بسم الله الرحمن الرحيم

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و
نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه
متعلق به دانشگاه رازی است.

دانشکده علوم پایه
گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست شناسی
گرایش سلولی تکوینی

عنوان پایان نامه:

بررسی اثر کرومیوم کلراید بر تمایز آدیپوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش

استاد راهنما:
دکتر مهری آزادبخت

نگارش:

مهسا پورمرادی

شهریورماه ۱۳۹۲

خدایا من در کلبه‌ی حقیرانه‌ی خود کسی را دارم که تو در عرش کبریایی خود نداری، من چون تویی را دارم و تو چون خود نداری

اکنون که با استعانت از درگاه پروردگار منان گامی دیگر از زندگی‌ام را پشت سر نهادم بر خود لازم می‌دانم مراتب سپاس و قدردانی صمیمانه خویش را به جای آورده و سپاسگزاری کنم از:

استاد فرهیخته و فرزانه خانم دکتر مهری آزادبخت، استاد راهنمایم در علم و اخلاق که در تعلیم من دلسوزانه تلاش نمودند و از هیچ حمایتی دریغ نکردند.

استاد ارجمند، جناب آقای دکتر علی بیدمشکی پور که به عنوان ممتحن داخلی، زحمت قرائت پایان نامه اینجانب را به عهده گرفتند.

استاد ارجمند، جناب آقای دکتر نصراله رستگار پویانی که به عنوان ممتحن خارجی پایان نامه اینجانب ، قبول زحمت فرمودند.

جناب آقای دکتر نادر دانشفرکه به عنوان نماینده تحصیلات تکمیلی در جلسه‌ی دفاع اینجانب حضور داشتند.

اساتید محترم گروه زیست شناسی خانم دکتر پرتو و آقایان دکتر اکرمی، دکتر شریفی، دکتر قبادی ، دکتر یوسفوند و آقای نجفی مهر که طی مدت تحصیل دوره کارشناسی ارشد از محضر این بزرگواران استفاده نموده‌ام.

و دوستان خوبم خانم ها: قنبری،گودرزدشتی، جوانمرد، محمودی، ربزیا، قنبرعلی، زینلی، کلهری، بشیری، گراوندی، افکاری، محمدی، قهرمانی، ملکی، امینی، فلاح، سمنگانی، شاهمرادی و آقایان: حرمشاهی، کهتری، ژاله، کرمیانی، حاتمی، امین زاده و دیگر دانشجویان عزیز در آزمایشگاه‌های مختلف گروه زیست شناسی صمیمانه تشکر می‌کنم.

و با آرزوی موفقیت برای تمام کسانی که مرا صادقانه در این دوره همراهی کرده و از هیچ کمکی فروگذار نکردند.

مهسا پورمرادی

شهریور ماه ۱۳۹۲

تقدیم به

چشمه‌های جوشان محبت

جلوه‌های مهر و عطوفت الهی

لبخندهای پر مهر زندگیم

پدر و مادر عزیزم

و

همسر مهربانم

چکیده

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (BMSCs)، سلول‌های پر توانی هستند که توانایی تمایز به انواع سلول‌ها، از جمله سلول‌های چربی را دارند. این مطالعه اثر کرومیوم کلراید را بر تمایز آدیپوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش مورد بررسی قرار می دهد.

در این بررسی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان از استخوان ران و درشت نی موش نژاد NMRI جداسازی شده و در محیط کشت DMEM همراه با ۵ درصد FBS کشت داده شدند. پس از اولین پاساژ سلول‌هادر محیط‌تمایزی‌دردوگروه۱(۰/۰۱mg/ml انسولین) و۲(۰/۰۱mg/ml انسولین‌و۴۰۰ng/ml دگزامتازون) همراه با غلظت-های مختلف کرومیوم کلراید۰و ۵و ۱۰و ۲۵و ۵۰و ۱۰۰ میکرومولار (به ترتیب تیمارهای گروه کنترل و I، II، III، IV، V) قرار گرفتند و هر دو روز یکبار محیط تیماری به مدت ۲۱ روز تعویض شد و اثر غلظت‌های مختلف کرومیوم کلراید پس از طی دوره ی کشت، بر میزان بقای سلول‌ها و تشکیل قطرات چربی و مشاهده قطرات چربی در سلول‌ها با استفاده از رنگ آمیزی سودان (III) و تشکیل کربوهیدرات‌ها در سلول‌ها با رنگ آمیزی پریودیک اسید شیف (PAS) مورد بررسی قرار گرفتند. مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش در حضور محیط تیماری کرومیوم کلراید به سلول‌های چربی تمایزمی‌یابند. با بررسی میزان بقای سلول‌ها ، در گروه ۱و۲ کمترین میزان بقا در تیمارV و بیشترین میزان بقا در تیمار I نسبت به گروه کنترل مشاهده شد($p<۰/۰۵$). همچنین در رنگ آمیزی سودان(III) تیمارهای IV و V گروه ۲ سلول‌های چربی بیشترین شدت رنگ را نشان دادند. در رنگ آمیزی پریودیک اسید شیف، در گروه ۲ در تیمار های IV و V بیشترین شدت رنگ را در بین سایر تیمار ها نشان دادند. نتایج این مطالعه نشان داد در محیط حداقل می‌توان با به کارگیری کرومیوم کلراید سلول‌ها را به سمت تمایز آدیپوسیتی پیش برد.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، کرومیوم کلراید، تمایز چربی، موش

