پایان نامه کارشناسی ارشد

رشته زیست شناسی- گرایش سلولی و مولکولی

بررسی اثر conditioned medium حاصل از بافت بلاستمای خرگوش سفید نژاد نیوزلندی بر روی فاکتورهای بنیادینگی وتمایزی سلول‌های NTERA-2 تمایز یافته بوسیله تکنیک فلوسایتومتری.

اساتید راهنما:

آقای دکتر بهرامی

خانم دکتر مقدم متین

اساتید مشاور:

آقای دکتر مهدوی شهری

آقای دکتر هوشنگ رفعت پناه

تحقیق و تالیف:

مهدی میر احمدی

پاییز ۱۳۹۰

نخست

سپاس خداوندی را که با نام او آغاز شد و با یاری اش پایان یافت.

این مجموعه تقدیم می شود به

پدر و مادرم، به پاس لحظه ای از سالهایی که مرا پاس داشتند

همسر عزیزم، به پاس فداکاری هایش در این مسیر پر فراز و فرود

و نیز خانواده مهربانم، به پاس تشویق ها و دلگرمی هایشان

و به همه آزاداندیشانی که همواره بزرگ آرمانشان، سرافرازی ایران و ایرانی است.

تقدیر و سپاس

با تمام وجود از اساتید راهنمای عزیزم جناب آقای دکتر بهرامی و سرکار خانم دکتر مقدم متین که تلاش هایشان دینیست همیشگی بر گردنم و مشاوران جناب آقای دکتر مهدوی شهری و آقای دکتر رفعت پناه که توجهشان برایم روشنایی بخش این مسیر بوده است

اساتید گرانقدر جناب آقای دکتر سنگیان و آقای دکتر مشرقی که با راهنمایی ها و داوری های ارزشمندشان این پایان نامه را قضاوت کردند

خانم دکتر ابراهیمی، خانم وزیری و جناب آقای جان زمین از پژوهشگاه رویان تهران که صمیمانه مرا در بین خود پذیرفتند و رقم زننده تجربیات گرانبهایی در زندگی ام بودند

همچنین سرکار خانم طبسی از بخش ایمنولوژی پژوهشکده بوعلی مشهد به خاطر تمام کمک های دلسوزانه اش.

و اما دوستان عزیز، آقایان صباغی، روح الامین، توسلی، مومنی مقدم، بوذرپور، نادری، صادقی، حدادو خانم ها ساعی نسب، بهنام رسولی، نخعی راد و حقیقی و سایر هم دوره ای هایم که با مهر بی دریغ شان، الطاف بی طمع شان و لبخند مستدامشان مفهوم اخلاص و دوستی را تعبیر کردند.

مهدی میراحمدی

پاییز ۱۳۹۰

فهرست مطالب:

فصل اول: کلیات

۱-۱ سلول‌های بنیادی از دیدگاه تاریخی ۲
۱-۲ منابع سلول‌های بنیادی..... ۸
۱-۳ توانایی تمایز سلول‌های بنیادی ۹
۱-۳-۱ سلول‌های بنیادی همه توان (totipotent stem cells) ۹
۱-۳-۲ سلول‌های بنیادی پرتوان(pluripotent stem cells) ۹
۱-۳-۳ سلول‌های بنیادی چند توان(multipotent stem cells) ۱۰
۱-۴ انواع سلول‌های بنیادی بر اساس منشا..... ۱۰
۱-۴-۱ سلول‌های بنیادی بالغ ۱۰
۱-۴-۲ سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۱۲
۱-۴-۳ سلول‌های بنیادی جنینی ۱۵
۱-۵ انواع سلول‌های بنیادی با منشاء جنینی..... ۱۶
۱-۵-۱ سلولهای بنیادی جنینی (ES) ۱۷
۱-۵-۲ سلولهای بنیادی سرطانی (EC)..... ۱۸
۱-۶ برخی از تفاوت‌های سلول‌های EC با ES ۲۱
۱-۷ سلول‌های NTERA-2..... ۲۱
۱-۸ سلول‌های بنیادی جنینی زایشی (EG) ۲۲
۱-۹ کاربرد سلولهای بنیادی ۲۳
۱-۹-۱ استفاده از سلول‌های بنیادی پرتوان در پزشکی و درمان ۲۳
۱-۱۰ پتانسیل‌های درمانی استفاده از سلول‌های بنیادی ۲۵
۱-۱۰-۱ کاربرد سلول‌های بنیادی در درمان بیماری‌های ایمنی- خونی ۲۵
۱-۱۰-۲ دیابت ملیتوس تیپ۱..... ۲۶
۱-۱۰-۳ بیماری‌های سیستم عصبی ۲۷

