم نمونه، روش نمونه‌گیری و آزمون آماری ۴۵
۸-۱- جامعه مورد مطالعه ۴۵
۸-۲- حجم نمونه ۴۶
۸-۳- روش نمونه‌گیری ۴۶
۸-۴- آزمون آماری ۴۶
۹- نحوه اجرای تحقیق ۴۷
۹-۱- فهرست مواد مورد نیاز ۴۷
۹-۲- فهرست تجهیزات مورد نیاز ۴۹
۹-۳- آماده سازی محلول‌ها ۵۱
۱۰- روش و مراحل انجام پژوهش ۵۵
۱۰-۱- جداسازی MSCs از نمونه مغزاستخوان (BM) ۵۵
۱۰-۲- جدا نمودن ژن HO-1 و ایجاد وکتور ویروسی بیانی حاوی ژن ۵۹
۱۰-۳- ترانسفکشن سلول های 293A و تهیه استوک ویروسی ۷۵
۱۰-۴- Transduction و بررسی بیان HO-1 در MSCs آلوده شده با ویروس ۸۱

۱۰-۵- بررسی های سایتوتوکسیسیتی و آپوپتوز ۸۷

۱۰-۶- تمایز MSCs و MSCs-HO-1 به رده های سلولی استخوان و چربی..... ۹۳

۱۱- یافته‌ها..... ۹۷

۲۱- بحث ۱۲۲

۱۳- نتیجه‌گیری..... ۱۳۰

۱۴- پیشنهادات ۱۳۱

۱۵- فهرست منابع ۱۳۲

۱- دلایل انتخاب موضوع

سلول های بنیادی مزانشیمال [1](MSCs) جزء سلول های استرومایی غیرهماتوپوئتیک می باشند، که توانایی تمایز به رده های مختلف سلولی از قبیل [2]کندروسیت ها ، [3]اوستئوسیت ها و [4]آدیپوسیت ها را دارند. همچنین با توجه به جداسازی آسان و تکثیر بالای MSCs در in vitro ، و نیز اثرات حمایتی در خونسازی و توانایی تعدیل کنندگی ایمنی ، امروزه MSCs به عنوان یک منبع سلولی ایده آل در زمینه سلول درمانی و ژن درمانی و نیز مهندسی بافت مطرح شده اند، و اخیرا در تعدادی از موارد از جمله پیوند کاربردهای بالینی از آن گزارش شده است.

با این وجود به علت آسیب های وارده قبل از پیوند (که در نتیجه مراحل جداسازی و پردازش به MSCs وارد می شود) و آسیب های وارده بعد از پیوند (که در نتیجه عوامل آسیب رسان ریز محیط پیوندی از قبیل نبود اکسیژن کافی ، فقر غذایی ، وجود رادیکال های آزاد اکسیژن [5](ROS) و دیگر عوامل به MSCs وارد می شود)، در مجموع باعث مرگ زودرس قسمت اعظم MSCs در همان روزهای ابتدایی پس از پیوند می شوند که به موجب آن میزان کارآیی درمان سلولی بسیار پایین تر از حد انتظار می باشد.

بنابراین برای افزایش کارآیی درمان در زمینه پیوند، نیاز است تا مقاومت و تحمل پذیری MSCs را در برابر شرایط استرس زا افزایش دهیم تا مدت بقاء MSCs در ریز محیط پیوندی افزایش یابد. با توجه به اینکه بیش از ۹۹٪ MSCs در طی ۴ روز بعد از پیوند متحمل مرگ سلولی می شوند، در نتیجه اگر استراتژی بکار برده شود که این سلول ها به استرس های موجود در ریز محیط پیوندی مقاوم شوند، بطوریکه در طی ۴ روز ابتدایی پس از پیوند بقاء خود را حفظ کنند، می توان این انتظار را داشت که درصد موفقیت پیوند بسیار بالا باشد.