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱-مقدمه ای بر سلول‌های بنیادی..... ۲
۱-۱-۱-ویژگی‌های سلول‌های بنیادی..... ۳
۱-۱-۲- مارکرهای سلول‌های بنیادی..... ۳
۱-۲-انواع سلول های بنیادی..... ۴
۱-۲-۱-سلول‌های بنیادی جنینی..... ۵
۱-۲-۲-سلول‌های بنیادی زایا..... ۶
۱-۲-۳-سلول‌های بنیادی مایع آمنیوتیک و جفت..... ۶
۱-۲-۴- سلول‌های بنیادی بالغ..... ۸
۱-۲-۵-سلول‌های بنیادی همه توان القایی..... ۹
۱-۳-سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۱۰
۱-۳-۱-مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی..... ۱۰
۱-۳-۲-منشا جنینی و بالغ سلول های بنیادی مزانشیمی..... ۱۱
۱-۳-۳-خودنوزایی سلول های بنیادی مزانشیمی..... ۱۲
۱-۴-ویژگی‌های فنوتیپی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان..... ۱۳
۱-۵- نیچ سلول بنیادی مزانشیمی در مغز استخوان..... ۱۴
۱-۵-۱-ترکیبات محلول..... ۱۵
۱-۵-۲-ترکیبات ماتریکس خارج سلولی..... ۱۵
۱-۵-۳-ترکیبات سلولی..... ۱۶
۱-۶- پتانسیل تمایز چند دودمانی..... ۱۶
۱-۷- تنظیم تمایز..... ۱۸
۱-۸- آدیپوژنز..... ۱۹
۱-۸-۱- مسیر داخل سلولی آدیپوژنز..... ۲۰
۱-۹-تمایز آدیپوسیت..... ۲۲
۱-۹-۱-رسپتورفعال کننده- تکثیری پراکسی‌زوم(PPAR)..... ۲۵
۱-۹-۲-پروتئین اتصال یافته به CCAT/ افزاینده ۲۶
۱-۱۰-فاکتورهای تحریکی آدیپوژنز..... ۲۷
۱-۱۰-۱-فاکتور رشد انسولین-۱..... ۲۷
۱-۱۰-۲-فاکتور تحریک کننده- کلونی ماکروفاژ..... ۲۷
۱-۱۰-۳-اسیدهای چرب و پروستاگلاندین..... ۲۸
۱-۱۰-۴-گلوکوکورتیکوئید(GC)..... ۲۸
۱-۱۰-۵-پروتئین ریخت زای استخوان (BMP)..... ۲۹
۱-۱۱-عوامل مهاری آدیپوژنز..... ۲۹
۱-۱۱-۱-فاکتورهای رشد..... ۲۹