۱-۱۰-۴ ترمیم بافت قلب ۲۹
۱-۱۰-۵ ژن درمانی ۳۰
۱-۱۱ نگاهی کلی به مطالعات انجام شده در زمینه برنامه نویسی مجدد هسته ای ۳۱
۱-۱۱-۱ انتقال هسته ۳۲
۱-۱۱-۲ پرتوان سازی سلول‌ها به روش هیبریداسیون سلولی ۳۴
۱-۱۱-۳ فاکتورهای رونویسی و تعویض دودمان ۳۷
۱-۱۱-۴ سلول‌های بنیادی پرتوان القاء شده ۳۸
۱-۱۱-۵ برنامه نویسی مجدد بوسیله عصاره سلولی ۴۰
۱-۱۲ عملکرد فاکتورهای رونویسی در برنامه نویسی مجدد سلول‌های سوماتیک ۴۲
۱-۱۳ بررسی نقش ریز ملکول‌ها در برنامه نویسی مجدد سلولی ۵۰
۱-۱۳-۱ AZA یک ممانعت کننده از متیل ترانسفورماسیون DNA ۵۰
۱-۱۳-۲ VPA ، TSA و SAHA بعنوان ممانعت کنندگان داستیله شدن هیستون ها ۵۱
۱-۱۳-۳ BIX, Bayk, RG108 ..... ۵۳
۱-۱۳-۴ ممانعت از مسیرهای سیگنالی MEK و GSK3 ..... ۵۴
۱-۱۳-۵ مهار مسیر TGF β ۵۵
۱-۱۳-۶ فعال سازی مسیر سیگنالی wnt ۵۶

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱ فهرست وسایل مورد استفاده در این پژوهش ۵۹
۲-۲ فهرست مواد مورد استفاده در این پژوهش ۶۰
۲-۳ استریل کردن وسایل: ۶۲
۲-۴ تهیه مواد و محلول‌های مورد استفاده ۶۳
۲-۴-۱ تهیه محیط کشت ذخیره ۶۳
۲-۴-۲ تهیه محیط کشت مورد استفاده ۶۳
۲-۵ غیر فعال سازی دمایی سرم جنینی گاو ۶۴
۲-۶ تهیه محلول نمکی بافر فسفات ۶۴
۲-۷ پرورش و نگهداری حیوانات ۶۵
۲-۸ تهیه حلقه بلاستمایی ۶۵

۲-۹ شستشو حلقه‌های بلاستمایی ۶۷
۲-۱۰ تهیه Conditioned Medium از حلقه‌های بلاستمایی ۶۸
۲-۱۱ کشت سلول‌های NTERA-2 ..... ۶۹
۲-۱۱-۱ پاساژ سلول‌های NT2 ..... ۶۹
۲-۱۱-۲ انجماد سلولی ۷۰
۲-۱۱-۳ خارج کردن از انجماد ۷۱
۲-۱۲ طراحی آزمایشات و انجام تیمارها ۷۲
۲-۱۳ بررسی آنتی ژن‌های سطح سلولی به روش ایمنوسیتوشیمی ۷۵
۲-۱۴ بررسی آنتی ژن درون هسته‌ای OCT 3/4 بوسیله تکنیک ایمنوسیتوشیمی ۷۶
۲-۱۵ بررسی آنتی ژن‌های سطح سلولی با روش فلوسایتومتری و به صورت رنگ آمیزی غیر مستقیم (indirect) ۷۹
۲-۱۶ بررسی آنتی ژن درون هسته‌ای OCT3/4 با روش فلوسایتومتری و به صورت رنگ آمیزی غیر مستقیم (indirect) ۸۱

فصل سوم: نتایج

۳-۱ مطالعه میزان آنتی ژن‌های بنیادینگی سطح سلولی با استفاده از ایمنوسیتوشیمی ۸۵
۳-۲ بررسی میزان بیان آنتی ژن‌های اختصاصی در گروه‌های سلولی مورد آزمایش به روش فلوسایتومتری ۹۳

فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری

۴-۱ اهداف تحقیق ۱۰۴
۴-۲ تفسیر نتایج ۱۰۴
تفسیر نتایج حاصل از روش‌های ایمنوسیتوشیمی و فلوسایتومتری در سه گروه سلولی مورد ۱۰۴
۴-۳ ترکیبات احتمالی موجود در CM به منظور برنامه نویسی مجدد سلول‌های تمایز یافته ۱۰۸
۴-۴ منشاء سلول‌های بلاستمایی ۱۰۸
۴-۵ بلاستما و سلول‌های فیبروبلاست ۱۰۹
۴-۶ پیشنهادات ۱۱۴

