دانشگاه صنعتی امیرکبیر

(پلی تکنیک تهران)

دانشکده:**مهندسی پزشکی**

پایان نامه کارشناسی ارشد

رشته تحصیلی: **مهندسی پزشکی**

عنوان

مطالعه تجربی تاثیر پارامترهای مکانیکی بر رفتار سلولهای بنیادین

استاد راهنما

دکتر محمد تفضلی شادپور

دکتر محمدعلی شکرگزار

دانشجو

سمانه غضنفری

بسمه تعالي

فرم اطلاعات پايان‌نامه
كارشناسي- ارشد و دكترا

دانشگاه صنعتي
اميركبير
(پلي‌تكنيك تهران)

تاريخ:
شماره:

معاونت پژوهشي
فرم پروژه تحصيلات
تكميلي ۷

مشخصات دانشجو:

نام و نام خانوادگی:سمانه غضنفری

دانشجوی آزاد ● بورسیه ○ معادل ○

شماره دانشجوئی: ۸۴۱۳۳۰۴۲ دانشکده: مهندسی پزشکی رشته تحصیلی: مهندسی پزشکی گروه: بیومکانیک

مشخصات استاد راهنما:

نام و نام خانوادگی:آقای دکتر محمد تفضلی شادپور

درجه و رتبه:استادیار دانشکده مهندسی پزشکی دانشگاه صنعتی امیرکبیر

نام و نام خانوادگی:آقای دکتر محمد علی شکرگزار

درجه و رتبه:دانشیار بانک سلولی انستیتو پاستو ایران

مشخصات استاد مشاور:

نام و نام خانوادگی:آقای دکتر ناصر امیری زاده

درجه و رتبه: استادیار سازمان انتقال خون ایران

عنوان پایان‌نامه به فارسی : مطالعه تجربی تأثیر پارامترهای مکانیکی بر رفتار سلولهای بنیادین

عنوان پایان‌نامه به انگلیسی: Experimental study on effect of mechanical parameters on stem cells behavior

نوع پروژه: کارشناسی ○ ارشد ● دکترا ○ سال تحصیلی:۸۶-۸۵

کاربردی ● بنیادی ○ توسعه‌ای ○ نظری ○

تاریخ شروع :۱۳۸۵/۷/۱ تاریخ خاتمه :۱۳۸۶/۱۲/۱۵ تعداد واحد :۶ سازمان تأمین کننده اعتبار : انستیتو پاستور ایران

واژه‌های کلیدی به فارسی: سلول بنیادین،کرنش،تمایز،تکثیر

واژه‌های کلیدی به انگلیسی: stem cell,strain,differentiation,proliferation

مشخصات ظاهری	تعداد صفحات ۱۴۱	تصویر ● جدول ● نمودار ● نقشه ○ واژه‌نامه ○		تعداد مراجع ۸۳	تعداد صفحات ضمائم ۰
زبان متن	فارسی ○	انگلیسی ●	چکیده	فارسی ●	انگلیسی ●
یادداشت					

نظرها و پیشنهادها به منظور بهبود فعالیت‌های پژوهشی دانشگاه

استاد:

دانشجو:

امضاء استاد راهنما: **تاریخ:**

نسخه۱: ارائه به معاونت پژوهشی به همراه یک نسخه الکترونیکی از پایان‌نامه و فرم اطلاعات پایان‌نامه بصورت PDF همراه چاپ چکیده (فارسی انگلیسی) و فرم اطلاعات پایان‌نامه

نسخه۲: - ارائه به کتابخانه دانشکده (به همراه نسخه الکترونیکی فرم و دو جلد پایان نامه و لوح فشرده طبق نمونه اعلام شده در صفحه خانگی کتابخانه

چکیده

سلول های بنیادی[1]، سلول هایی تخصص نیافته هستند که توانایی منحصر بفردی در تولید سلول های همسان خود داشته و علاوه بر آن قادر به تمایز[2] به بسیاری از سلول های تخصص یافته نیز می باشد. سلول های بنیادی را می توان به دو گروه سلول های بنیادی رویانی و بالغ تقسیم کرد. سلول بنیادی بالغ، سلول غیر تمایز یافته ای می باشد که در یک بافت تمایز یافته وجود داشته باشد. این سلول ها این ویژگی را در سراسر طول عمر بافت حفظ می نماید. ویژگی برجسته سلول های بنیادی بالغ آن است که می توان این سلول ها را بصورت اتولوگ[3] مجدداً به خود بیمار پیوند زد و با این روش احتمال پس زدن پیوند به علت ناسازگاری ایمونولوژیک وجود ندارد. سلول های بنیادی مزانشیمی[4]، یکی از انواع سلول های بنیادی بالغ می باشد که منبع اصلی آن، مغز استخوان است با این وجود این سلول ها تنها در صد کمی از جمعیت سلول های مغز استخوان را تشکیل می دهند. سلول های بنیادی مزانشیمی قابلیت تکثیر خود را به مدت طولانی حفظ می کنند و می توانند به لاینهای سلولی غیرهماتوپوئیتیک[5] از جمله سلول های چربی، سلول های غضروفی، فیبروبلاست، سلول های استخوانی و سلول های ماهیچه صاف عروق تبدیل شوند.