۱-۱۱-۲- پروستاگلاندین F2α ۳۰
۱-۱۱-۳- سیتوکاین‌های التهابی ، هورمون‌های رشد..... ۳۰
۱-۱۱-۴- فاکتور رشد تغییر شکل دهنده β (TGF-β)..... ۳۱
۱-۱۱-۵- پیام رسانی Wnt/ β- catenin..... ۳۱
۱-۱۱-۶-پیام رسانی Hedgehog ۳۲
۱-۱۲- مواد معدنی ۳۴
۱-۱۲-۱-کرومیوم(Cr)..... ۳۴
۱-۱۲-۲-نقش تغذیه‌ای کرومیوم ۳۵
۱-۱۲-۳-جذب و دفع کرومیوم..... ۳۵
۱-۱۲-۴-مکانیسم عملکرد کرومیوم..... ۳۶
۱-۱۲-۵-نقش کرومیوم در متابولیسم..... ۳۷
۱-۱۲-۶-کرومیوم و تنظیم هورمونی..... ۳۷
۱-۱۲-۷-کرومیوم و اثرات توکسیک..... ۳۸
۱-۱۲-۸-کرومیوم کلراید و تمایز..... ۳۸
۱-۱۳-گلوکوکورتیکوئیدها..... ۳۸
۱-۱۳-۱-اثرات بیولوژی گلوکوکورتیکوئیدها..... ۳۹
۱-۱۳-۲-دگزامتازون (گلوکوکورتیکوئیدها)..... ۴۰
۱-۱۴- انسولین..... ۴۱
۱-۱۵-اهداف تحقیق..... ۴۱

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱- فهرست مواد، تجهیزات، بافرها و محلول‌های مورد استفاده در آزمایش..... ۴۳
۲-۱-۱-مواد مورد استفاده در این تحقیق..... ۴۳
۲-۱-۲-تجهیزات بنیادی..... ۴۳
۲-۱-۳-وسایل اولیه‌ی مورد استفاده..... ۴۳
۲- ۲- حیوان آزمایشگاهی..... ۴۴
۲-۲-۱-جداسازی و کشت اولیه‌ی سلول‌های بنیادی مغز استخوان..... ۴۴
۲-۲-۱-۱- تهیه بافر PBS (بدون Ca^{2+} و Mg^{2+})..... ۴۵
۲-۲-۱-۲- روش تهیه محیط کشت پایه DMEM..... ۴۵
۲-۲-۱-۳- آنتی بیوتیک Penicillin G / Streptomycin Sulfate..... ۴۶
۲-۲-۱-۴- سرم جنین گاو..... ۴۶
۲-۲-۱-۵- محلول اسید آمینه های غیر ضروری (۱۰۰ X) ۴۷
۲-۲-۱-۶- محلول L-Glutanin (۲۰۰ mM) (۱۰۰ X) ۴۷
۲-۲-۲- پاساژ سلولی..... ۴۷
۲-۲-۲-۱- محلول Trypsin/ EDTA..... ۴۸
۲-۲-۲-۲- شمارش سلولی..... ۴۸
۲-۲-۲-۳- محلول تریپان بلو ۰/۴ درصد..... ۴۹

۲-۳- محیط کشت مورد استفاده برای تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش..... ۴۹
۲-۳-۱-کرومیوم کلراید.....۴۹
۲-۳-۲-دگزامتازون.....۵۰
۲-۳-۳- انسولین ۵۰
۲-۴- بررسی اثر دوزهای مختلف کرومیوم کلراید بر تشکیل و رشد قطرات چربی در سلول‌های‌بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش ۵۰
۲-۵-بررسی میزان بقای سلول‌ها پس از تیمار با استفاده از رنگ آمیزی حیاتی نوترال رد.....۵۱
۲-۵-۱- محلول ذخیره نوترال رد ($4mg.ml^{-1}$).....۵۱
۲-۵-۲- مدیوم نوترال رد($40\ \mu g.ml^{-1}$) ۵۱
۲-۵-۳- محلول رنگ بر.....۵۲
۲-۶-بررسی اثر دوزهای مختلف کرومیوم کلراید بر تشکیل و رشد قطرات چربی با استفاده از رنگ آمیزی سودان (III).....۵۲
۲-۷- بررسی اثر دوزهای مختلف کرومیوم کلراید بر تشکیل کربوهیدرات‌ها با استفاده از رنگ آمیزی پریودیک اسید شیف (PAS).....۵۳

فصل سوم: نتایج

۳-۱-جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش.....۵۶
۳-۱-۱-کشت اولیه‌ی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان.....۵۶
۳-۲-تعیین میزان بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از تیمار با کرومیوم کلراید با رنگ آمیزی حیاتی نوترال رد.....۵۸
۳-۳- اثر کرومیوم کلراید بر تمایز آدیپوسیتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش.....۶۰
۳-۴- بررسی مورفولوژیکی سلول‌های تمایز یافته به آدیپوسیت با استفاده از رنگ آمیزی سودان(III).....۶۵
۳-۵- بررسی ذخیره کربوهیدرات در سلول‌های تیماری با استفاده از رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف (PAS).....۷۰