فهرست اشکال

شکل۱- ۱: افسانه یونانی پرومته (Christian Schussele, 1864) ۳

شکل۱- ۲: کشت سلول‌های بنیادی جنینی ۱۶

شکل۱- ۳: انواع سلول‌های بنیادی با منشاء جنینی (Terese Winslow, 2010) ۱۷

شکل۱- ۴: جداسازی ES (http://www.allthingsstemcell.com/glossary) ۱۸

شکل۱- ۵: نمونه ی یک تراتومای سیستیک گرفته شده از رحم ۲۰

شکل ۲- ۱: ابزار مخصوص پانچ.....۶۶

شکل ۲- ۲: موضع مناسب جهت انجام پانچ ۶۶

شکل ۲- ۳: حلقه بلاستمایی بعد از پانچ دوم..... ۶۷

شکل ۲- ۴: شمای کلی مراحل مختلف این پژوهش..... ۷۴

شکل ۲- ۵: تصویر میکروسکوپ استفاده شده برای گرفتن تصاویر فلورسانت و نوری (Olympus, IX70) ۷۹

شکل۳- ۱: بررسی بیان آنتی ژن SSEA-1 در سه گروه NT2، NT2-RA و NT2-RA-CM. تصاویر A-C:رنگ آمیزی با آنتی بادی علیه SSEA-1 تصاویر D-F: رنگ آمیزی هسته با DAPI تصاویر G-I: عکس ادغام شده هسته و آنتی ژن مربوطه..... ۸۷

شکل۳- ۲: بررسی بیان آنتی ژن SSEA-3 در سه گروه NT2، NT2-RA و NT2-RA-CM. تصاویر A-C:رنگ آمیزی با آنتی بادی علیه SSEA-3 تصاویر D-F: رنگ آمیزی هسته با DAPI تصاویر G-I: عکس ادغام شده هسته و آنتی ژن مربوطه..... ۸۸

شکل۳- ۳: بررسی بیان آنتی ژن SSEA-4 در سه گروه NT2، NT2-RA و NT2-RA-CM. تصاویر A-C:رنگ آمیزی با آنتی بادی علیه SSEA-4 تصاویر D-F: رنگ آمیزی هسته با DAPI تصاویر G-I: عکس ادغام شده هسته و آنتی ژن مربوطه..... ۸۹

شکل۳- ۴: بررسی بیان آنتی ژن TRA-1-60 در سه گروه NT2، NT2-RA و NT2-RA-CM. تصاویر A-C:رنگ آمیزی با آنتی بادی علیه TRA-1-60 تصاویر D-F: رنگ آمیزی هسته با DAPI تصاویر G-I: عکس ادغام شده هسته و آنتی ژن مربوطه..... ۹۰

شکل۳- ۵: بررسی بیان آنتی ژن TRA-1-81 در سه گروه NT2، NT2-RA و NT2-RA-CM. تصاویر A-C:رنگ آمیزی با آنتی بادی علیه TRA-1-81 تصاویر D-F: رنگ آمیزی هسته با DAPI تصاویر G-I: عکس ادغام شده هسته و آنتی ژن مربوطه. ۹۱
شکل۳- ۶: استفاده از آنتی بادی P3X بعنوان کنترل منفی ایزوتایپ در سه گروه NT2، NT2-RA و NT2-RA-CM. تصاویر A-C: رنگ آمیزی با P3X تصاویر D-F: رنگ آمیزی با DAPI تصاویر G-I: ادغام تصاویر مربوطه به منظور مشاهده همزمان هسته و آنتی بادی ۹۲
شکل۳- ۷: بررسی بیان آنتی ژن درون هسته ایOCT3/4 در سلول‌های تیمار نشده NT2 در مقایسه با کنترل ایزوتایپ. تصاویر A-B: رنگ آمیزی باOCT3/4 و P3X تصاویر C-D: رنگ آمیزی با DAPI تصاویر E-F: ادغام تصاویر مربوطه به منظور مشاهده همزمان هسته و آنتی بادی ۹۳
شکل۳- ۸: بررسی میزان بیان آنتی ژن‌های سطح سلولی SSEA-1، SSEA-3، SSEA-4، TRA-1-60 و TRA-1-81 و آنتی ژن درون هسته‌ای OCT3/4 در گروه کنترل (NT2). درصد سلول‌های بیان کننده آنتی ژن مورد نظر در هر مورد نوشته شده است. ۹۵
شکل۳- ۹: بررسی میزان بیان آنتی ژن‌های سطح سلولی SSEA-1، SSEA-3، SSEA-4، TRA-1-60 و TRA-1-81 و آنتی ژن درون هسته‌ای OCT3/4 در گروه سلول‌های تمایز یافته (NT2-RA). درصد سلول‌های بیان کننده آنتی ژن مورد نظر در هر مورد نوشته شده است. ۹۷
شکل۳- ۱۰: بررسی میزان بیان آنتی ژن‌های سطح سلولی SSEA-1، SSEA-3، SSEA-4، TRA-1-60و TRA-1-81 و آنتی ژن درون هسته‌ای OCT3/4 در گروه سلول‌های القاء شده به تمایز زدایی نسبی (NT2-RA-CM). درصد سلول‌های بیان کننده آنتی ژن مورد نظر در هر مورد نوشته شده است..... ۹۹