یکی از روش های بسیار موثر، دست ورزی مهندسی ژنتیک MSCs با استفاده از عوامل محافظت کننده ی سلولی می باشد. یکی از این عوامل آنزیم [6]HO-1 می باشد که عملکرد آنتی اکسیدانی، ضد

---

[1] Mesenchymal stem cells
[2] chondrocyte
[3] osteocyte
[4] adipocyte
[5] reactive oxygen species
[6] heme oxygenase-1

التهابی و آنتی آپوپتوتیک قوی داشته و باعث محافظت سلول در برابر بسیاری از استرس ها از قبیل، التهابات، ایسکمی، هایپوکسی، اشعه های یونیزان و رادیکال های آزاد اکسیژن می شود.

با توجه به احتمال تومورزایی و اثرات غیرقابل پیش بینی در سلول، مجاز به دست ورزی ژنتیکی سلول بصورت پایدار نمی باشیم، بدین دلیل در این تحقیق برای انتقال ژن HO-1 به MSCs از وکتور آدنوویروسی (Ad)[1] استفاده کردیم. وکتور آدنوویروسی باعث بیان موقت ژن مورد نظر شده و بیان ژن در رده سلولی بصورت پایدار نمی باشد، همچنین این وکتور خارج کروموزومی بوده و تغییری در ساختار کروموزوم و ژن های میزبان ایجاد نمی کند.

[1] adenovirus

۲- بیان مسئله

سلول های بنیادی مزانشیمال (MSCs) گروهی از سلول های کلونی زا هستند که میتوانند به رده های مختلفی تمایز یابند.امروزه بدلیل جداسازی آسان و توانایی تمایز وسیعی که سلول های بنیادی مزانشیمی دارند,کاربردهای مختلفی در پزشکی بالینی از قبیل پیوند بدست آورده اند.

در بسیاری از بیماری های بدخیم مانند انواع لوسمی ها و بیماری های ژنتیکی و مادرزادی استفاده از سلول های بنیادی روش درمانی نوینی است بطوریکه پیوند سلول های بنیادی راهکار مناسبی برای درمان اینگونه از بیماری ها بشمارمیرود وسلول های بنیادی مزانشیمال (MSCs) با توانایی رشد و تمایز به رده های مختلف سلول های ایده الی برای استفاده در اینگونه پیوندها میباشد.

برای استفاده بالینی از سلول های بنیادی مزانشیمال نیاز به دسترسی به تعداد زیادی از سلول های صلاحیت دار از نظر عملکرد با فنوتیپ و ژنوتیپ پایدار است ولی طی پروسه های جمع آوری,کشت و پردازش آسیب های متعددی به سلول های بنیادی مزانشیمال وارد میشود که بقاء و عملکرد آنها را در بدن کاهش میدهد.

اگر استراتژی ای بکار برده شود که این سلول ها به آسیب های وارده مقاوم شوند بطوریکه حدود دو یا چند روز بیشتر زنده بمانند، میتوان این انتظار را داشت که درصد موفقیت پیوند سلول بنیادی مزانشیمال بسیار بالا باشد.یکی از راهکارهایی که میتوان بکار برد دست ورزی مهندسی ژنتیک این سلول با استفاده از عوامل محافظت کننده سلولی است. یکی از این عوامل آنزیم آنتی اکسیدان هم اکسیژناز-۱ (HO-1) می باشد که بعنوان یک آنتی اکسیدان بالقوه شناخته شده و فعالیت این آنزیم یک مکانیسم دفاعی تطبیقی در کشت های سلولی و مدل های حیوانی محسوب میشود که امروزه بسیار مورد توجه دانشمندان قرار گرفته و نتایج بسیار خوبی از آن گرفته اند.

از طرف دیگر مطالعات نشان می دهند آنزیم هم اکسیژناز-۱ (HO-1) در برابر شرایط استرس زا از قبیل قرار گرفتن در معرض اشعه ماوراء بنفش (UV)[1], کمبود اکسیژن, پراکسید هیدروژن (H_2O_2)[2], فلزات سنگین, سایتوکاین ها, لیپوپلی ساکارید باکتریایی, شوک گرمایی وغیره اثرحفاظتی دارد. همچنین HO-1 نقش مهمی در تحمل ایمونولوژیک پیوند سلول های بنیادی دارد بطوریکه با تعدیل سیستم ایمنی فرد موجب بقاء بهتر پیوند می گردد.

