وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

دانشگاه دامغان

دانشکده زیست شناسی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد

زیست شناسی (گرایش سلولی تکوینی)

هم‌کشتی سلول های بنیادی عصبی با سلول های بنیادی مزانشیمی و ارزیابی بیان فاکتورهای نوروتروفیک

توسط:

قدرت‌اله فلسفی نیا

استاد راهنما:

دکتر محمد تقی قربانیان

استادان مشاور:

دکتر تقی لشکربلوکی

دکتر محمود اله‌دادی سلمانی

دی ۱۳۸۹

بسم الله الرحمن الرحيم

به نام خدا

هم‌کشتی سلول های بنیادی عصبی با سلول های بنیادی مزانشیمی و ارزیابی بیان فاکتورهای نوروتروفیک

توسط:

قدرت‌اله فلسفی نیا

پایان‌نامه

ارائه شده به تحصیلات تکمیلی دانشگاه به عنوان بخشی از فعالیت‌های تحصیلی لازم

برای اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته

زیست شناسی (گرایش سلولی تکوینی)

از دانشگاه دامغان

ارزیابی و تأیید شده توسط کمیته پایان‌نامه با درجه: **عالی**

دکتر محمد تقی قربانیان، استادیار دانشکده زیست شناسی دانشگاه دامغان (استاد راهنما).....

دکتر تقی لشکربلوکی، استادیار دانشکده زیست شناسی دانشگاه دامغان (استاد مشاور).....

دکتر محمود اله‌دادی سلمانی، استادیار دانشکده زیست شناسی دانشگاه دامغان (استاد مشاور).....

دکتر بهار موقر، استادیار بخش جنین شناسی پژوهشگاه رویان (داور اول).....

دکتر مریم حاج قاسم کاشانی، استادیار دانشکده زیست شناسی دانشگاه دامغان (داور دوم).....

دکتر سید علی پور موسوی، استادیار دانشکده شیمی دانشگاه دامغان (نماینده تحصیلات تکمیلی).....

دی ۱۳۸۹

تقدیم به

تقدیم به دو عبادتگاه جانم

پدر و مادر عزیزم

که مرا برای رسیدن به رویای کودکی ام با تمام وجود یاری می کنند.

سپاسگزاری

اینک که به لطف پروردگار عالم نگارش پایان نامه خود را به پایان رسانده ام، بر خود لازم می دارم از همه آنان که در پیچ و خم تحصیل صادقانه هدایتم نمودند، تشکر کنم. باشد که این بضاعت اندک، شایسته منزلت والای آن بزرگواران باشد.

در ابتدا خالصانه ترین مراتب قدردانی خود را خدمت استاد راهنمای عزیز و ارجمندم جناب آقای دکتر محمد تقی قربانیان تقدیم می نمایم. ایشان با قبول زحمات فراوان و با رهنمودهای ارزنده، راه دستیابی به اهداف پژوهش را بر من هموار ساختند و وجود سرشار از مهرشان همیشه مایه دلگرمی من بوده است. همچنین مراتب امتنان و قدردانی خود را خدمت اساتید مشاور گرامی ام، جناب آقای دکتر تقی لشکربلوکی و جناب آقای دکتر محمود اله دادی سلمانی تقدیم می نمایم. ایشان با کمال تواضع و سعه صدر، با نیک اندیشی در کارم می نگریستند و با گشاده رویی پاسخگوی مشکلات علمی و تکنیکی اینجانب بودند. مشاوره روحی در کنار مشاوره علمی این بزرگواران به بنده درس استواری، صبر و پشتکار می داد.

نیز صمیمانه ترین مراتب سپاس خود را حضور اساتید بزرگوار، سرکار خانم دکتر بهار موقر و سرکار خانم دکتر مریم حاج قاسم کاشانی تقدیم می دارم. ایشان با قبول زحمت داوری این پایان نامه، مرا بیش از پیش شرمنده الطافشان نمودند. همچنین کمال تشکر را دارم از محضر اساتید فرزانه: جناب آقای دکتر حسن پای لاخی، جناب آقای دکتر سعید زواره، جناب آقای دکتر مهدی خورشیدی، سرکار خانم دکتر رضایی، سرکار خانم دکتر گودرزی و سرکار خانم دکتر ابراری. به پاس تمام الطاف و رهنمودهای شایسته ستایش این بزرگواران. نیز بدین وسیله ارج می نهم محبت های بسیار زیاد و مشاوره های علمی و تکنیکی دوستان بزرگوارم، سرکار خانم حسین پور، خانم سلطانیان، خانم دهقان، آقای علی طالبی، خانم مرادی، خانم نیکوزاد، خانم شیخانی، آقای جعفر علی جان پور، خانم رمضانی و آقای مهدی میرشکار. همچنین تشکر ویژه دارم از محضر مدیریت محترم شرکت گام ایده بهسامان جناب آقای مهندس بیران وند. همچنین بر خود لازم می دانم از زحمات صمیمانه آقایان مجد، امیری و فلاحتی نژاد نیز تقدیر ویژه نمایم.