شکل ۴- ۱: چهار مسیر اصلی و متداول برنامه نویس مجدد و ایجاد سلول سلول‌های پرتوان القاء شده (Jaenisch and Young, 2007) ۱۰۳

فهرست جداول

جدول ۱- ۱: تحقیقات کلیدی در زمینه سلولهای بنیادی، طی چند دهه گذشته..... ۶
جدول ۱- ۲: مسیرهای اصلی انجام برنامه نویسی مجدد بر روی سلول‌های سوماتیک ۳۲
جدول ۱- ۳: بررسی توانایی سلول‌های پرتوان غیر انسانی از لحاظ ورود و عملکرد در بافت‌های جنینی در حال رشد (Matthias Stadtfeld and Konrad Hochedlinger, 2010) ۳۷
جدول ۱- ۴: چهار فاکتور اصلی تشکیل دهنده هسته اصلی القاء برنامه نویسی مجدد و پرتوانی ۴۹
جدول۲- ۱: رده بندی خرگوش سفید نژاد نیوزلندی ۶۵
جدول۲- ۲: رقت آنتی بادی‌های اولیه مورد استفاده در ایمنوسیتوشیمی..... ۷۸
جدول۲- ۳: رقت آنتی بادی‌های ثانویه مورد استفاده در ایمنوسیتوشیمی..... ۷۸
جدول۲- ۴: رقت آنتی بادی‌های اولیه مورد استفاده در فلوسیتومتری ۸۳
جدول۲- ۵: رقت آنتی بادی‌های ثانویه مورد استفاده در فلوسیتومتری ۸۳
جدول۳- ۱: درصد بیان آنتی ژن‌های سطح سلولی SSEA-1، SSEA-3، SSEA-4، TRA-1-60 و TRA-1-81 و آنتی ژن درون هسته‌ای OCT3/4 و همچنین میانگین شدت فلورسانت (MFI) هر آنتی ژن در گروه کنترل (NT2). ۹۶
جدول۳- ۲: درصد بیان آنتی ژن‌های سطح سلولی SSEA-1، SSEA-3، SSEA-4، TRA-1-60 و TRA-1-81 و آنتی ژن درون هسته‌ای OCT3/4 و همچنین میانگین شدت فلورسانت (MFI) هر آنتی ژن در گروه سلول‌های تمایز یافته (NT2-RA). ۹۸
جدول۳- ۳: درصد بیان آنتی ژن‌های سطح سلولی SSEA-1، SSEA-3، SSEA-4، TRA-1-60 و TRA-1-81 و آنتی ژن درون هسته‌ای OCT3/4 و همچنین میانگین شدت فلورسانت (MFI) هر آنتی ژن در گروه سلول‌های القاء شده به تمایز زدایی نسبی (NT2-RA-CM). ۱۰۰

Abbreviations

AML: Acute Myelogenic Leukemia

bFGF: Basic Fibroblastic Growth Factor

BMP: Bone morphogenetic protein

BSA: Bovine Serum Albumin

CM: Conditioned Medium

DAPI: 4', 6-Diamidino-2-phenylindole

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

EBs: Embryoid Bodies

ECCs: Embryonic Carcinoma Cells

EGCs: Embryonic Germ Cells

ESCs: Embryonic Stem Cells

FACS: Fluorescence Activated Cell Sorter

FBS: Fetal Bovine Serum

GFP: Green Fluorescence Protein

GSCs: Germ Line Stem Cells

GVL: Graft versus leukemia

HSCs: Hematopoietic Stem Cells

HSCT: Hemopoietic Stem Cell Transplantation

ICM: Inner Cell Mass

iPDC: Induced Partially Dedifferentiated Cells

iPS: Induced Plouripotent Stem Cells

KS: Kallmann Syndrome

LIF: Leukemia Inhibitory Factor

MESCs: Mouse Embryonic Stem Cells

MSCs: Mesenchymal Stem Cells

NSCs: Neural stem/progenitor cells

PBS: Phosphate Buffered Salin

RA: Retinoic Acid Cells

SCID: Severe Compound Immune Deficiency

SCNT: Somatic Cell Nuclear Transplanting

SSCs: Spermatogonial Stem Cells

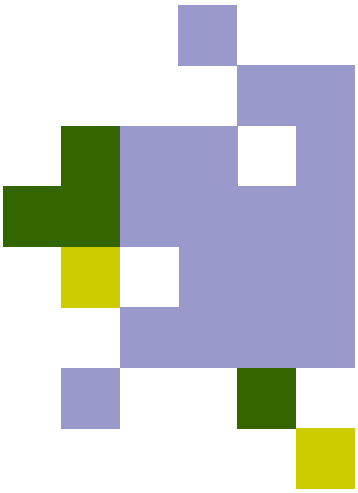
SSEA: Stage Specific Embryonic Antigen

چکیده:

سلول‌های بنیادی، سلول‌های تمایز نیافته‌ای هستند که در بسیاری از اندام‌ها و بافت‌های بدن جانوران وجود دارند. این سلول‌ها در اثر تقسیمات میتوز، سلول‌های مشابه را ایجاد کرده و می‌توانند برای مدت زمان نامحدودی خود نوسازی نمایند. تحت شرایط فیزیولوژیک خاص و فاکتورهای ویژه، این سلول‌ها القا شده و تمایز می‌یابند. سلول‌های بنیادی بر اساس منشا به دو دسته سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی بالغ تقسیم می‌شوند. استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی به علت قابلیت تکثیر زیاد ممکن است بعد از پیوند باعث ایجاد تومور در شرایط *in vivo* شود. به علاوه استفاده از این سلول‌ها دارای مشکلات اخلاقی نیز می‌باشد. به همین خاطر امروزه در عرصه علم سلولی و ملکولی، تلاش‌های زیادی جهت برنامه نویسی مجدد سلول‌های بالغ و یا تمایز یافته به سلول‌های بنیادی جنینی یا شبه جنینی، به منظور استفاده در مصارف پزشکی و درمانی و همچنین تحقیقات بنیادی در حال انجام شدن است. دست یابی به یک مدل سلولی مناسب و همچنین روش‌های برنامه نویسی مجدد که با سهولت بیشتر و هزینه‌های کمتری انجام شوند، از موضوعات مورد توجه دانشمندان می‌باشد.

بر این اساس در این پروژه، از رده سلولی NTERA-2 که از تومورهای زایشی انسان بدست می‌آید و دارای خصوصیات تمایزی بالایی برای تبدیل شدن به رده‌های سلولی سوماتیک در حضور عوامل القایی است، بعنوان یک مدل جدید برای برنامه نویسی مجدد سلولی استفاده شده است. در این پروژه، سلول‌های NTERA-2 در حضور اسید رتینوئیک (RA) به سمت سلول‌های عصبی تمایز داده شدند و با تاثیر conditioned medium حاصل از کشت سلول‌های بلاستمای لاله گوش خرگوش سفید نیوزلندی بر روی سلول‌های عصبی مشتق شده از سلول‌های NT2، القاء درجاتی از برنامه نویسی مجدد سلولی مشاهده گردید. سپس تغییرات میزان بیان فاکتورهای اختصاصی سلول‌های بنیادی جنینی همچون SSEA-1، SSEA-3، TRA-1-60، TRA-1-81 و همچنین فاکتور بنیادینگی داخل هسته‌ای OCT3/4 با استفاده از تکنیک‌های فلوسایتومتری و ایمنو سیتوشیمی، مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان داد این روش می‌تواند باعث ایجاد درجاتی از برنامه نویسی مجدد گردد.

کلمات کلیدی: تومورهای زایشی انسان، conditioned medium، برنامه نویسی مجدد سلولی.



کلیات

۱-۱ سلول‌های بنیادی از دیدگاه تاریخی

امروزه اینگونه شایع است که از بافت‌ها و عضوهای اهداء شده به منظور جایگزین کردن آنها با بخش‌های آسیب دیده و یا بیمار استفاده می‌شود. اما آنچه که واضح است، این نکته می‌باشد که متاسفانه تعداد افرادی که نیازمند دریافت بافت و یا عضو سالم هستند بسیار بیشتر از تعداد بافت و یا ارگان‌های اهداء شده برای پیوند است.

در این میان شاید آنچه که به عنوان بارقه‌ای از امید بتواند به کمک بیماران نیازمند پیوند باشد، استفاده از سلول‌های بنیادی است. با توجه به ویژگی‌های این سلول ها، این امکان دور از دسترس نیست که یک منبع تجدید پذیر و بزرگ از سلول‌ها برای استفاده در مصارف درمانی در دسترس بشر قرار گیرد. بنا بر این تلاش‌های زیادی در جهت دست یابی به چنین منبع و فن آوری استفاده از آن در طول چند دهه اخیر انجام شده است و در مقابل پیشرفت‌های چشم گیری نیز در این عرصه حاصل شده است.