سلول ها و بافتهای بدن بطور مداوم تحت تأثیر پارامترهای مکانیکی مختلف و پیچیده داخل بدن قرار دارند و تحریکات مکانیکی نقش تعیین کننده ای بر مورفولوژی و عملکرد سلول ها دارد. ابزارهای متفاوتی برای اعمال نیروهای مکانیکی بر بافتها و سلول های کشت شده طراحی شده است و این ابزارها می توانند فاکتورهای متفاوتی را به سلول اعمال کنند. سلول ها و بافتهایی که در خارج از بدن (In vitro) ساخته می شوند، علاوه بر اینکه باید شرایط زیست سازگاری را داشته باشند، بایستی کارکرد مکانیکی و فیزیکی بافتها را نیز تأمین نمایند، که این مسأله اهمیت تأثیر محیط مکانیکی را قبل از پیوند در مراحل تکثیر و تمایز نشان می دهد. نیروهای مکانیکی بر عوامل مختلفی از جمله تکثیر، مورفولوژی و آرایش سلول، ساختار درونی سلول، خواص مکانیکی سلول، مهاجرت سلولی، متابولیسم سلول ها، فعالیت کانالهای یونی، میزان و عملکرد ترکیبات پروتئینی سلول و مرگ سلول ها تأثیر گذار است، که این پارامترها مستقل از یکدیگر نیستند.

[1] .Stem cells
[2] .differentiation
[3] .Autolog
[4] .Mesenchymal stem cells
[5] .Hematopoitic stem cells

از اواسط قرن هجدهم، علم مهندسی بافت به ساخت عروق جایگزین روی آورد و این به علت عملکرد ضعیف گرفتهای استاتیکی مصنوعی بود که احتمال بروز ترومبوز را تا حد زیادی افزایش می داد. در نتیجه محققان به دنبال راهی برای ساخت عروقی بودند که توانایی بازسازی خود را پس از پیوند حفظ کنند. در سالهای اخیر پژوهشگران بسیاری سعی در استفاده از سلول های بنیادی برای ساخت عروق دارند. مهمترین مزیت های استفاده از سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در بین انواع سلول های بنیادی این است که علاوه بر توانایی تمایز به سلول های عروق، می توان آنها را به راحتی از بدن هر فردی استخراج نموده و پس از ایجاد بافت مورد نظر، به بدن خود فرد پیوند زد.

در این پروژه تغییرات مورفولوژی، میزان تکثیر و همچنین تمایز سلول های بنیادی در اثر بارگذاری کششی سیکلی بررسی شده است. پس از تهیه مغز استخوان انسان از مرکز تحقیقات بیمارستان شریعتی، طی انجام پروتکل های مربوطه سلول های بنیادی مزانشیمی جداسازی شد و سپس برای تأیید نوع سلول ها آزمایش فلوسایتومتری بر روی نمونه ها در سازمان انتقال خون ایران انجام شد. بعد از چندین پاساژ سلول ها در شرایط مطلوب، بر روی ماده زمینه ای مناسب کشت داده شدند و سپس به وسیله دستگاه اعمال بار، تنش های سیکلیک به نمونه ها اعمال شد. بارگذاری سیکلی تحت اثر متغییرهای مستقل پروژه بر روی نمونه های کشت داده شده، با توجه به پروتکل های خاص موجود اعمال می شود. در هنگام کشت سلولی و در طول انجام آزمایش دما در حدود دمای بدن (حدود 37° سانتیگراد) و میزان CO_2 حدود ۵٪ و PH محیط کشت نیز حدود ۷.٤ ثابت نگه داشته می شود

به این صورت ابتدا با استفاده از تصویرهایی که قبل و بعد از انجام تست، با استفاده از میکروسکوپ معکوس و دوربین دیجیتالی از نواحی مشخص شده از بستر سلول های بنیادی مزانشیمی گرفته شده است، ارتباط متغیر وابسته طرح که همان موفولوژی سلول هاست، با ارائه الگویی که از تحلیل هندسه فرکتال بدست می آید، با متغیرهای مستقل طرح مقایسه و بررسی شده است و پاسخ سلول ها به این متغیرهای مستقل و همچنین ارتباط آنها با تمایز سلول های بنیادی بررسی شده است. همچنین تغییرات شاخص شکل سلولی و میزان جهت گیری سلول ها نیز با استفاده نرم افزار طراحی شده با تکنیک های پردازش تصویر قبل و بعد از اعمال بار، بررسی شده است. آرایش رشته های اکتین، قبل و بعد از بارگذاری توسط آنتی بادی مربوطه بررسی شد. میزان تکثیر سلول ها، توسط رنگ آمیزی MTT و در نهایت دستگاه spectrophotometer اندازه گیری می شود. تمایز سلول های بنیادی به سلول های ماهیچه صاف نیز از طریق آنتی بادی اختصاصی مربوطه، تعیین شد.