---

[1] ultraviolet

[2] hydrogen peroxide

در مجموع بیشتر عملکرد های مهم HO-1 در هموستاز سلولی, شامل تنظیم ظرفیت اکسیداتیو , التهاب , چرخه سلولی و آپوپتوز/ مرگ سلولی می باشد.

بطور خلاصه با توجه به نقش بالینی بسیار مهم پیوند سلول های بنیادی مزانشیمال و آسیب های متعددی که در طی این پیوند به سلول های بنیادی مزانشیمال وارد می گردد در این مطالعه سعی می شود با بیان HO-1 در سلول های بنیادی مزانشیمال آنها را در برابر آسیب ها محافظت نموده و با تعدیل ایمنی میزبان در کل موجب بهبود کیفیت پیوند گردد.علاوه بر این با بقاء بیشتر سلول های بنیادی مزانشیمال در اثر بیان HO-1 ,بدلیل افزایش میزان بقاء آنها در بدن میتوان پیوند را با دوز کمتر انجام داد و به هدف درمانی مورد نظر دست یافت.در نتیجه موجب صرفه جویی و کاهش هزینه ها نیز شد.

چون بیان دائمی ژن از جمله HO-1 در MSC مجاز نمی باشد , از اینرو در این تحقیق ردهٔ سلول بنیادی مزانشیمال با استفاده از روش های مهندسی ژنتیک دست ورزی شده بطوریکه ژن HO-1 بتواند دراین رده سلولی بطور کارا و موثر و موقتی بیان شود، سپس این سلول ها در in vitro در معرض عوامل توکسیک مختلفی قرار گرفته و میزان مقاومت و بقاء سلول های بنیادی مورد بررسی قرار خواهد گرفت.در این تحقیق از خاصیت حفاظت سلولی HO-1 به منظور افزایش بقاء استفاده میگردد.

از کاربرد های این تحقیق افزایش بقاء بیشتر MSC در پیوند ودر نتیجه افزایش موفقیت پیوند میباشد، همچنین از این طریق می توان با تعداد سلول های کمتر در پیوند نتیجه مطلوب را گرفت.از سوی دیگر به دلیل سرکوب ایمنی توسط HO-1 , از واکنش میزبان بر علیه عضو پیوندی جلوگیری شده,که در نتیجه آن بقاء سلول های بنیادی مزانشیمال افزایش می یابد.از فوائد آتی مهم دیگر, القاء تحمل ایمنی بر علیه آنتی ژن اختصاصی در عضو پیوندی است که هدف نهایی در پیوند به شمار می رود که به موجب آن ادامه سرکوب ایمنی با استفاده از دارو های سیتو توکسیک مرتفع می شود و به دنبال آن از میزان مرگ و میر نیز کاسته می شود.در کل با توجه به اثرات درمانی و کارایی و بقاء پیوند, از نظر کاهش هزینه ها و نیز صرفه اقتصادی و صرفه جویی در مصرف دارو های سیتوتوکسیک از دیگر مزایای این تحقیق به شمار می رود.

در این تحقیق از وکتور آدنو ویروس به منظور انتقال ژن HO-1 به سلول های بنیادی مزانشیمال استفاده

می شود.دلیل انتخاب این وکتور و مزایاء استفاده از آن عبارتند از:

۱- وکتورآدنو ویروس قادر به آلوده سازی تعداد زیادی از سلول ها می باشد و در نتیجه مقادیر زیادی از پروتئین مورد نظر تولید می شود.

۲- وکتور آدنو ویروس می تواند ترانسفکشن موقت دهد که در این صورت دستورزی ژن در رده سلولی مورد نظر به صورت پایدار نمی باشد.

۳- این وکتور قادر به آلوده کردن سلول های تکثیری و غیر تکثیری می باشد.

۴- بیان پروتئین های انسانی به سهولت در این سیستم وکتوری امکان پذیر می باشد و حتی این سیستم قادر به اصلاح و تغییر ساختار بعد از ترجمه به صورت صحیح می باشد.

۵- در این سیستم وکتوری می توان مقادیر بالایی از DNA خارجی را به سلول بنیادی مزانشیمال ترانسفکت کرد.

۶- وکتور آدنو ویروس خارج کروموزومی بوده در نتیجه تغییری در ساختار کروموزوم و ژن های میزبان ایجاد نمی کند.