اما اگر از دیدگاه تاریخی بخواهیم نگاهی به این موضوع داشته باشیم متوجه می‌شویم که تاریخچه سلول‌های بنیادی، نه تنها موضوعی جدید نیست بلکه ریشه در باستان دارد، و می‌توان آنرا به ۲۷۰۰ سال قبل از میلاد مسیح نسبت داد. در آن زمان یونانی‌های باستان معتقد بودند که یک عضو آسیب دیده بعد از مدتی مجدداً بازسازی می‌شود و علت این مسئله را فعالیت یکسری واحدهای سازنده[1] در بدن می‌دانستند و البته افسانه‌های یونانی نیز دقیقاً نشان‌دهنده این اعتقاد آنها بود (شکل۱-۱).

[1] Regenerative Unites

شکل۱- ۱: افسانه یونانی پرومته (Christian Schussele, 1864)

این اعتقاد تا قرن‌ها بعد در اذهان نسل‌های مختلف بشری باقی ماند تا آنکه رابرت هوک در قرن هجدهم میلادی به کمک میکروسکوپ ابداعی خود توانست ذرات تشکیل دهنده پیکره تمامی موجودات زنده را کشف کند و نام آنها را سلول بگذارد. و به این ترتیب اولین سنگ بنای علم سلول شناسی و مسیری که در نهایت منتهی به کشف سلول‌های بنیادی و کاربردهای آنها گردید، نهاده شد (جدول۱-۱). اما واژه سلول بنیادی[1] به معنای دقیق امروزیش، عملا برای اولین بار توسط دانشمند روسی الکساندر ماکسیموف ابداع و به کار برده شد. ماکسیوف که یک بافت شناس و جنین شناس بود، بر روی سلول‌های خونی کار می‌کرد و معتقد بود که سلول‌های خونی همگی دارای یک پیش ساز واحد به نام سلول بنیادی خون ساز[2] هستند. پس از ماکسیموف دو دانشمند کانادایی به نام‌های ارنست مک کالوک و جیمز تایل در دهه ۱۹۶۰ میلادی طی تحقیقات خود کشف کردند که در مغز استخوان موش‌ها سلول هایی وجود دارد که قابلیت دوباره بازسازی[3] خود را دارند و به این ترتیب اثباتی بر ادعای ماکسیموف مبنی بر وجود سلول‌های بنیادی خون ساز شدند. در این راستا پزشکان توانستند در سال ۱۹۶۸ اولین پیوند مغز استخوان را برای معالجه یک نوع نقص ایمنی حاد با موفقیت انجام دهند. یعنی عملی که طی آن بیمار

[1] Stem cell
[2] Haematopoietic stem cells
[3] Self-renewing

سلول‌های بنیادی خون ساز بالغی که در ناحیه مغز استخوان قرار گرفته اند را دریافت می‌کند (Bongso and Richards 2004).

نزدیک به یک دهه بعد یعنی در سال ۱۹۷۸ محققین موفق به کشف سلول‌های بنیادی خون ساز در خون بند ناف شدند. که این کشف نیز در نوبه خود کمک‌های زیادی به پیشبرد این رشته و چشم اندازهای درمانی آن داشت. اما با ادامه تحقیقات، در سال ۱۹۸۱ سه دانشمند با نام‌های مارتین اوانز، متیو کافمن و جیل مارتین موفق شدند تا سلول‌های بنیادی جنین موش را از ICM بلاستوسیست[1] آن استخراج کرده و در شرایط آزمایشگاهی کشت دهند، و به این ترتیب برای اولین بار کلمه سلول‌های بنیادی جنینی[2] به این گروه از سلول‌ها نسبت داده شد.

حال دنیای سلول‌های بنیادی آنقدر برای دانشمندان جذاب بود که هر روز زمان و بودجه بیشتری برای کشف تازه‌ها در این علم نوپا هزینه می‌کردند و در همین مسیر در سال ۱۹۹۷ با مشخص شدن منشاء لوکمیا که از سلول‌های بنیادی خون ساز ایجاد می‌شد، اولین شواهد دال بر وجود سلول‌های بنیادی سرطانی[3] (CSCs) حاصل شد که خود به تنهایی باعث تغییر بزرگی در دیدگاه و نظریه‌های پزشکان و محققین علوم ژنتیک ملکولی نسبت به عامل یا عوامل ایجاد انواع سرطان حاصل کرد. در این مقطع از زمان موضوع سلول‌های بنیادی به یکی از پر هیاهو ترین مباحث علمی بدل شد و این مساله زمانی بیشتر خود را نشان داد که جیمز تامسون و همکارانش در دانشگاه Wisconsin-Madison موفق به استخراج و کشت دادن سلول‌های بنیادی جنینی انسانی برای اولین بار در دنیا شدند. تقریبا به طور همزمان در دانشگاه John Hopkins نیز همین کار بر روی سلول‌های انسانی زایا[4] انجام شد. برآیند این یافته‌ها و دست آوردهای مهم علمی، پژوهشگران را متقاعد کرد که بن یاخته‌ها را می‌توان در طیف وسیعی از بافت ها، نواحی و مراحل تکاملی رویان، جنین، نوزادان و حتی افراد بالغ یافت کرد. اما باز هم امید بخش ترین

[1] Blastocyst ICM
[2] Embryonic Stem Cell
[3] Cancer stem cells
[4] Human Germ cells

رده سلول‌ها که مورد توجه آنها قرار داشت، همان سلول‌های بنیادی جنینی بود. زیرا این سلول‌ها توانایی تولید هر سه لایه اصلی بدن یعنی اندودرم، مزودرم و اکتودرم را دارند. و به این ترتیب بهترین گزینه در مسائل درمانی خواهند بود.