فصل چهارم: بحث

۴-۱- بحث.....۷۳
۴-۲-پیشنهادات.....۷۹

منابع.....۸۰

فهرست شکل

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- مدلی از تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی..... ۱۷
شکل۱-۲- مدل فرضی از تمایز سلول‌های بنیادی بالغ..... ۱۹
شکل۱-۳- القای هورمونی آدیپوژنز..... ۲۲
شکل۱-۴- مروری بر مراحل تمایز آدیپوسیت..... ۲۴
شکل۱-۵- شمایی از سیگنال Wnt..... ۳۲
شکل۱-۶- مسیر پیام رسانیHedgehog ۳۳
شکل۲-۱- نحوه شمارش سلولی بر روی لام نئوبار..... ۴۸
شکل۳-۱- سلول‌های جدا شده از مغز استخوان..... ۵۷
شکل۳-۲- نمایی از چسبیدن و دوکی شدن سلول‌ها سه روز پس از کشت اولیه..... ۵۷
شکل۳-۳- تشکیل کلنی و تک لایه‌ی سلولی هفت روز پس از کشت اولیه..... ۵۸
شکل۳-۴- سلول های تیمارشده با محیط تمایزی گروه ۱ در روز بیست و یکم پس از تیمار..... ۶۲
شکل۳-۵- سلول های تیمارشده با محیط تمایزی گروه ۲ در روز بیست و یکم پس از تیمار..... ۶۴
شکل۳-۶- رنگ‌آمیزی‌سودان(III)در سلول‌های تیمارشده‌بامحیط تمایزی‌گروه۱درروز بیست‌ویکم..... ۶۷
شکل ۳-۷-رنگ‌آمیزی‌سودان(III)در سلول‌های‌تیمارشده‌بامحیط‌تمایزی‌گروه۲درروزبیست‌ویکم..... ۶۹
شکل۳-۸- بررسی ذخیره کربوهیدرات در سلول‌های تیمار شده با محیط تمایزی گروه ۱ با استفاده از رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف (PAS)..... ۷۰
شکل۳-۹- بررسی ذخیره کربوهیدرات در سلول‌های تیمار شده با محیط تمایزی گروه ۲ با استفاده از رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف (PAS)..... ۷۱

فهرست نمودار

عنوان **صفحه**

نمودار۳-۱-میزان بقای سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف کرومیوم کلراید در محیط تمایزی گروه ۱ و ۲ ..... ۵۹

فهرست جدول

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱- مواد مورد استفاده در تحقیق..... ۴۳
جدول۲-۲- مواد مورد نیاز در تهیه‌ی بافرPBS ۴۵
جدول ۲-۳-مواد مورد نیاز در تهیه‌ی محلول تریپان بلو ۰/۴ درصد..... ۴۹
جدول۲-۴-مواد مورد نیاز در تهیه ی محلول رنگ بر..... ۵۲

Abbreviation

AE	Amniotic Epiblast
ACTH	Adreno Corticotrophic Hormone
AMF	Amniotic Mesenchymal Fibroblast
ap-2	adipocyte protein 2
APC	Anaphase-Promoting Complex
BMP	Bone Morphogenic Protein
BMSCs	Bone Marrow Stem Cells
BAT	Brown Adipose Tissue
C/EBPs	CCATT/Enhancer Binding protein
CAMP	Cyclic Adenosine Monophosphat
CFU-F	Colony Forming Unit Fibroblast
CREB	CAMP -Response Element-Binding Protein
Dhh	Desert hedgehog
ECM	Extra Cellular Matrix
EGF	Epidermal Growth Factor
FFAs	Free Fatty Acids
FGF	Fibroblast Growth Factor
FKHR	Forkhead Transcription Factor
GLIs	Glioma- associated oncogened
GTF	Glucose Tolerance Factor
GLUT-4	Glucose Transporter-4
GPDH	Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase
GSK-3β	Glycogen Synthesis kinase-3β
GR	Glucocorticoid Receptor
hEGC	human Embryonic Germ cell
HSCs	Hematopoietic Stem Cells
HSP	Heat Shock Protein family
HPA	Hypothalamic- Pituitary- Adrenal
Ihh	India hedgehog
IGFR-I	Insulin-like Growth Factor Receptor I
IPSCs	Induced Pluripotent Stem Cells
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LPL	Lipo Protein Lipase
MCSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
MSC	Mesenchymal Stem Cell
PDGF	Platelet- Drived Grovth Factor
PPARγ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ
PIP-KB	PhosphoInositol Phosphat Kinase B
SCF	Stem Cell Factor
Shh	Sonic hedgehog
Smo	Smoothend
SSEA	Stage-Specific Embryonic Antigen
TGF-α	Transforming Growth Factor-α
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
TNF-α	Tumor Necrosis Factor
UCP-1	Uncoupling Protein 1
WAT	White Adipocyte Tissue