نتایج آنالیز فرکتال نشان می دهد که با افزایش میزان بار اعمالی و همچنین مدت زمان اعمال بار، بعد فرکتال ابتدا کاهش و سپس افزایش می یابد، شاخص شکل سلولی کاهش و میزان زاویه سلول ها با راستای بارگذاری افزایش می یابد. همچنین با افزایش میزان بار اعمالی و همچنین مدت زمان اعمال بار تکثیر سلول ها افزایش می یابد. اعمال بار به سلول های بنیادی باعث جهت گیری رشته های اکتین و همچنین تمایز این سلول ها به سلول های ماهیچه صاف می شود.

فهرست

۱- سلول های بنیادی **۱**

۱-۱ مقدمه ۲

۱-۲ تعریف سلول های بنیادی ۲

۱- ۳ تعریف تمایز ۳

۱-٤ تقسیم بندی سلول های بنیادی بر حسب توانایی تمایز ۳

۱-۵ تقسیم بندی سلول های بنیادی بر حسب منشأ جداسازی ٤

۱-۵-۱ سلول های بنیادی رویانی ۵

۱-۵-۲ سلول های بنیادی مشتق از سلول های زایای جنین ۸

۱-۵-۳ سلول های بنیادی مشتق از تراتوکارسینوماهای اندام تناسلی ۹

۱-۵-٤ سلول های بنیادی بالغ ۱۰

۱-٦ مشکلات اخلاقی موجود در زمینه استفاده از سلول های بنیادی ۱٤

۲- سلول های بنیادی و اثرات نیروهای مکانیکی وارد بر آنها **۱٦**

۲-۱ مقدمه ۱۷

۲-۲ تأثیر محیط مکانیکی بدن بر روی سلول های بنیادی ۱۸

۲-۲-۱ تأثیر محیط مکانیکی بدن بر روی سلول های بنیادی اپی تلیال ۱۹
۲-۲-۲ تأثیر محیط مکانیکی بدن بر سلول های بنیادی مزانشیمی بالغ ۲۱
۲-۲-۳ تأثیر محیط مکانیکی بدن بر سلول های بنیادی سیستم عصبی ۲۲
۲-۳ ابزارها و بیوراکتورهای متفاوت برای کشت سلولی ۲۲
۲-٤ آزمایشهای IN VITRO برای بررسی اثرات نیروهای نیروهای مکانیکی وارد بر سلول های بنیادی ۲٤
۲-٤-۱ بارگذاری فشاری ۲٤
۲-٤-۲ کشش طولی ۲۵
۲-٤-۳ خمش ۲۵
۲-٤-٤ انبساط خارج از صفحه ای غشاء ۲٦
۲-٤-۵ انبساط درون صفحه ای غشاء ۲۸
۲-٤-٦ تنش برشی ناشی از جریان سیال ۲۹
۲-۵ بررسی تأثیر نیروهای مکانیکی بر سلول های بنیادی ۳۰
۲-۵-۱ تأثیر تنش برشی ناشی از جریان سیال بر روی سلول های بنیادی ۳۰
۲-۵-۲ تأثیر همزمان تنش برشی و فشاری بر سلول های بنیادی مغز استخوان ۳۱
۲-۵-۳ تأثیر اعمال کرنش بر تمایز سلول های بنیادی ۳۱
۲-۵-٤ تأثیر بار گذاری فشاری بر روی سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان ۳۵
۲-۵-۵ تأثیر فشار هیدرواستاتیک سیکلیک بر روی تمایز سلول های اجدادی مزانشیمی ۳۸
۲-۵-٦ تأثیر جریان پالسی سیال بر تکثیر و تمایز سلول های بنیادی مغز استخوان ۳۹

۲-٦ تئوریها و مدلهای بیومکانیکی برای تحلیل تمایز سلول های بنیادی	۳۹
۳- هندسه فرکتال و کاربرد آن در بیولوژی	**٤٥**
۳-۱ مقدمه	٤٦
۳-۲ تاریخچه و مفاهیم پایه	٤٦
۳-۳ مروری بر فرکتالهای کلاسیک	٤٧
۳-۳-۱ مثلث خیام -پاسکال	٤٧
۳-۳-۲ مجموعه کانتور	٤٩
۳-۳-۳ منحنی پینو	٥٠
۳-۳-٤ منحنی هیلبرت	٥٠
۳-۳-٥ منحنی کاچ	٥١
۳-۳-٦ گسکت و فرش سرپینسکی	٥٢
۳-٤ بررسی ابعاد فرکتال و غیر فرکتال	٥٤
۳-٤-۱ ابعاد غیر فرکتال	٥٤
۳-٤-۲ ابعاد فرکتالها	٥٥
۳-٥ چند فرکتال ها	٥٨
۳-٦ چند کاربرد فرکتال در مهندسی پزشکی و بیولوژی	٥٨
٤- مواد و روشهای انجام تحقیق	**٦٠**

٤-١ مقدمه ٦١

٤-٢ مواد مورد استفاده در این پژوهش ٦٣

٤-٣ مراحل انجام تحقیق ٦٦

٤-٣-١ جدا سازی سلول های تک هسته ای مغز استخوان با استفاده از فایکول ٦٦

٤-٣-٢ کشت سلول های تک هسته ای در محیط کشت به منظور جدا سازی سلول های بنیادی مزانشیمی ٦٦