چکیده

هم‌کشتی سلول های بنیادی عصبی با سلول های بنیادی مزانشیمی و ارزیابی بیان فاکتورهای نوروتروفیک

به وسیله‌ی:

قدرت‌اله فلسفی نیا

هم کشتی سلول های بنیادی با یکدیگر دریچه های جدیدی را پیش روی محققین علم سلول درمانی گشوده است. از اهداف کشت سلول می توان به بررسی مکانیسم های تکاملی بدن، از جمله تکامل مغز به خصوص از طریق سیستم هم کشتی، و ایجاد سلول های مناسب برای سلول درمانی اشاره کرد. از طرفی هدف سلول درمانی جایگزینی یا ترمیم بافت ها یا اندام های آسیب دیده می باشد. به طور کلی دو نوع سلول بنیادی وجود دارد: سلول های بنیادی جنینی (ESCs)[۱] و سلول های بنیادی بالغ (ASCs)[۲]. گرچه ESC ها قابلیت تمایز و تکثیر بالایی دارند لیکن از نظر اخلاقی و قانونی محدودیت هایی برای آن ها تعریف شده است. در حالی که محدودیت های فوق برای ASC ها وجود ندارد. جداسازی این سلول ها آسان بوده و دارای قابلیت تکثیر و تمایز بالایی هستند، بنابراین می توانند جانشین مناسبی برای ESC ها باشند. در این تحقیق NSCs [۳] از هیپوکمپ، و BMSCs [۴] از مغز استخوان جداسازی و کشت داده شدند. سرعت تکثیر و نیز بیان فاکتورهای نوروتروفیک (GDNF، BDNF، CNTF، NT3) در NSC ها، در همکشتی این سلول ها با BMSC ها بررسی گردید. نتایج نشان داد که NSC ها و BMSC ها از نظر بیان NTF ها دارای الگوی مشابهی هستند. تکثیر NSC ها در شرایط هم کشتی به طور معنی داری افزایش می یابد. مقایسه نیمه کمی بیان NTF ها بین گروه های NSC هم کشتی و کنترل تفاوتی نشان نداد. تولید پروتئین BDNF در BMSC ها نسبت به NSC ها افزایش معنی داری دارد. لذا به نظر می رسد جهت مقاصد سلول درمانی، NSC های همکشت شده با BMSC ها نسبت به NSC های معمولی مناسب تر است.

کلمات کلیدی: سلول های استرومایی مغز استخوان، سلول های بنیادی عصبی، همکشتی، فاکتور های رشد عصبی.

---

[۱] Embryonic stem cells

[۲] Adult stem cells

[۳] Neural stem cells

[۴] Bone marrow stromal cells

فهرست مطالب

فهرست مطالب ه

فهرست جدول ها ح

فهرست شکل ها ط

۱ مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱ سلول های بنیادی مزانشیمی ۲

۱-۱-۱ روش های جداسازی سلول های بنیادی مزانشیمی ۵

۱-۱-۲ روش های شناسایی سلول های بنیادی مزانشیمی ۵

۱-۱-۳ تحقیقات در شرایط in vitroو شرایط in vivo ۶

۱-۱-۴ کاربردهای بالینی سلول های بنیادی مزانشیمی ۱۱

۱-۱-۵ مکانیسم های دخیل در ویژگی های درمانی سلول های بنیادی مزانشیمی . ۱۷

۱-۲ سلول های بنیادی عصبی ۲۲

۱-۲-۱ سلول های بنیادی عصبی SGZ ۲۳

۱-۲-۲ هم کشتی سلول های بنیادی عصبی با سلول های بنیادی مزانشیمی . . . ۲۳

۱-۳ محیط کاندیشنال سلول های بنیادی مزانشیمی ۲۶

۱-۴ فاکتورهای رشد عصبی (NTFs) ۲۷

۱-۴-۱ معرفی فاکتورهای نوروتروفیک ۲۷

۱-۴-۲ انواع فاکتورهای نوروتروفیک ۲۹
۱-۴-۳ گیرنده های فاکتورهای نوروتروفیک ۳۰
۱-۴-۴ عملکرد فاکتورهای نوروتروفیک ۳۱
۱-۴-۵ اهمیت فاکتورهای رشد عصبی ۳۴
۱-۵ ضرورت و اهداف تحقیق ۳۷

۲ مواد و روش ها ۳۹

۲-۱ تهیه و نگهداری حیوانات مورد آزمایش ۳۹
۲-۲ تجهیزات آزمایشگاهی ۴۰
۲-۳ آماده سازی محیط کشت و محلول ها ۴۱
۲-۴ جداسازی و کشت سلول های استرومایی مغز استخوان موش صحرایی بالغ . . . ۴۴
۲-۵ جداسازی و کشت سلول های بنیادی عصبی از موش صحرایی بالغ ۴۶
۲-۶ پاساژ سلولی و تهیه ساب کالچر ۴۷
۲-۷ آزمون ارزیابی میزان حیات سلولی ۴۸
۲-۸ تایید هویت سلول های استرومایی و هویت سلول های بنیادی عصبی به روش ایمنوسیتوشیمی ۴۸
۲-۹ تایید هویت سلول های استرومایی به روش رد یابی آنزیم الکالین فسفاتاز ۵۱
۲-۱۰ هم کشتی سلول های بنیادی عصبی با سلول های بنیادی مزانشیمی ۵۲
۲-۱۱ بررسي مولكولي بيان ژنها به روش RT-PCR ۵۲
۲-۱۲ سنجش میزان BDNF ۶۱
۲-۱۳ آنالیز آماری ۶۲