اما در همین زمان حساسیت هایی نسبت به استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی از دیدگاه اخلاقی و معنوی از سوی گروه‌های مختلف مذهبی، مردمی و منتقدان استفاده از این رده سلولی ایجاد شد. در این بین سه خط فکری مختلف در مورد این سلول‌ها و جود دارد. گروه اول معتقدند که جنین‌ها به خودب خود نشاندهنده یک فرد هستند و بنا بر این دارای کرامت یک انسان کامل بوده و نباید به هیچ عنوان از آنها در زمینه‌های تحقیقاتی استفاده کرد. گروه دوم معتقد است که جنین‌ها برای تحقیقات خلق نشده اند، اما اگر استفاده از آنها در جهت پیشبرد و توسعه روش هایی همچون IVF[1] باشد استفاده از آنها بلامانع است. و گروه سوم نیز بر این باور است که جنین تنها مجموعه و خوشه‌ای از سلول هاست که این پتانسیل را دارد که با استفاده در زمینه‌های تحقیقاتی باعث کاهش درد و رنج بسیاری از انسان‌های دیگر شود. در هر حال ماحصل این بحث‌ها و کش مکش‌ها در نهایت منجر به وضع قوانین و ملاحضات اخلاق پزشکی در استفاده از این سلول‌ها شد. به هر ترتیب همین حساسیت‌ها باعث شد تا پژوهشگران با انگیزه‌ای دو چندان به دنبال بسط این رشته و یافتن منابع جدید تری از این سلول‌ها باشند که این تلاشها در سال ۲۰۰۳ توسط دکتر سونگتائو شی از دانشگاه NIH منجر به کشف منبع جدیدی از سلول‌های بنیادی بالغ در دندان‌های شیری کودکان شد. دو سال بعد یعنی در سال ۲۰۰۵ نیز محققان در دانشگاه کینگ استون انگلستان اعلام کردند که موفق به کشف سومین رده از سلول‌های بنیادی با نامCord-blood-drived embryonic-like stem cells یا (CBEs) شدند که از خون بند ناف حاصل می‌شد و توانایی تمایز به بسیاری از سلول‌های بنیادی بالغ موجود در بافت‌های مختلف را داشت. در همین راستا و در سال ۲۰۰۶ دانشمندان دانشگاه نیوکاسل انگلستان موفق به ایجاد اولین سلول‌های مصنوعی کبد بوسیله سلول‌های بنیادی خون بند ناف شدند. درست یک سال بعد پژوهشگران

[1] In vitro Fertilization

دانشگاه‌های ویک فارست و هاروارد به سرپرستی دکتر آنتونی آتالا گزارشی مبنی بر کشف تیپ جدیدی از سلول‌های بنیادی در مایع آمنیوتیک[1] کردند که می‌توانست جایگزین بسیار مناسبی برای سلول‌های بنیادی جنینی در انجام تحقیقات و موارد درمانی باشد (Evans and Kaufman 1981).

اما با وجود تحقیقات و دست آوردهای مهمی که در سال ۲۰۰۶ انجام شد، وقوع یک اتفاق علمی، آغاز گر فصل جدیدی در پژوهش‌های سلولی شد. این رویداد مهم ایجاد سلول‌های ips[2] بود. این تکنولوژی انقلابی اولین بار توسط شین یا یاماناکا و تیمش در دانشگاه کیوتو ژاپن گزارش شد. این محققین توانستند در این مسیر سلول‌های بالغ فیبروبلاست موشی را با استفاده از یک سری فاکتورهای رونویسی به سلول‌های ips، برنامه نویسی مجدد یا reprogram کنند. به طور کلی نیز اعتقاد بر این است که سلول‌های ips از جنبه‌های مورفولوژیکی، رفتار سلولی، بیان ژنها، حالت اپی ژنتیکی و پتانسیل تمایزی چه در محیط کشت و چه در شرایط *in vivo* شبیه به سلول‌های بنیادی جنینی هستند.

از این تاریخ به بعد می‌توان اینگونه گفت که عمده فعالیت‌های تحقیقاتی به بحث ips و روش‌های reprogram کردن سلول‌ها معطوف شده است و پیشرفت‌های شایان ذکری نیز بدست آمده است. جدول ۱-۱ نشان دهنده فهرستی کوتاه از تاریخچه سلول‌های بنیادی و تحقیقات مربوط به آن می‌باشد (Bowles, Knight et al. 2006).