٤-٣-٣ پاساژ و تکثیر سلول های بنیادی مزانشیمی ٦٧

٤-٣-٤ انجام فلوسایتومتری برای تأیید سلول های بنیادی مزانشیمی ٦٨

٤-٣-٧ پوشش غشای سیلیکنی با کلاژن نوع I ٧١

٤-٣-٨ دستگاه اعمال بار ٧٢

٤-٣-٩ بررسی مورفولوژی سلول های بنیادی با استفاده از پردازش تصویر ٧٣

٤-٣-١٠ بررسی تکثیر سلول های بنیادی ٨٠

٤-٣-١١ بررسی تمایز سلول های بنیادی ٨١

٥- نتایج ٨٢

٥-١ مقدمه ٨٣

٥-٢ نتایج آزمایشات فلوسایتومتری ٨٣

٥-٢ نتایج حاصل از بررسی مورفولوژی سلول ها ٨٦

۵-۲-۱ رابطه بارگذاری و بعد فرکتال ۸۶

۵-۲-۲ رابطه بارگذاری و شاخص شکل سلولی ۱۰۶

۵-۲-۳ رابطه بارگذاری و جهت گیری سلول ها ۱۱۶

۵-٤ بررسی آرایش رشته های اکتین ۱۲۰

۵-۵ نتایج حاصل از بررسی تکثیر سلول ها ۱۲۱

۵-۵-۱ رابطه میزان تکثیر سلول ها و میزان کرنش ۱۲۲

۵-۵-۲ رابطه میزان تکثیر سلول ها و مدت زمان اعمال بار ۱۲۶

۵-٦ بررسی تمایز سلول های بنیادی ۱۲۸

٦- نتیجه گیری ۱۳۱

مراجع ۱۳٤

فصل اول

سلول های بنیادی

۱-۱ مقدمه

بر خلاف سایر سلول های بدن نظیر سلول های عضلانی و قلبی که به منظور انجام یک وظیفه و عملکرد مشخص شکل گرفته اند، سلول بنیادی تا زمانیکه سیگنال اختصاصی در جهت تمایز دریافت ننموده باشد بصورت غیر متمایز[۱] باقی خواهد ماند. تحقیقات بر روی سلول های بنیادی منجر به شناسایی دو رده خاص این سلول ها یعنی سلول های بنیادی جنینی و سلول های بنیادی[۲] بالغ گردیده است که هر کدام ویژگیهای خاص خود را دارا می باشد. وجود سلول های بنیادی در موجودات زنده بنا به دلایل متعددی ضروری می باشد. در سه تا پنج روز اول پس از لقاح و پس از شکل گیری بلاستوسیت گروه کوچکی از سلول ها که اصطلاحاً توده درون سلولی[۳] نامیده می شوند شکل می گیرد که حاوی ۳۰ سلول می باشد و این سلول ها هستند که میلیارد ها سلول تخصص یافته و بالغ[٤] را تولید کرده و در نهایت منجر به شکل گیری ارگانیسم می گردند. با رشد جنین، سلول های بنیادی به سلول های تخصص یافته ای نظیر سلول های قلبی، ریوی، پوست و سایر بافتها تبدیل می شود. از سوی دیگر در بسیاری از بافتهای بالغ نظیر مغز استخوان، عضلات، مغز و قرنیه جمعیت کوچکی از سلول های بنیادی بالغ وجود دارد که وظیفه حفظ و ترمیم سلول های از دست رفته این بافتها را بر عهده دارند. امروزه مطالعات متعددی به منظور استفاده درمانی از سلول های بنیادی در بسیاری از بیماریها نظیر پارکسینون، دیابت، ضایعات مغزی و نخاعی وحتی بیماریهای قلبی در حال انجام است [1,2,3].

در این قسمت پس از تعریف سلول های بنیادی و همچنین تعریف تمایز، تقسیم بندی این سلول ها بر حسب توانایی تمایز و همچنین بر حسب منشأ جداسازی ارائه می شود. سپس مختصری راجع به جداسازی، شرایط کشت و ویژگیهای این سلول ها بحث می شود.

۱-۲ تعریف سلول های بنیادی

سلول بنیادی[۵] سلولی تخصص نیافته است که توانایی منحصر بفردی در تولید سلول های همسان خود داشته و علاوه بر آن قادر به تمایز[٦] به بسیاری از سلول های تخصص یافته نیز می باشد [2].

[1] .undifferentiated
[2] .adult stem cell
[3] .inner cell mass
[4] .matured cell
[5] .Stem cell
[6] .differentiation

سلول های بنیادی در سه ویژگی با یکدیگر اشتراک دارند که عبارتند از :

۱- قابلیت تقسیم و بازسازی خودشان را برای مدت زمان طولانی[1] دارند.

۲- تمایز نیافته می باشند.

۳- می توانند به انواع دیگر سلول ها متمایز شوند.

بر خلاف سلول های بالغ بدن، نظیر سلول های عضلانی و عصبی که قابلیت تکثیر شدن ندارند، سلول های بنیادی توانایی تکثیر به مدت طولانی را دارا می باشند. از سوی دیگر این سلول ها همانگونه که گفته شد قادرند که غیر بالغ باقی بمانند [2,4].