۳- بازنگری منابع و اطلاعات موجود

۳-۱- تاریخچه موضوع

Friedenstein در سال ۱۹۷۴ اولین فردی بود که سلول های پیش ساز استرومایی چند توانه را شناسایی کرد، و نیز روش جداسازی این سلول ها را از مغز استخوان شرح داد و نشان داد که در کشت های تک لایه ایی سلول های کلنی زا بصورت دوکی شکل می باشند و بعنوان واحد تشکیل دهنده کلنی فیبروبلاست ها [1](CFU-Fs) عنوان کرد (۱). Caplan در سال ۱۹۹۱ با در نظر گرفتن ظرفیت [2]خودتکثیری و [3]تمایز سلول های استرومایی مشتق شده از مغز استخوان، برای اولین بار این سلول ها را بعنوان [4]سلول های بنیادی مطرح کرد و به نام سلول های بنیادی مزانشیمال عنوان کرد (۲).

MSCs امروزه بعنوان یک منبع سلولی ایده آل بمنظور سلول درمانی و ژن درمانی مطرح شده اند. اخیرا مطالعاتی که بر روی انسان انجام گرفته کارایی MSCs را در درمان بسیاری از بیماری ها نشان داده است، از جمله در سال ۲۰۰۸ Le Blanc و همکارانش در فاز ۲ مطالعاتی از ویژگی تعدیل کنندگی ایمنی MSCs برای درمان بیماری میزبان بر ضد پیوند حاد [5](GVHD) استفاده کردند (۳). همچنین مطالعه مشابهی در سال ۲۰۰۶ توسط Ringden D و همکارانش انجام شده بود که برای درمان GVHD مقاوم به درمان از MSCs استفاده شده بود (۴). Kharaziha P و همکارانش در سال ۲۰۰۹ در فاز ۱ و ۲ مطالعات بالینی در بیمارانی که سیروز کبدی داشتند بهبود عملکرد کبد را بعد از تزریق MSCs خود بیماران مشاهده کردند (۵).

یکی از کاربرد های مهم MSCs در زمینه پیوند می باشد، مانند پیوند مغز استخوان یا پیوند MSCs در سکته های قلبی که بیشتر مطالعات را شامل می شوند. در خصوص پیوند مغز استخوان یا خون بند ناف در سال ۲۰۰۹ در فاز ۱ و ۲ آزمایشات بالینی که بوسیله Macmilan ML و همکارانش انجام شد ، نتایج نشان داد که افزودن MSCs کشت داده شده در ex-vivo به سلول های بنیادی خونساز

---

[1] colony-forming unit fibroblasts
[2] Self-renewal
[3] Differentiation
[4] Stem cells
[5] acute graft-versus-host disease

موجب افزایش پذیرش و کارایی پیوند خون بند ناف از دهنده غیرخویشاوند در اطفال سرطانی گیرنده پیوند می شود (۶).

با این وجود مطالعات نشان می دهند که کارایی پیوند MSCs بسیار پایین تر از حد انتظار می باشد بطوریکه Toma و همکارانش در سال ۲۰۰۲ گزارش کردند که در پیوند MSCs به قلب موش های با کمبود ایمنی کمتر از 0.44% از MSCs در طی ۴ روز بعد از پیوند زنده مانده بودند (۷). همچنین در مطالعه دیگری که بوسیله Shake JG و همکارانش در سال ۲۰۰۲ انجام شده بود، مشاهده کردند که پیوند تقریبا ۶×۱۰^{۷} از MSCs به قلب سکته دیده خوک تنها بهبود عملکرد نواحی حاشیه ایی قلب را به همراه داشته است (۸). با توجه به اهمیت موضوع ، در مطالعاتی که بوسیله Zhang M و همکارانش در سال ۲۰۰۱ و نیز Robey TE و همکارانش در سال ۲۰۰۸ انجام شده بود، در مجموع به این نتیجه رسیدند که مهمترین عوامل در افزایش کارایی پیوند MSCs در ارتباط با میزان بقاء MSCs در بافت هدف و نیز مقاومت در برابر شرایط نامساعد ریز محیط پیوندی می باشد (۹،۱۰).