۳ نتایج ۶۳

۳-۱ ویژگی های سلول های استرومایی مغز استخوان در شرایط کشت ۶۳
۳-۲ ویژگی های سلول های بنیادی عصبی در شرایط کشت ۶۳
۳-۳ تایید هویت سلول های استرومایی به روش رد یابی آنزیم الکالین فسفاتاز ۶۴
۳-۴ ایمنوسیتوشیمی ۶۵
۳-۵ هم کشتی سلول های بنیادی مزانشیمی با سلول های بنیادی عصبی ۶۵

۳-۶ RT-PCR ۶۷
۳-۷ اثر تمایزی سلول های MSC بر سلول های NSC ۶۹
۳-۸ بررسی اثر تکثیری سلول های بنیادی مزانشیمی بر سلول های بنیادی عصبی . . . ۷۰
۳-۹ سنجش میزان BDNF ۷۲

۴ بحث و نتیجه گیری **۷۳**

۴-۱ مشخصات سلول های بنیادی مزانشیمی و سلول های بنیادی عصبی و تعیین هویت آن ها ۷۵
۴-۲ اثر تکثیری سلول های بنیادی مزانشیمی بر سلول های بنیادی عصبی در شرایط هم کشتی ۷۸
۴-۳ اثر سلول های بنیادی مزانشیمی بر بیان فاکتورهای نوروتروفیک ۷۹
۴-۴ اثر سلول های بنیادی مزانشیمی بر تمایز سلول های بنیادی عصبی ۸۳
۴-۵ تولید پروتئین BDNF در سلول های بنیادی مزانشیمی و عصبی ۸۶
۴-۶ نتیجه گیری ۸۸
۴-۷ پیشنهادات ۸۹

مراجع **۹۰**

فهرست جدول ها

۱-۱ الگوی فنوتیپی سلول های بنیادی مزانشیمی. جدول برگرفته از منبع ۱۷ . . . . . ۷

۱-۲ برخی از کاربردهای بالینی سلول های بنیادی ۱۵

۱-۳ اثرات پاراکرینی سلول های بنیادی مزانشیمی ۲۱

۲-۱ پرایمر های مورد استفاده و اندازه آن ها در Genbank ۶۱

فهرست شکل ها

۱-۱ قابلیت تمایزی MSC ها در شرایط خاص کشت در in vitro ۸

۱-۲ اثرات پاراکرینی سلول های بنیادی مزانشیمی ۲۰

۱-۳ فرضیه فاکتورهای نوروتروفیک ۲۸

۱-۴ فاکتورهای نوروتروفیک و گیرنده های آن ها ۳۱

۱-۵ مسیرهای مرگ سلولی در نماتود و مهره داران ۳۲

۱-۶ فعال یا غیر فعال شدن کاسپازها ۳۳

۱-۷ ارتباط فاکتورهای نوروتروفیک با بقا یا مرگ سلول ۳۴

۱-۸ مسیرهای پیام رسانی نوروتروفین ها ۳۵

۱-۹ نقش CNTF در تمایز سلول های پیش ساز الیگودندروسیتی به آستروسیت ۳۶

۲-۱ اتوکلاو ۴۰

۲-۲ هود لامینار ۴۱

۲-۳ انکوباتور ۴۲

۲-۴ میکروسکوپ اینورت و دوربین عکسبرداری ۴۲

۲-۵ میکروسکوپ فلورسنت ۴۳

۲-۶ اسپکتروفتومتری ۴۴

۲-۷ دستگاه PCR ۴۵

۲-۸ تامین کننده جریان الکتریسیته AC ۴۵

۲-۹ دستگاه نمایشگر ژل ۴۶

۳-۱ (A) MSC ها که در محیط DMEM/F12حاوی سرم ده درصد کشت داده شدند.(B) MSC های کشت داده شده در محیط DMEM/F12حاوی سرم ده درصد به مدت ۷ روز. ۶۴

۳-۲ (A) NSC ها که در محیط DMEM/F12حاوی سرم ده درصد کشت داده شدند. (B) NSC های کشت داده شده در محیط DMEM/F12حاوی سرم ده درصد به مدت ۷ روز. ۶۴

۳-۳ ردیابی آنزیم آلکالین فسفاتاز در MSC ها. ۶۵

۳-۴ تعیین هویت سلول های استرومایی مغز استخوان. ۶۶

۳-۵ تعیین هویت سلول های بنیادی عصبی با نشانگر GFAP. ۶۶

۳-۶ تعیین هویت سلول های بنیادی عصبی با نشانگر nestin. ۶۷

۳-۷ NSC ها که در محیط DMEM/F12حاوی سرم ده درصد در شرایط هم کشتی با BMSC ها به مدت ۷ روز بودند. ۶۷

۳-۸ A. بیان NTF ها در سلول های بنیادی مزانشیمی، هفت روز پس از کشت، به روش RT-PCR. B. بیان NTF ها در سلول های بنیادی عصبی، هفت روز پس از کشت. C. بیان NTF ها در سلول های بنیادی عصبی در شرایط هم کشتی با سلول های بنیادی مزانشیمی، هفت روز پس از کشت (ستون ها از چپ به راست: Ladder، CNTF، NT3، GDNF، $\beta_2 M$ و BDNF). ۶۸