۱- ۳ تعریف تمایز

تمایز فرایندی ضروری است برای تکوین یک فرد بالغ، که در آن سلول های تخصص نیافته در حال تقسیم، واجد عملکردهای ویژه سلول های تخصصی بدن می شود [3].

۱-٤ تقسیم بندی سلول های بنیادی بر حسب توانایی تمایز

به طور کلی، سلول های بنیادی بر حسب توانایی تمایز خود به چهار دسته تقسیم میشوند:

۱- Unipotent stem cells: به سلول هایی در موجودات زنده اطلاق می شود که فقط قادرند به یک رده از سلول ها متمایز شوند [3].

۲- Multipotent stem cells: این دسته از سلول ها قادرند به انواعی از سلول های مشتق شده از بیش از یک لایه جنینی، متمایز شوند [3].

۳- Pluripotent stem cells: این سلول ها توانایی تمایز به همه سلول های مشتق شده ازهر سه لایه جنینی یعنی اکتودرم[2] (لایه بیرونی)، مزودرم[3] (لایه میانی) و اندودرم[4] (لایه درونی) را دارا بوده و بنابراین قادرند به هر سلول موجود در داخل بدن موجود زنده متمایز شوند. هر کدام از لایه های جنینی مطابق جدول (۱-۱) قابلیت تمایز به سلول های مشخصی از بدن را دارند. همانطور که از جدول

[1] .long term self-renewal
[2] .Ectoderm
[3] .Mesoderm
[4] .Endoderm

جدول(۱-۱). منشأ پیدایش بافتهای بدن از سه لایه جنینی [5]

Endoderm
inner lining of digestive tract
liver, pancreas
inner lining of respiratory tract
larynx, trachea, lung
urinary bladder, urethra, vagina
most glands
Mesoderm
vascular system
bone (marrow), cartilage
muscle (all types)
several connective tissues
gonads
Ectoderm
skin, hair, nails
brain, nervous system
eyes
ears

٤- Totipotent stem cells: این دسته شامل سلول های تخمک لقاح یافته می باشد که توانایی تولید همه سلول ها و بافتهای سازنده بدن جنین (یعنی بیش از ۲۰۰ نوع سلول) و تمام اندامها و بافتهای خارج جنینی لازم برای رشد و تکوین جنین در رحم (مثل بند ناف و جفت) را دارا هستند، بنابراین این سلول ها قادرند به یک جنین کامل تبدیل شوند [3].

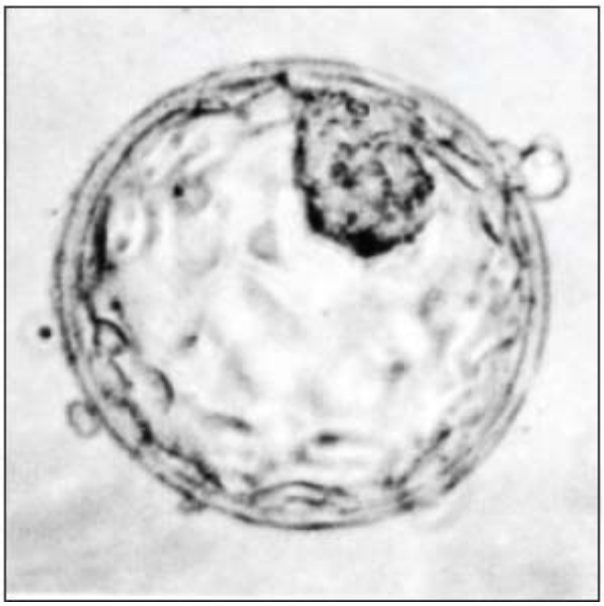
۱-۵ تقسیم بندی سلول های بنیادی بر حسب منشأ جداسازی

سلول های بنیادی را می توان بر حسب منشأ جداسازی به ٤ دسته تقسیم نمود.

۱-۵-۱ سلول های بنیادی رویانی

همانگونه که از نام این سلول ها مشخص است این سلول ها از جنین مشتق می شوند. بهترین منبع جداسازی سلول های بنیادی رویانی جداسازی این سلول ها از توده سلولی داخلی بلاستوسیت حدود ٤ تا ۷ روز بعد از بارور شدن تخمک می باشد که در این مرحله ۳۰ سلول بنیادی رویانی تشکیل شده است. بطور کلی بلاستوسیت از سه ساختمان مستقل تشکیل شده است:

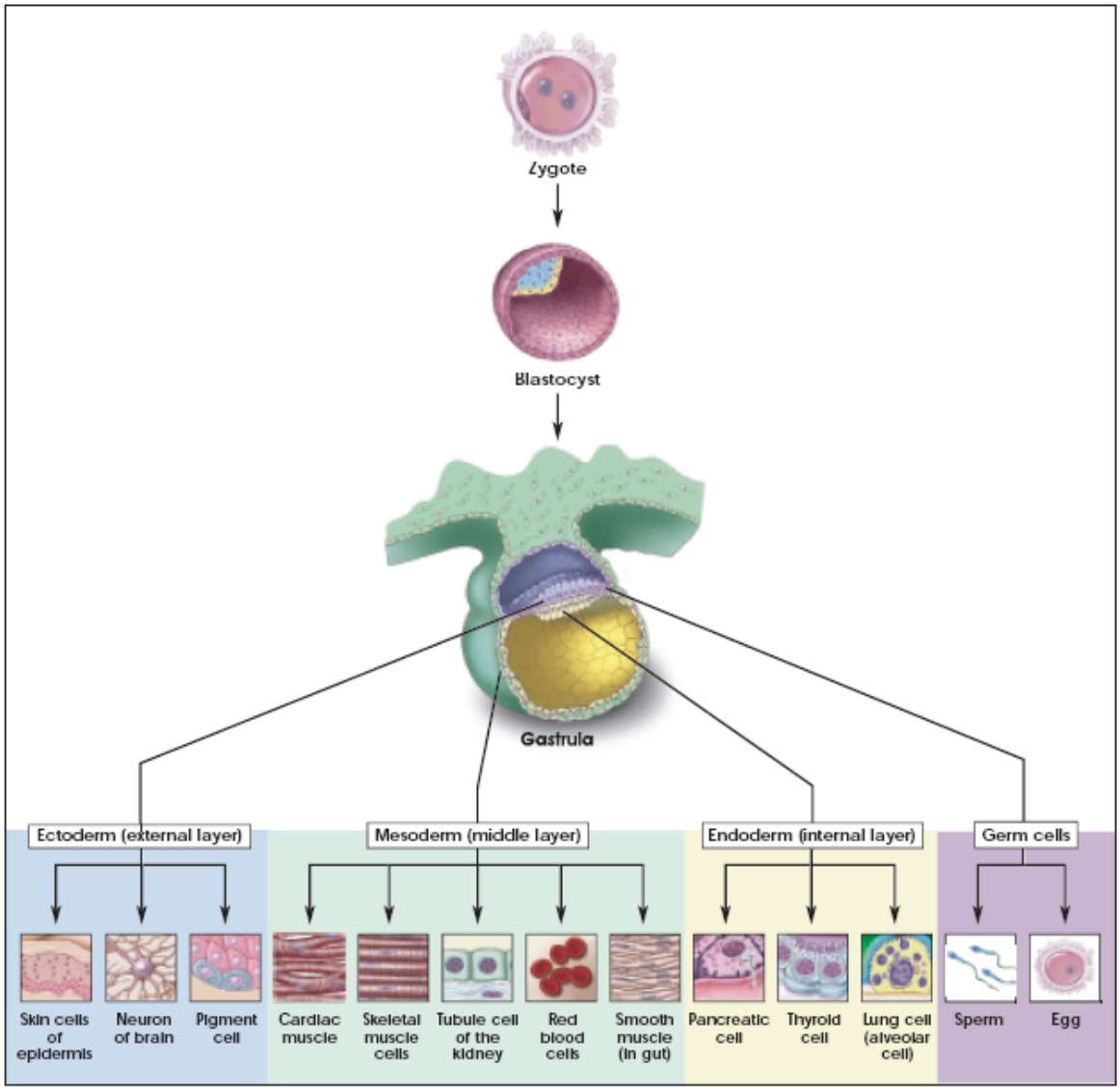
ترفوبلاست[1] که لایه سلولی احاطه کننده بلاستوسیت می باشد، بلاستوسل[2] که حفره توخالی درون بلاستوسیت است و توده سلولی داخلی که در شکل (۱-۱) نشان داده شده است حدوداً از ۳۰ سلول چسبیده شده در گوشه ای از بلاستوسل تشکیل می گردد. مطالعات ازمایشگاهی مشخص ساخت تا زمانی که سلول های بنیادی رویانی در شرایط مناسب کشت داده نشوند بصورت تمایز نیافته باقی می مانند. این سلول ها را پس از جداسازی می توان به درون محیط کشت مناسب انتقال و رشد داد [2,3].



شکل(۱-۱). بلاستوسیست و توده سلولی داخلی [3]

این سلول ها ویژگی چند قابلیتی بودن[3] خود را کاملا حفظ نموده و پتانسیل تبدیل به تمامی رده های سلولی مشتق از هر سه لایه جنینی را همانگونه که در شکل (۲-۱) نشان داده شده است، دارند. تحقیقات

[1] .trophoblast
[2] .blastocele
[3] .pluripotency



شکل(۱-۲). توانایی تمایز سلول های بنیادی رویانی [3]

در مطالعات اخیر توانایی تبدیل سلول های بنیادی رویانی به سلول هایی نظیر بتای پانکراس، سلول های بافت عصبی، سلول های خونی، سلول های عضلانی و عصبی به اثبات رسیده است. بنابراین به نظر

از نظر قدرت تمایز، این سلول ها در رده سلول های pluripotent قرار می گیرند، لذا قادرند به انواع سلول های مشتق از هر سه لایه جنینی، متمایز شوند. این سلول ها پس از چند روز می توانند به سلول های پیش ساز مزودرم و اکتودرم تبدیل شوند اما مدت زمان بیشتری طول می کشد تا به سلول های اندودرم تبدیل شوند [5].