در این خصوص Haider HKh و همکارانش در سال ۲۰۰۸ مطالعاتی انجام دادند که در پایان به این نتیجه رسیدند که برای درمان موثر و نیز افزایش کارایی پیوند MSCs نیاز است این سلول ها را به عوامل محافظت کننده سلولی قوی مجهز کرد تا در برابر عوامل آسیب رسان ریز محیط پیوند از قبیل فقر غذایی ، نبود اکسیژن کافی ، وجود رادیکال های آزاد اکسیژن و دیگر موارد مقاومت کرده و بقاء خود را حفظ کنند، ونیز اشاره به این موضوع داشتند که یکی از راهکارهای بسیار موثر دست ورزی مهندسی ژنتیک MSCs با عوامل محافظت کننده سلولی می باشد (۱۱). به عنوان مثال در آزمایشاتی که بوسیله Mangi AA و همکارانش در سال ۲۰۰۳ انجام گرفته بود، مشاهده شد MSCs دست ورزی شده با ژن Akt در مقایسه با MSCs معمولی به میزان قابل توجه ایی باعث بهبود عملکرد قلب در موش هایی که انفارکتوس قلبی داشتند شده بود (۱۲). همچنین مطالعه مشابهی بوسیله Wenzhong Li و همکارانش در سال ۲۰۰۷ انجام شد که در آن از ژن Bcl-2[1] برای دست ورزی MSCs استفاده شده بود که نتایج آن با مطالعه قبلی قابل مقایسه می باشد (۱۳).

[1] B-cell lymphoma 2

۳-۱ -۱- سلول بنیادی مزانشیمال (MSC)

وجود سلول های بنیادی غیر هماتوپوئتیک در مغز استخوان اولین بار بوسیله مشاهدات Cohnheim که یک پاتولوژیست آلمانی بود، ۱۳۰ سال قبل شرح داده شد. تحقیقاتی که این دانشمند انجام داد بر اساس این احتمال بود که مغز استخوان ممکن است منبع فیبروبلاست هایی باشد که فیبر های کلاژن را بعنوان بخشی از پروسه های نرمال ترمیم زخم ها رسوب می دهند (۱۴).

شواهدی که نشان داد مغز استخوان حاوی سلول هایی است که می توانند به دیگر سلول های مزانشیمال و نیز فیبروبلاست ها تمایز یابند با تحقیقات دانشمند آلمانی به نام Friedenstein و همکارانش شروع شد. آنها تمام مغز استخوان را در ظرف های کشت پلاستیکی ریختند و بعد از ۴ ساعت سلول هایی که به کف ظرف های پلاستیکی نچسبیده بودند دور ریخته شدند، بنابراین بیشتر سلول های هماتوپوئتیک حذف شدند.آنها گزارش کردند که سلول های چسبنده در ظاهر ناهمگون هستند ولی بیشتر آنها دوکی شکل بودند که به مدت ۴-۲ روز غیرفعال باقی مانده و بعد از آن به سرعت شروع به تکثیر کردند. بعد از چند مرتبه پاساژ ، اکثر سلول های چسبنده به طور یکنواخت در ظاهر فیبروبلاستیک شدند. Friedenstein و همکارانش در طی آزمایشات متوجه شدند که این سلول ها می توانند به کلنی هایی که شبیه رسوبات کوچک استخوان و غضروف هستند تمایز یابند (۱).مشاهدات Friedenstein بوسیله دیگر محققان در طی سال های دهه ۱۹۸۰ توسعه پیدا کرد و ثابت شد که سلول های جدا شده بوسیله روش Friedenstein [1] چندتوانه بودند و توانایی این را دارند که به اوستئوبلاست ها ، کندروسیت ها ، آدیپوسیت ها و حتی میوبلاست ها تمایز پیدا کنند (۱۵،۱۶).این سلول ها امروزه بعنوان سلول های بنیادی مزانشیمال (MSCs) نام برده می شوند که بدلیل توانایی این سلول ها در تمایز به سلول های رده مزانشیمال می باشد (۲). همچنین امروزه تحقیقات نشان داده اند که این سلول ها توانایی تمایز به دیگر رده های سلولی که از [2] لایه جنینی مشتق نشده اند را نیز دارند که بعنوان [3] تمایز بینابینی شناخته می شود (۱۷،۱۸). بدلیل توانائی بالای این سلول ها در خود سازی و تمایز، این سلول ها برای موارد درمانی بسیار مفید می باشند. بعلاوه چون این سلول ها بصورت اتولوگ تهیه و استفاده می شوند خطر و احتمال بروز عوارض ناشی از پیوند را حذف می کنند.