۳-۹ بیان ژن بتا-۳-توبولین به روش RT-PCRدر NSC، NSC هم کشتی و قشر مغز. ژن $\beta_2 M$ به عنوان ژن کنترل استفاده شد. ۷۰

۳-۱۰ اثر تکثیری سلول های بنیادی مزانشیمی بر سلول های بنیادی عصبی ۷۱

فصل ۱

مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته

مقدمه

سلول های بنیادی با داشتن سه ویژگی قابل شناسایی هستند که شامل ۱. خود تکثیری ۲. قابلیت تمایز به چندین نوع سلول و ۳. توانایی بازسازی در شرایط in vivo است [۱، ۲]. سلول های بنیادی[۱] را به سه گروه جنینی، زاینده و سوماتیک تقسیم می کنند. سلول های بنیادی سوماتیک را ASC ها، یا سلول های بنیادی مشتق از بافت می نامند. قدرت تمایزی SC ها نیز متفاوت است. سلول های بنیادی را بر اساس قابلیت تمایزی به توتیپوتنت (همه توان) مثل توده سلولی داخلی در تخمک لقاح یافته، پلوریپوتنت (چند توان) مثل سلول های بنیادی جنینی، مولتی پوتنت مثل ASC ها و تک توان مثل SC های اپیدرمی تقسیم می نمایند.

سلول های بنیادی جنینی و سلول های بنیادی بالغ از نظر قدرت تمایزی و توان تکثیر با هم فرق دارند. ESC ها بطور متقارن تقسیم می شوند، لذا هر دو سلول حاصله مانند سلول پدری می باشند ولی ASC ها و سلول های بنیادی زاینده بصورت نامتقارن تقسیم می شوند، که یکی از سلول های دختری مانند سلول والد است و دیگری می تواند تمایز یابد. ASC ها در اکثر بافت ها وجود دارند و در این بافت ها در تمام طول عمر از توانایی بازسازی برخوردارند. سلول های بنیادی به ندرت تقسیم می شوند ولی در حضور یک محرک مناسب تکثیر و تمایز می یابند [۱].

سلول های بنیادی بالغ انسانی مشخصه های ویژه بافتی را ندارند، ولی تحت تاثیر سیگنال های

[۱] Stem cells (SCs)

مناسب می توانند به سلول های خاصی تمایز یابند. احتمالا سلولهای بنیادی، ذخیره ای از سلول های جبرانی اند که آماده اند در پاسخ به بیماری یا آسیب مهاجرت کرده و تمایز یابند [۳].

۱-۱ سلول های بنیادی مزانشیمی

سلول های بنیادی مزانشیمی را می توان از مغز استخوان، پریئوستئوم، استخوان ترابکولار، بافت چربی، ساینوویوم، ماهیچه اسکلتی، دندان شیری [۳]، ریه، بند ناف [۴]، درم و خون بدست آورد [۵]. سلول های بنیادی مزانشیمی عمدتا از مغز استخوان ستیغ ایلیاک لگن انسان استخراج می شوند. از استخوان های فمور و تیبیا، ستون فقرات سینه ای و کمری نیز حاصل می شوند. تفاوت اندکی در کنتیک رشد[۲]، پیری سلولی، قابلیت تمایز و موثر بودن دستکاری ژنتیکی در سلول های حاصل از مغز استخوان و بافت چربی وجود دارد. پس از نظر کاربرد بالینی، سهولت دسترسی و کشت، این سلول ها ارجحیت دارند [۳]. در مغز استخوان یک جمعیت سلولی خونساز با حمایت ماتریکس خارج سلولی، که توسط سلول های استرومایی فراهم می گردد، حمایت می شوند. مغز استخوان دو نوع SC دارد که شامل SC های خونساز [۳] و سلول های بنیادی مزانشیمی [۴] است [۱]. همچنین مغز استخوان حاوی پیش سازهای اندوتلیالی می باشد [۶]. سلول های استرومایی مغز استخوان از طریق برهمکنش سلول-سلول و ترشح فاکتورهای رشد و سیتوکین ها موجب تکثیر HSC ها و دودمان آن ها می شوند [۲]. سلول های بنیادی مزانشیمی با بیان دائمی سیتوکین ها نظیر فاکتور تحریک کننده گرانولوسیت،[۵] فاکتور مهارگر سرطان خون [۶]،فاکتور سلول بنیادی[۷]، فاکتور تحریک کننده ی ماکروفاژ[۸]، فاکتور سلول بنیادی خون ساز[۹] می توانند از خون سازی حمایت کنند و فاکتورهای رشد تنظیم کننده محیط مغز استخوان را فراهم نمایند[۵].