۱-۵-۱-۱ جداسازی و کشت سلول های بنیادی رویانی

هر چند Evans و Kaufman ، موفق به جداسازی و کشت سلول های بنیادی رویانی موش ۱۹۸۱ شدند [7]، اما ۱۷ سال طول کشید تا این موفقیت در مورد سلول های بنیادی رویانی انسان تکرار شود. در سال ۱۹۹۸ James Thomson و همکارانش در دانشگاه Winconsin-Madison موفق به جداسازی و کشت سلول های بنیادی رویانی انسان از توده سلول های داخلی بلاستوسیت های ٤ تا ٥ روزه به دست آمده از طریق روش IVF[1] شدند. از آن زمان به بعد می توان گفت که عصر جدیدی در زمینه تحقیقات روی سلول های بنیادی، آغاز گشته است [3].

Thomson در روش خود از ١٤ جنین تکوین یافته تا مرحله بلاستوسیت، ٥ لاین[2] سلول بنیادی رویانی انسان را جدا نمود. ابتدا توسط Immunosurgery لایه ترفکتودرم جدا شد و سلول های داخلی در محیط کشتی قرار داده شدند که کف آن پوشیده از یک لایه از سلول های تغذیه کننده[3] MEF[4] بود. جهت جلوگیری از تکثیر سلول های MEF، به آنها قبلاً اشعه گاما تابیده شده بود. ۹ تا ۱۵ روز بعد، زمانی که سلول ها تقسیم شده بودند و توده های از سلول تشکیل شده بود، سلول ها به صورت مکانیکی و شیمیایی جدا شده و دوباره درون ظرف دیگری با همان شرایط کشت داده شدند. از جدا کردن کلنی های شبیه به هم و همگن و کشت مجدد آنها در چنین شرایطی cell line بدست می آمد [3].

[1] .In vitro fertilization
[2] .Line
[3] .Feeder layer
[4] .Mouse embryonic fibroblasts

۱-۵-۲ سلول های بنیادی مشتق از سلول های زایای جنین[1]

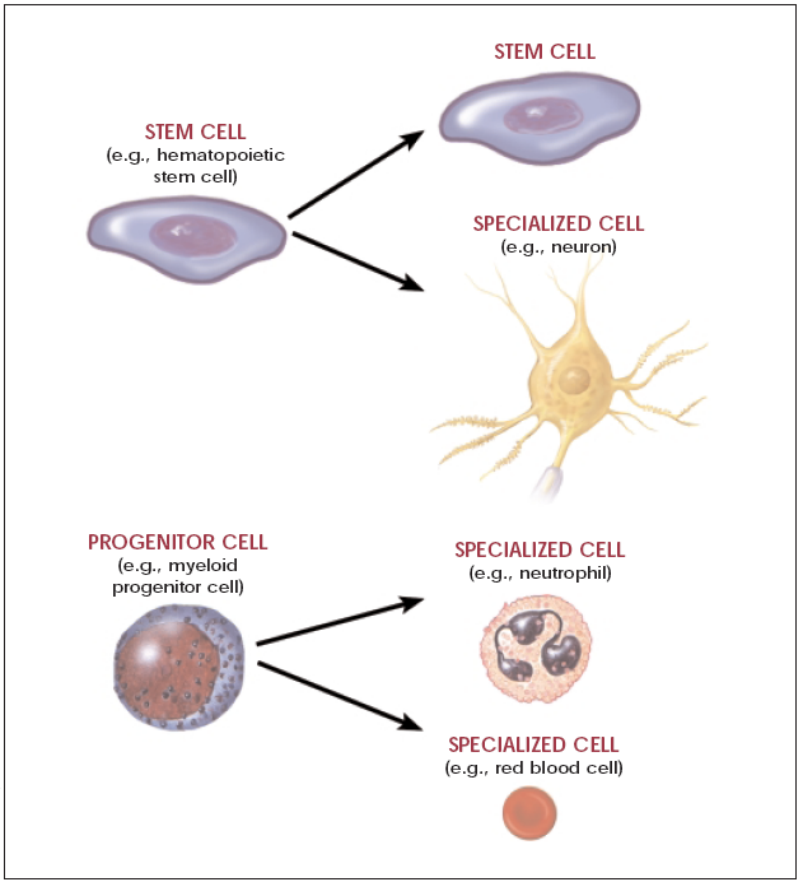
این دسته از سلول ها، گروهی دیگر از سلول های بنیادی pluripotent بوده که از سلول های PG [2] ناحیه برآمدگی گنادی[3] جنین ۵ تا ۹ هفته، جدا می شود. بر آمدگیهای گنادی، اندامهای تناسلی جنین را می سازند و سلول های PG سازنده اسپرم یا تخمک هستند [3].

سلول های بنیادی جنینی (ESC) وسلول های بنیادی ژرمینال جنینی (EGC) هر دو خصوصیات یکسانی ازلحاظ توانایی تولید و تمایز به سایر رده های سلولی را دارند اما در سلول های بنیادی ژرمینال جنینی قابلیت تکثیر[4] تا حدودی کاهش یافته است. درشکل(۱-۳) خصوصیات این دو نوع سلول بنیادی نشان داده شده است[2].