---

[1] Multipotent
[2] Germline
[3] Transdifferentiation

۳-۱-۲- توصیف سلول بنیادی مزانشیمال (MSC)

MSCs را می توان به عنوان سلول های استرومایی مزانشیمال چند توانه تعریف کرد، که جمعیت غیر یکنواختی از سلول ها می باشند که بصورت سلول های چسبنده به پلاستیک در in vitro تکثیر می یابند و از نظر شکل ظاهری شبیه فیبروبلاست ها بوده و در in vitro کلنی تشکیل می دهند.همچنین MSCs قادرند به سلول های استخوانی ، غضروف و چربی تمایز یابند. اگر چه MSCs را می توان از اکثر بافت های پیوندی جداسازی نمود ولی بیشتر مطالعات انجام شده بر روی MSCs جدا شده از مغز استخوان بوده زیرا دسترسی به نمونه مغز استخوان نسبت به دیگر بافت ها آسان تر بوده و نیز تعداد MSCs در نمونه مغز استخوان بیشتر از بافت های دیگر است بهمین دلیل میزان موفقیت و سهولت در جداسازی این سلول ها بسیار بالاتر بوده و در مجموع منبع اصلی MSCs نمونه مغز استخوان می باشد.(۱۹)، با این وجود این سلول ها تنها در صد کمی از جمعیت سلول های مغز استخوان را تشکیل می دهند بطوریکه تنها ۰/۰۱-۰/۰۰۱٪ از سلول های هسته دار جدا شده از مغز استخوان کلونی هایی شبیه سلول های فیبروبلاستی تشکیل می دهند(۲۹). همچنین در مطالعه ایی میزان این سلول ها را ۱ در $۳/۱ \times ۱۰^{۴}$ سلول تک هسته ای در مغز استخوان گزارش کردند(۳۰). این سلول ها در انسان معمولا از آسپیره مغز استخوان در ناحیه لگن و در رت از آسپیره استخوان فمور و تیبیا به دست می آیند. بیشترین میزان این سلول ها در دوران جنینی وجود داشته و با افزایش سن جنین در طول بارداری، میزان این سلول ها بتدریج کاهش می یابد (۳۱).

برای MSCs کشت داده شده در in vitro هیچ مارکر اختصاصی و واحدی شناسایی نشده است. به طور کلی MSCs انسانی مارکر های هماتوپوئیتیک از قبیل CD34, CD45 و CD14 یا مولکول های کمک محرک مانند CD80, CD86 و CD40 را بیان نمی کنند، ولی به میزان متغیری CD105 [1], CD73 [2] , CD44 , CD90 [3] , CD71 [4], CD271 [5] و گانگلیوزید GD2 را بیان می کنند، که از طریق این مارکرها می توان MSCs را تشخیص داد (۱۷،۲۰،۲۱). میزان بیان متغیر این مارکر ها ممکن است بدلیل تفاوت در نوع رده ، منشاء بافتی و شرایط محیط کشت سلولی باشد بطوریکه تحت شرایط محیطی و مدت زمان پاساژ ممکن است بیان آنتی ژن های سطحی تغییر یابد.

---

[1] endoglin
[2] Ecto-5'-nucleotidase
[3] THY1
[4] Transferrin receptor
[5] low-affinity nerve growth factor receptor

کلون های سلولی بدست آمده از بافت های مختلف ممکن است از نظر مولکول های سطحی کمی با یکدیگر متفاوت باشند. بعنوان مثال MSCs مشتق از بافت چربی علاوه بر مارکرهای موجود بر روی MSCs مشتق از مغز استخوان مارکرهای CD49d,CD64,CD62e,CD31 را نیز بیان می کنند (۲۳).