---

[۲] Growth kinetics

[۳] Hematopoietic stem cells (HSCs)

[۴] Mesenchymal stem cells (MSCs)

[۵] Granulocyte-colony stimulating factor

[۶] Leukemia inhibitory factor

[۷] Stem cell factor

[۸] Macrophage-colony stimulating factor

[۹] Hematopoietic stem cell

سلول های بنیادی مزانشیمی چند توان مشتق از مغز استخوان [۱۰] اولین بار توسط Friedstein و همکارانش در سال ۱۹۷۰ در یک خوک آفریقایی شناسایی شد. این سلول ها در منطقه غیر خونساز مغز استخوان جنین متولد شده[۱۱] قرار دارند و ریز محیط[۱۲] مناسبی برای تکثیر و تمایز سلول های بنیادی خونساز فراهم می کنند. در in vitro، BMMSC ها سلول های چسبنده، کلون ساز، غیرفاگوسیتوزکننده و از نظر رفتار شبیه فیبروبلاست هستند. جداسازی و کشت آن ها آسان است و کاندید بسیار مناسبی برای سلول درمانی می باشند [۷]. MSC های مشتق شده از بافت های مختلف از نظر توان تمایز و الگوی بیان ژن ها متفاوت اند [۸]. سلول های بنیادی مزانشیمی قادرند به سلول های بافت های مزودرمی (چربی، استخوان، غضروف و ماهیچه) [۹]، مونوسیت [۱۰] و بافت های غیرمزودرمی ازجمله نورون، الیگودندروسیت، شوان و آستروسیت تمایز یابند [۹]، همچنین می توانند به سلول های با منشاء مزودرم احشایی، نورواکتودرمی، اندودرمی و اپیتلیوم کبد، ریه، روده تمایز یابند [۵]. سلول های بنیادی مزانشیمی بخش بسیار کوچکی از سلول های هسته دار مغز استخوان را تشکیل می دهند (۰.۰۰۱-۰.۰۱ درصد) اما پس از استخراج می توانند به طور بسیار اختصاصی تکثیر و بسته به شرایط محیط کشت به چند سلول تمایز یابند. گرچه تعداد MSC ها در مغز استخوان کم است ولی می توان با روش هایی مثل استفاده از محلول با شیب غلظتی پرکول این سلول ها را خالص تر کرد. MSC ها را اغلب در محیط DMEM (با گلوکز زیاد) در حضور FBS[۱۳] ده درصد کشت می دهند. این سلول ها به کف ظرف پلاستیکی متصل می شوند. کشت اولیه را می توان به مدت ۱۲-۱۶ روز نگه داشت و در این مدت سلول های بنیادی خونساز که قادر نیستند به کف فلاسک بچسبند، تعدادشان کاهش می یابند. سلول های بنیادی مزانشیمی را می توان در تمام طول عمر از فرد استخراج کرد ولی ESC ها در دوره محدودی قابل استخراج هستند. ESC ها می توانند به هر بافتی تبدیل شوند، ولی MSC ها قابلیت تمایز محدودتری دارند. در محیط کشت، ESC ها قادرند به طور نامحدودی خودتکثیری داشته و قابلیت تمایزی خود را حفظ کنند، ولی MSC ها دوره زندگی محدودی دارند. کاربرد ESC ها به صورت آلوژنیک بواسطه پاسخ ایمنی با پس زدگی پیوند مواجه است، اما این مشکل را می توان با روش کلون کردن یعنی انتقال هسته ی سلول های سوماتیک

[۱۰] Bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem

[۱۱] Postnatal

[۱۲] Microenvironment

[۱۳] Fetal bovine serum

بیمار به سلول های بنیادی جنینی فاقد هسته (ایجاد ESC های اتولوگوس) برطرف کرد. این کار دارای مشکلات اخلاقی و حقوقی است [۴]. مطالعات نشان می دهد که قدرت تمایزی، تکثیر، خود تجدیدی و مورفولوژی MSC ها در in vitro به محیط کشت شان وابسته است [۱۰]. بررسی ها نشان می دهد که در مغز استخوان سلول های بنیادی طناب خونی [۱۴] و سلول های بنیادی خون محیطی[۱۵] وجود ندارند و این مکان بهترین منبع MSC ها می باشد [۱۱].

در بین BMSC های استخراج شده تعداد کمی سلول وجود دارند که بسیار مشابه ESC یا NSC رفتار می کنند، ولی ارتباط آن ها با BMSC ها دقیقا معلوم نیست. Verfaillie آن ها را MAPCs[۱۶] نامید. آن ها براساس نشانگرهای ایمنوژنیک سطحی جدا و انتخاب شدند، که بدون اینکه دچار پیری شوند، در in vitro تکثیر می یافتند [۱۲]. MAPC ها پلاستیسیتی قابل توجهی دارند و می توانند علاوه بر ایجاد انواع سلول های با منشاء مزودرمی، سلول های اندوتلیالی، نورونی و اپیتلیالی را در شرایط خاص in vitro تولید کنند. MAPC ها از انسان، موش یا مغز استخوان موش صحرایی تخلیص شده است. با تزریق این سلول ها به داخل بلاستوسیست دریافتند که MAPC ها قادرند در تشکیل اکثر بافت های سوماتیک شرکت کنند. به علاوه پس از تزریق این سلول ها به درون خون محیطی موش، MAPC ها می توانند به بافت هایی نظیر مغز استخوان و کبد که دارای سرعت نو زایی[۱۷] سلولی بالایی هستند، وارد شوند. اما این سلول ها در ماهیچه قلبی و اسکلتی یافت نشده اند. تصور بر این است که MAPC ها بازمانده ESC ها هستند و در دوره جنینی در مغز استخوان قرار می گیرند تا پس از تولد در ترمیم و بازسازی انواع بافت ها شرکت کنند. شاید MAPC ها از مغز استخوان وارد خون محیطی شده و به بافت های دیگر نیز مهاجرت نمایند [۲]. MAPC های موجود در جوندگان برخلاف نوع انسانی برای حفظ و گسترش در in vitro به فاکتور PDGF[۱۸] نیاز دارند [۱۲].