فصل اول

مقدمه

۱-۱-مقدمه‌ای بر سلول‌های بنیادی[1]

سلول‌های بنیادی به عنوان یکی از زیر بناهای اساسی زیست شناسی بافت‌ها معرفی می‌شوند. این سلول‌ها امکان نوسازی و جایگزینی سلول‌های خونی، سلول‌های استخوانی، سلول‌های جنسی، سلول‌های بافت پوششی، سلول‌های بافت عصبی، سلول‌های بافت عضلانی و بافت‌های متنوع دیگر را با سلول‌های تازه در تمام طول حیات فراهم می‌کنند. سلول‌های بنیادی در حالت خاموش[2] قرار دارند ولی در مراحل ویژه‌ای از چرخه‌ی حیات یا در طی آسیب می‌توانند فعال شوند. این سلول‌ها توسط ریزمحیط[3] کنترل شده‌ای در بافت که نیچ[4] نام دارد کنترل می‌شوند. تا سال ۲۰۰۸ نیچ یک مفهوم تئوریک بود که توسط مدارکی که نشان می-داد سلول‌های بنیادی پیوند زده شده فقط در جایگاه ویژه‌ای از بافت قادرکه به رشد و بقا هستند حمایت می-شد. با این وجود در سال‌های اخیر امکان اینکه سلول‌های بنیادی و نیچ‌های آنها با دقت بیشتری تعریف شوند به وجود آمده است(Morrison and Spradling., 2008).

سلول‌های بنیادی به وسیله‌ی دو ویژگی مهم از دیگر سلول‌ها قابل تشخیص هستند. اول این‌که آن‌ها سلول‌های تخصص نیافته‌ای هستند که قادر به خودنوزایی از طریق تقسیم سلولی، گاهی اوقات بعد از دوره-های طولانی عدم فعالیت، می‌باشند. دوم این که تحت شرایط آزمایشگاهی یا فیزیولوژیکی خاص، آن‌ها می‌توانند برای رفتن به سمت سلول‌های خاص اندام یا بافتی با عملکرد ویژه القا شوند. سلول‌های بنیادی با دارا بودن این دو ویژگی می‌توانند نقشی اساسی در درمان بیماری‌ها و آسیب‌ها ایفا کنند. شاید جالب توجه‌ترین توانایی سلول‌های بنیادی قابلیت استفاده از آنها در پزشکی ترمیمی[5] باشد. اشکالات فراوان پیوندهای بافتی به همراه محدودیت‌های استفاده از پروتزها، تحقیقات در زمینه‌ی درمان‌برپایه‌ی‌استفاده‌از-سلول‌وبافت(سلول درمانی‌وبافت درمانی)را دشوارکرده‌است (Hwang *et al.*, 2008).

[1].Stem Cells
[2]. Quissence
[3]. Microenvironment
[4]. Niche
[5]. Regenerative medicine

۱-۱-۱-ویژگی‌های سلول‌های بنیادی

بدن انسان از انواع مختلف سلول‌ها تشکیل شده است که از سلول‌های معمولی پوست تا سلول‌های عصبی در مغز را شامل می‌شوند. اعمال این سلول‌های اختصاصی به طور طبیعی تغییر نمی‌کند. آن‌ها در تمام طول حیات خود، مجموعه‌ی از پیش تعیین شده‌ای از اعمال و فعالیت‌ها را انجام می‌دهند که مختص به همان سلول‌ها است. از طرف دیگر، سلول‌های بنیادی از انواع سلول‌های اصلی بدن هستند. این سلول‌ها دارای عمر طولانی و توانایی تمایز یا تغییر به سمت انواع دیگر سلول‌ها هستند. همچنین قابلیت تکثیر دارند به طوری که ذخایری از سلول‌های بنیادی را برای تولید نسل‌های بیشتر امکان‌پذیر می‌سازند. به دلیل این ویژگی‌ها، سلول-های‌بنیادی‌می‌توانندبافت‌هارابازسازی‌نمایندوبدین‌ترتیب‌درپزشکی‌کاربرددارند(Yu and Estrada., 2010).