جدول ۱- ۱: تحقیقات کلیدی در زمینه سلولهای بنیادی، طی چند دهه گذشته

1908	The term "stem cell" was proposed for scientific use by the Russian histologist Alexander Maksimov (1874–1928) at congress of hematologic society in Berlin. It postulated the existence of haematopoietic stem cells.
1960s	and Gopal Das presented scientific evidence of adult Joseph Altman , an ongoing stem cell activity in the brain, that contradicted neurogenesis 's "no new neurons" dogma.Cajal

[1] Amniotic Stem Cells
[2] Induced Pluripotent Stem Ccells

1963	illustrated the presence of self-renewing cells in mouse Till and McCulloch bone marrow.
1968	.SCIDion between two siblings successfully treated transplant Bone marrow
1978	.cord blood were discovered in human Haematopoietic stem cells
1981	by inner cell mass were derived from the embryonic stem cellsMouse , who is Gail R. Martin, and Matthew Kaufman, Martin Evansscientists attributed for coining the term "Embryonic Stem Cell".
1992	as neurospheres.*in vitro*Neural stem cells were cultured
1997	Leukemia was shown to originate from a haematopoietic stem cell, the first .cancer stem cellsdirect evidence for
1998	stem cell and coworkers derived the first human embryonic James Thomson . University of Wisconsin–Madison at the line
2000s	plasticity were published.adult stem cellSeveral reports of
2001	Scientists at Advanced Cell Technology were able to clone the first early (four- to six-cell stage) human embryos for the purpose of generating embryonic stem cells.
2003	Songtao Shi from National Institute of Health discovered new source of adult stem cells in children's primary teeth.
2004–2005	claimed to have created several human Hwang Woo-SukKorean researcher , which later oocytes lines from unfertilised human embryonic stem cell shown to be fabricated.
2005	Researchers at Kingston University in England claimed the discovery of a third category of stem cell, dubbed cord-blood-derived embryonic-like stem cells (CBEs), derived from umbilical cord blood. The group claimed that these cells were able to differentiate into more types of tissue than adult stem cells.
2005	Researchers at UC Irvine's Reeve-Irvine Research Center were able to partially restore the ability of mice with paralyzed spines to walk through the injection of human neural stem cells.
August 2006	were reported by Kazutoshi Takahashi **Induced pluripotent stem cells**Rat . Shinya Yamanakaand
October 2006	in England created the first ever artificial Newcastle UniversityScientists at liver cells using umbilical cord blood stem cells.
January 2007	Harvard and Anthony Atala led by Dr. Wake Forest UniversityScientists at amniotic reported the discovery of a new type of stem cell in University . fluid

June 2007	Research reported by three different groups showed that normal skin cells can be reprogrammed to an embryonic state in mice. In the same month, reported the first successful creation of a Shoukhrat Mitalipovscientist .somatic cell nuclear transferprimate stem cell line through
October 2007	Nobel win the 2007 Oliver Smithies, and Martin Evans, Mario Capecchi for their work on embryonic stem cells Prize for Physiology or Medicine from mice using gene targeting strategies producing genetically engineered) for gene research. knockout micemice (known as
November 2007	: Two similar papers were released; in induced pluripotent stem cellsHuman , "Induction of Shinya Yamanaka and Kazutoshi Takahashi by *Cell* pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors", and , et al., "Induced pluripotent stem cell lines derived Junying Yuin *Science* by from human somatic cells". These reports revealed that it is possible to produce a stem cell from almost any other human cell instead of using c-myc due to tumorigenesisembryos as needed previously, albeit the risk of remained to be solved.retroviral gene transferand
January 2008	Robert Lanza and colleagues at Advanced Cell Technology and UCSF create the first human embryonic stem cells without destruction of the embryo.
January 2008	Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer with adult fibroblasts was reported.
February 2008	Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach without the need to insert special genes into specific sites was reported. This study encouraged the development of non-viral reprogramming techniques.

۱-۲ منابع سلول‌های بنیادی

سه نوع اصلی از سلول‌های بنیادی در انسان عبارتند از:

- سلول‌های بنیادی جنینی[1]
- سلول‌های جنسی جنینی[2] که از ناحیه گنادی جنین‌های سقط شده ۵ تا ۹ هفته ای به دست می‌آیند.
- سلول‌های سرطانی شبه جنینی[1] که از بافت تراتوکارسینوما حاصل می‌شوند (Krause, Theise et al. 2001; Surani, Durcova-Hills et al. 2008).

[1] Embryonic Stem (ES) cells
[2] Embryonic Germ (EG) cells