ریز محیط های تنظیمی(نیچ)[۱۹] مجزایی در مغز استخوان وجود دارد و سلول های پیش ساز استرومایی،

---

[۱۴] Cord blood

[۱۵] Peripheral blood stem cell collection

[۱۶] Multipotent adult progenitor cells

[۱۷] De novo

[۱۸] Platelet-derived growth factor

[۱۹] Niche

به ویژه استئوبلاست ها هستند که این نیچ ها را تعیین می کنند. استروما و سلول های استرومایی، بلوغ سلول های پیش ساز خونی را حمایت فیزیکی می کنند و علائم و سیگنال های سلولی وسیعی را برای تعهد، تمایز و بلوغ سلول های خون ساز تولید می کنند [۴].

تا کنون MSC ها، در in vivo بطور آشکاری شناخته نشده اند. چون نشانگرهای قابل اعتماد و مورد توافق این سلول ها وجود نداشته است و احتمالا نشانگرهایی که در MSC های کشت شده بدست می آیند، به جای اینکه مشخصه MSC ها باشند، ممکن است تصادفا در اثر شرایط کشت ایجاد شده باشند [۸]. علاوه بر فقدان نشانگر اختصاصی، اطلاعاتی در مورد مکان آناتومیک و توزیع MSC ها در in vivo وجود ندارد [۴].

۱-۱-۱ روش های جداسازی سلول های بنیادی مزانشیمی

معمولا جداسازی با استفاده از سانتریفیوژ (که گاهی به کمک محلول های غلظتی، (مثل پرکول) کیفیت جداسازی افزایش می یابد) صورت می گیرد، تا یک لایه از سلول های مغز استخوان بدست آید. همچنین از توانایی این سلول ها برای چسبیدن به کف ظرف پلاستیکی کشت استفاده می کنند. روش های جدیدتر شامل بیدهای مگنتیک[۲۰] یا FATC sorting توام با آنتی بادی هایی علیه نشانگرهای خاص MSC ها است [۱۳]. آنتی بادی Stro-1 به طور زیادی جداسازی و تخلیص MSC ها را تسهیل می کند. ایمنوسلکشن (انتخاب سلول ها بواسطه اتصال به آنتی بادی خاص) سلول های مشتق شده از مغز استخوان نشان می دهد، که سلول های مثبت به Stro-1 تماما قادرند FCF-U[۲۱] ایجاد کنند و می توانند به چندین نوع سلول از جمله استئوبلاست، کندروسیت و آدیپوسیت تمایز یابند [۵].

۱-۱-۲ روش های شناسایی سلول های بنیادی مزانشیمی

چسبیدن به کف ظرف کشت برای تخلیص MSC ها کافی نیست. همانگونه که گفته شد نشانگر اختصاصی این سلول ها هنوز شناخته نشده، ولی ترکیبی از نشانگرهای سطح سلولی برای تشخیص هویت و خالص سازی آن ها مورد استفاده قرار گرفته است. برخی برای تخلیص MSC ها از نشانگر سطح سلولی CD71 (گیرنده ترانسفرین) استفاده می کنند. این سلول ها نسبت به این

[۲۰] Magnetic beads

[۲۱] Fibroblast-colony-forming units

نشانگر مثبت هستند [۴، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸] و بیش از ۹۵درصد BMSC ها با ماکر CD71 واکنش می دهند [۱۹]. روش دیگر برای خالص سازی این سلول ها استفاده از نشانگرهای CD34/CD45/CD11b است [۳]. سلول های استرومایی مغز استخوان معمولا نسبت به CD34 و CD45 منفی و نسبت به CD90/Thy-1 مثبت اند [۱۲]. همچنین MSC ها نسبت به CD14 ،$CD79\alpha$ CD19، و HLA-DR منفی و برای نشانگرهای CD73 و CD90 مثبت می باشند [۸]. سلول های استرومایی مغز استخوان نسبت به CD34 و CD50 که نشانگر خاص سلول های HSC می باشد، منفی هستند. (جدول ۱-۱) [۵]. برای شناسایی MSC های انسانی[۲۲] از آنتی بادی های مونوکلونال مثل CD166، Stro-1 و SH-2 نیز استفاده می گردد [۳، ۵]. همه این آنتی ژن ها بر روی انواع سلول های دیگر وجود دارد و نمی توان به طور اختصاصی برای بررسی in vivo سلول های بنیادی ویژه بافتی بکار برد [۳].

شاخص های دیگر MSC ها توانایی ایجاد واحدهای کلنی شکل در محیط کشت، بیان نشانگرهای گلیکوفورین A و BMPR1a است [۱۳]. یکی از مشخصه های MSC ها توانایی تمایز به چندین بافت از جمله استخوان، چربی و غضروف در شرایط in vitro است [۵]. روش شناسایی MSC ها که توسط انجمن بین المللی سلول درمانی پیشنهاد شده این است که این سلول ها باید سه ویژگی داشته باشند که عبارتند از: ۱. چسبیدن به پلاستیک، در صورتی که در شرایط استاندارد کشت شوند. ۲. بیان نشانگرهای CD105، CD73، CD90 و عدم بیان نشانگرهای CD45، CD34، CD14 یا CD11b ۳. توانایی تمایز به استئوبلاست، آدیپوسیت و کندروبلاست در شرایط in vitro [۱۰].