MSCs انسانی می توانند اینترلوکین های؛ IL-6, IL-7, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15 ، فاکتور مهاری لوسمی [۱](LIF) ، فاکتور محرک کلنی ماکروفاژی [۲](M-CSF) ، فاکتور سلول بنیادی [۳](SCF) و لیگاند flt-3 را ترشح کنند (۲۲).

همچنین مطالعات صورت گرفته در in vitro ، ترشح چندین فاکتور از قبیل فاکتورهای ضدالتهابی، رگ زا، نوروتروفیک، تعدیل کننده ایمنی و آنتی فیبروتیک را بوسیله MSCs نشان داده اند، و گزارش کرده اند که ترشح بسیاری از این فاکتورها می تواند بوسیله سایتوکاین های واقع در ناحیه آسیب بافتی تحریک شود ونیز ممکن است آزادسازی هر یک از این فاکتورها بوسیله MSCs در ارتباط با نوع بافت و شدت آسیب بافتی متفاوت باشد (۶۹).

حداقل معیارهای لازم برای شناسایی MSCs بر طبق پروتکل انجمن بین المللی سلول درمانی (International Society for Cellular Therapy) عبارتند از:

۱-قابلیت تمایز و بازسازی بافت های با منشاء مزودرمال (اوستئوسیت ها، آدیپوسیت ها و کندروسیتها)

۲- عدم بیان مارکرهای هماتوپوئیتیک (۲۱).

---

[1] leukemia inhibitory factor
[2] macrophage colony-stimulating factor
[3] stem cell factor

۳-۱-۳- ویژگی های MSCs به منظور کاربردهای بالینی

دلایل استفاده از MSCs بعنوان یک منبع سلولی ایده آل در زمینه سلول درمانی و ژن درمانی:

۳-۱-۳-۱- سهولت در جداسازی و تکثیر MSCs در in vitro

MSCs انسان را می توان از بافت چربی، کبد جنینی، خون بند ناف، مغز استخوان و دیگر بافت ها جداسازی نمود (۲۵-۲۳).با این وجود بطور معمول MSCs را از نمونه آسپیراسیون مغز استخوان بعد از سانتریفوژ شیب غلظتی از لایه میانی که حاوی سلول های تک هسته ای مغز استخوان [۱](MNC) می باشند جداسازی می نمایند (۲۶).در مرحله بعد سلول های تک هسته ای را در ظرف های پلاستیکی مخصوص کشت سلولی که حاوی محیط کشت اختصاصی MSCs می باشند از قبیل DMEM[2] یا alpha MEM (α-MEM) غنی شده با سرم جنین گاوی [۳](FBS) کشت می دهند (۲۷). بعد از انتقال سلول های تک هسته ای مغز استخوان به درون فلاسک های کشت سلولی، MSCs به کف فلاسک ها می چسبند و دیگر سلول ها از قبیل سلول های هماتوپوئیتیک درون محیط کشت بصورت شناور باقی می مانند که در زمان تعویض محیط کشت و پاساژ سلولی دور ریخته شده و تنها MSCs باقی می مانند. بعد از اینکه MSCs در طی تکثیر متوالی تمام سطح ظرف کشت سلولی را پوشاندند در این حالت می توان MSCs را بوسیله تریپسین از کف فلاسک های کشت سلولی جدا کرده و در فلاسک های جداگانه کشت داد و از این طریق قادر هستیم [۴]کشت های طولانی مدت را انجام دهیم (۲،۱۷).

تعداد کلونی های بدست آمده از مغز استخوان بین گونه ها متفاوت بوده و بـه شـرایط محـیط کـشت بستگی دارد. مطالعات اولیه نشان می دهند که سلول های مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان همگی فنوتیپ یکسانی داشته و کلونی های دوکی شکل را به وجود می آورند (همولوژی بیش از ۹۸٪). با این وجود مطالعات اخیر نشان می دهند که کلونی های مشتق از سـلول هـای تکـی، از نظـر مورفولـوژی هتروژن بوده و حداقل از دو تیپ سلولی مختلف یعنی سلول های دوکی شکل کوچک و سـلول هـای مربع مستطیلی بزرگ تر تشکیل می شوند (۲۲).

---

[1] Mononuclear cells
[2] Dulbeccos Modified Eagles Medium
[3] Fetal bovine serum
[4] Long-term culture