۱-۵-۲-۱ جداسازی و کشت سلول های بنیادی مشتق از سلول های زایای جنین

تقریباً همزمان با گزارش Thomson ، گروهی دیگر به سرپرستی John Gearhart در دانشگاه John Hopkins موفق به جداسازی و کشت دسته ای دیگر از سلول های بنیادی به نام EGCs از سلول های PG برآمدگی های گنادی ۵ تا ۹ هفته سقط شده گشتند. سپس این سلول های PG که بصورت مکانیکی و شیمیایی جدا گشته بودند، بر روی فیبروبلاستهای STO موشی (رده ای که تقسیم نمی شود) کشت داده شدند. محیط کشت علاوه بر FBS دارای LIF [5]، bFGF [6]، forskolin نیز بود. پس از یک تا سه هفته که از کشت این سلول ها گذشت، کلنی های چند لایه متراکمی تشکیل شد و فقط درصد کمی (٪۲۰-۱) از این کلنی ها، تشکیل اجسام رویانی[7] دادند. از این اجسام رویانی، لاین های سلولی تهیه شد [3].

[1] .Embryonic germ cells(EGCs)
[2] .Primordial germ cells
[3] .Gonadal ridge
[4] .proliferation
[5] .Leukemia inhibitory factor
[6] .Basic fibroblast growth factor
[7] .Embryoid bodies(EBs)



(۱-۳). مقایسه سلول های بنیادی جنینی و وسلول های بنیادی ژرمینال جنینی [2]

۱-۵-۳ سلول های بنیادی مشتق از تراتوکارسینوماهای اندام تناسلی

منشأ جداسازی این دسته از سلول ها، تومورهای غیر معمول، سلول های زایا یا تراتوکارسینوما ها می باشد. این گروه از سلول ها نیز از نظر قدرت تمایز در رده سلول های pluripotent قرار می گیرند [2,3].

۱-۵-۳-۱ جدا سازی و کشت سلول های بنیادی مشتق از تراتوکارسینوماهای اندام تناسلی

همانطور که گفته شد، این سلول ها یا EC ها از تومورهای سلول های زایا در اندامهای تناسلی جدا می شوند. اینگونه تومورها به جای اینکه شامل نوع منفردی از سلول های توموری باشند، معمولاً شامل مخلوطی از انواع سلول های تمایز یافته شده هستند و از این نظر می توان گفت که شباهت زیادی با

۱-۵-٤ سلول های بنیادی بالغ[1]

سلول بنیادی بالغ، سلول غیر تمایز یافته ای می باشد که در یک بافت تمایز یافته وجود داشته باشد و قادر به تکثیر و تبدیل به سلول های تمایز یافته همان بافت می باشد. این سلول ها این ویژگی را در سراسر طول عمر بافت حفظ می نماید.

این سلول ها پس از تکثیر و تمایز در نهایت تبدیل به سلول های بالغ و تخصص یافته بافت می گردند. در شرایط معمول سلول های بنیادی بالغ قابلیت تبدیل و تولید سلول های بالغ بافت مربوطه را دارند با این وجود بسیاری از مطالعات اخیر مشخص نموده که این سلول ها توانایی تبدیل به سلول های سایر بافتهای دیگر را نیز دارا می باشند. به همین دلیل مطالعات متعدی به منظور استفاده از سلول های بنیادی بالغ جهت سلول درمانی شکل گرفته است [2,3,8].

ویژگی برجسته سلول های بنیادی بالغ آن است که می توان این سلول ها را بصورت اتولوگ[2] مجدداً به خود بیمار پیوند زد و با این روش احتمال پس زدن پیوند به علت ناسازگاری ایمونولوژیک وجود ندارد. در حالیکه این مشکل در مورد استفاده از سلول های بنیادی جنین بسیار مشکل آفرین می باشد. از سوی دیگر مسائل و مشکلات اخلاقی که در رابطه با سلول های بنیادی جنینی مطرح می باشد از جمله مشکلاتی می باشد که در مورد این سلول ها و استفاده درمانی آنها بر شمرده می شود. با وجود این مزایا تعداد سلول های بنیادی بالغ در بافت بسیار کم بوده و جدا سازی آنها کاری مشکل است. به عنوان مثال در مغز استخوان در هر ده هزار تا پانزده هزار سلول یک سلول بنیادی بالغ وجود دارد، همچنین قدرت تکثیر این سلول ها، نسبت به سلول های بنیادی رویانی و یا سلول های بنیادی مشتق از سلول های زایای جنین محدود بوده و حداکثر می توانند تا ۳۵ بار در محیط کشت پاساژ داده شوند. این سلول ها در بسیاری از بافتها وجود دارند و در نواحی خاصی از هر بافت ساکن شده اند و ممکن است برای سالها بدون تقسیم و ساکت باقی بمانند تا اینکه در شرایط خاصی مانند بیماری، ضایعه به عضو و یا تحریک فعال شوند [2,3,8].

[1] .Adult stem cells
[2] .Autolog