۱-۱-۳ تحقیقات در شرایط in vitro و شرایط in vivo

MSC ها در محیط کشت حاوی بتا-گلیسرول فسفات، اسید اسکوربیک ۲-فسفات، دگزامتازون و سرم جنین گاو به استئوبلاست تمایز می یابند. به علاوه MSC ها در شرایط کشت سه بعدی، محیط فاقد سرم و وجود یکی از اعضای خانواده ی $TGF\beta$ به سلول های غضروفی تمایز می یابند. اما در صورت حضور ایزوبوتیل متیل گزانتین به سلول های چربی تمایز می یابند. MSC های موشی که در معرض آمفوتریسین B قرار گرفته باشند فیبرهای چند هسته ای میوتیوب مانند، ایجاد می کنند [۳]. در شکل ۱ مشاهده می شود که MSC ها می توانند در شرایط کشت خاص به بافت استخوان،

[۲۲] Human mesenchymal stem cells (hMSCs)

Table 1
Phenotypic profile of MSCs. [11,24,25,31,44,70,75,93]

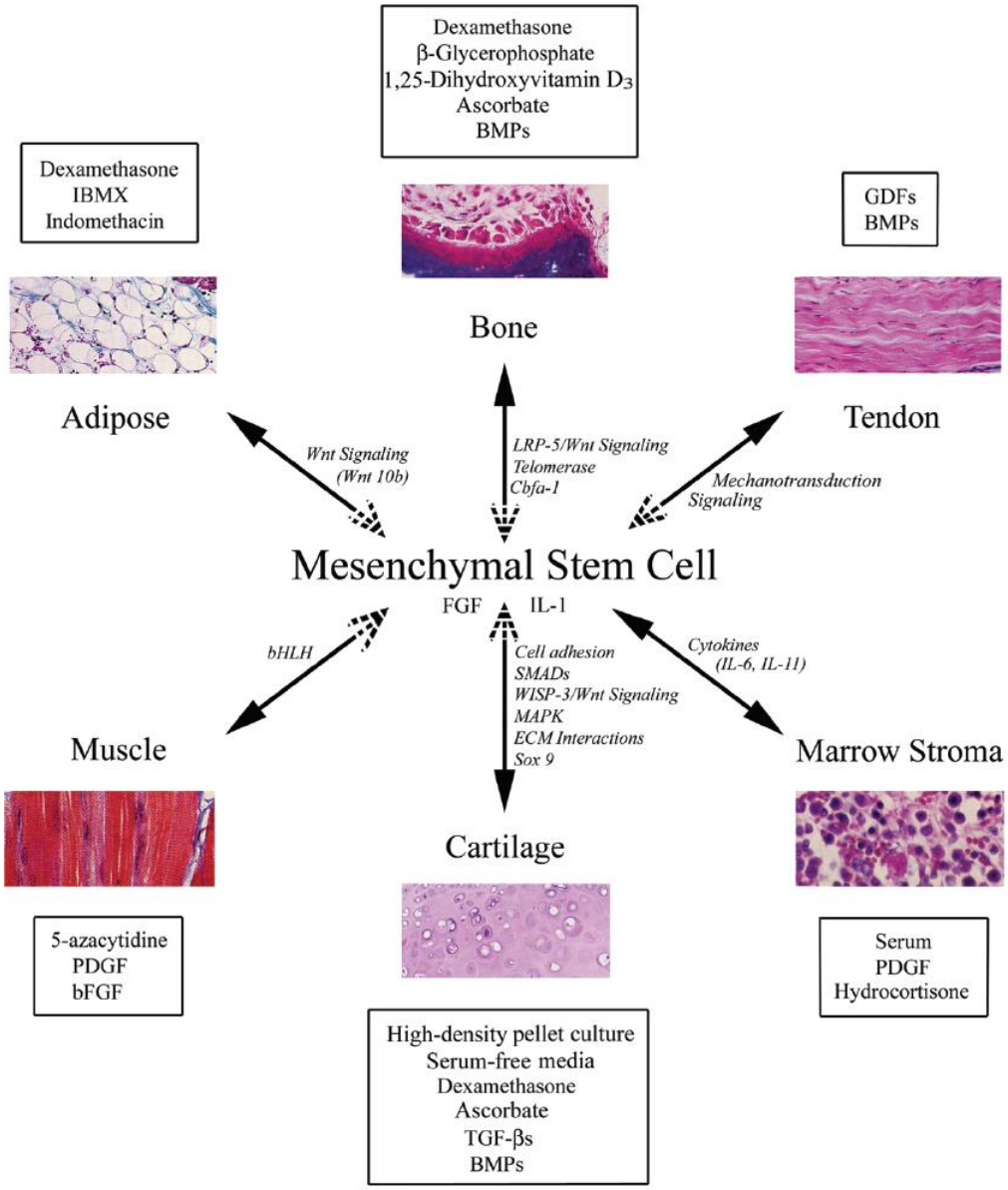
	Detection		Detection
Haematopoietic receptors		**Growth factors and Cytokines**	
CD1a (T6)	Neg	CD25 (Interleukin-2R)	Neg
CD14 (Lipopolysaccharide receptor)	Neg	CD71 (Transferrin receptor)	Pos
CD34	Neg	CD114 (Granulocyte-colony stimulating factor receptor)	Neg
CD45 (Leukocyte common antigen)	Neg	CD117 (Stem cell factor receptor)	Neg
CD133 (AC133)	Neg	CDw119 (Interferon γ R)	Pos
Adhesion molecules		CD120 a & b (Tumor Necrosis factor-a 1&2 R)	Pos
CD31 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1)	Neg	CD121 a & b (Interleukin-1R a&b chain)	Pos
CD44 (Hyaluronate receptor)	Pos	CD123 (Interleukin-3R)	Pos
CD50 (Intercellular adhesion molecule 3)	Pos	CD124 (Interleukin-4R)	Pos
CD54 (Intercellular adhesion molecule 1)	Pos	CD126 (Interleukin-6R)	Pos
CD56 (Neural cell adhesion molecule)	Pos	CD127 (Interleukin-7R)	Pos
CD58 (Lymphocyte function-associated antigen 3)	Pos	CD140a (Platelet derived growth factor receptor)	Pos
CD62E (E-selectin)	Neg	FGFR (Fibroblast growth factor receptor)	Pos
CD62L (L-selectin)	Pos	CD271 (Low affinity nerve growth factor receptor)	Pos
CD62P (P-selectin)	Neg		
CD102 (intercellular adhesion molecule 2)	Pos	**Other Markers**	
CD106 (Vascular cell adhesion molecule-1)	Pos	CD3 (CD3 complex)	Neg
CD144 (Calherin 5)	Neg	CD9 (Tetraspannin)	Pos
CD166 (Activated leukocyte cell adhesion molecule)	Pos	CD13 (Aminopeptidase N)	Pos
		CD19 (B-lymphocyte Surface Antigen B4)	Neg
Integrins		CD73 (Ecto-5'-nucleotidase)	Pos
CD11a (Lymphocyte function-associated antigen-1 α)	Neg	CD80 (B7-1)	Neg
CD11b (Macrophage-1 antigen)	Neg	CD83 (HB15a)	Neg
CD11c (Complement receptor type 4 a chain)	Neg	CD86 (B7-2)	Neg
CD18 (Lymphocyte function-associated antigen-1 β)	Neg	CD90 (Thy-1 glycoprotein)	Pos
CD29 (Very late antigen β)	Pos	CD105 (Endoglin)	Pos
CD49a (Very late antigen a1)	Pos	CD146 (MUC18,Mel-CAM, S-endo)	Pos
CD49b (Very late antigen a2)	Pos	CD157 (BP-3 or Bone Marrow Stromal cell antigen-1)	Pos
CD49c (Very late antigen a3)	Pos	SH3 (Src homology 3)	Pos
CD49d (Very late antigen a4)	Neg	D7-FIB	Pos
CD49e (Very late antigen a5)	Pos	STRO-1	Pos
CD49f (Very late antigen a6)	Pos	HLA-A,B,C	Pos
CD51 (Vitronectin R a chain)	Neg	SSEA-3,4	Pos
CD61 (Vitronectin R β chain)	Pos		
CD104 (β_4 integrin)	Pos		

جدول ۱-۱: الگوی فنوتیپی سلول های بنیادی مزانشیمی. جدول برگرفته از منبع ۱۷

غضروف، چربی، ماهیچه، تاندون تمایز یابند [۵]. تلاش های زیادی برای ایجاد سلول های عصبی از MSC ها در in vitro با استفاده از مواد شیمیایی، ترانسفکشن یا هم کشتی انجام شده است که در ادامه اشاره می شود. تعداد زیادی از مواد شیمیایی به منظورشروع تمایز عصبی BMSC استفاده شده است. Deng در سال ۲۰۰۹ سعی کرد به کمک dbcAMP[۲۳] به همراه یک مهارگر فسفودی استراز به نام IBMX[۲۴] میزان cAMP را در BMSC های انسانی افزایش دهد و گزارش داد که پس از شش

[۲۳] Membrane-permeable dibutyryl cAMP

[۲۴] Isobutylmethylxantine



شکل ۱-۱: قابلیت تمایزی MSC ها در شرایط خاص کشت در in vitro

روز ۲۵درصد از جمیعت سلولی، ظاهری شبه عصبی یافته اند. Woodbury در سال ۲۰۰۰ یک پروتکل سه مرحله ای را پیشنهاد داد. به اینصورت که ابتدا سلول ها در محیط حاوی بتا مرکاپتواتانل (BME) پیش انکوبه[۲۵] شدند، سپس سلول ها در محیط فاقد سرم حاوی یک آنتی اکسیدانت به نام BHA[۲۶] و دی متیل سولفوکساید (DMSO) القا شدند، در انتها سلول ها را در یک محیط حاوی مواد ذکر شده، به علاوه والپوریک اسید، فورسکولین (یک تحریک گر آدینیلاتید سیکلاز) و ساپلمنت

[۲۵] Preincubation

[۲۶] Butylated Hydroxyanisole