سلول‌های بنیادی دارای سه ویژگی زیرهستند:

۱- خودنوزایی[1]: توانایی تکرار سیکل‌های متعدد تقسیم سلولی با حفظ وضعیت سلول تمایزنیافته.به این معنی که سلول‌های بنیادی قادر به تقسیمات سلولی خودتجدید هستند که در نهایت یکی از سلول‌های دختر، مشخصات بنیادی را حفظ می‌کند.

۲- پوتنسی[2]: ظرفیت تمایز به سمت انواع اختصاص یافته‌ی سلول است. سلول‌های بنیادی ویژگی‌های سلول‌های غیر اختصاصی را از خود به نمایش می‌گذارند، به این معنی که سلول‌های بنیادی نمی‌توانند اعمال خاصی فراتر از یک سلول بنیادی انجام دهند. آن‌ها می‌توانند از طریق تمایز، به سمت انواع خاص سلول مانند سلول‌های خونی، سلول‌های اندام‌های مختلف و سلول‌های عصبی تغییر شکل دهند. فرایند تمایز با سیگنال‌های داخلی، که به وسیله ژن‌ها هدایت می‌شود و نیز سیگنال‌های شیمیایی کنترل می‌شود.

۳- سلول‌های بنیادی قادر به تولید بافت در شرایط *in vivo* هستند (Verfaillie., 2009., Sell.,2004).

۱-۱-۲- مارکرهای سلول‌های بنیادی

پیشتر تصور می‌شد بیان ژن‌های خاص به عنوان مارکر، سلول‌های بنیادی را از سایر سلول‌ها تفکیک می‌کند. این مارکرها محققین را از مشکلات شناسایی سلول‌های بنیادی توسط شناسایی رده‌ی سلول و یا بررسی مکانیسم‌های تنظیمی سلول‌ها رها ساخته است. دو نوع از مارکرهای مفید برای شناسایی سلول‌های بنیادی معرفی شده‌اند. نوع اول شامل ساختارهایی محدود هستند که گاهی در سلول‌های بنیادی یافت می-

[1].Self–renewal
[2]. Potency

شوند و مربوط به مراحل ابتدایی تمایز سلول‌های بنیادی است، مثلا در مگس سرکه وزیکول‌های شبیه شبکه اندوپلاسمیک(که اسپکتروزوم نام دارند) در سلول‌های بنیادی رده‌ی زاینده[1] تجمع می‌یابند. نوع دوم اجزای مسیر سیگنالی درگیر در حفظ سلول‌های بنیادی و برنامه نویسی سلول‌های دختری را تشکیل می‌دهند. برای مثال در سلول‌های رده زایای نر مگس سرکه پروتئین Dad (Kai & Spradling, 2003) و در سلول-های رده‌ی زایای ماده پروتئین Socs36E مارکرهایی هستند که شناسایی سلول‌های بنیادی را در صورت همراه شدن با اطلاعات آناتومیکی ممکن می‌سازند(Morrison and Spradling, 2008).

۱-۲-انواع سلول های بنیادی

سلول‌های بنیادی بر اساس منشأ بدست آمدن و نیز بر اساس توانایی تولید سلول‌های تمایز یافته در شرایط خاص به انواع مختلفی تقسیم‌بندی می‌شوند. یک سلول بنیادی می‌تواند حداقل یک(و اغلب اوقات انواع بیشتری) سلول کاملاً تمایز یافته ایجاد کند. چند مفهوم برای تعریف پوتنسی[2](توان) وجود دارد:

همه توان[3]: سلول‌های دارای توانایی تولید همه‌ی انواع سلول‌های یک ارگانیسم حتی پرده‌های خارج جنینی. در پستانداران تنها تخم لقاح یافته(زیگوت[4]) و بلاستومرهای اولین تسهیم جنین این توانایی را دارند.

پرتوان[5]: این سلول‌ها می‌توانند همه‌ی انواع سلول‌های بدن موجود زنده(غیر از پرده‌های خارج جنینی)را تولید کنند. به طور مثال سلول‌های بنیادی جنینی در این مرحله قرار دارند.

چند توان[6]: سلول‌های بنیادی چند توان قادر به تولید انواع سلول‌های متعلق به یک دودمان خاص هستند. مثلاً سلول‌های بنیادی خون‌ساز که همه‌ی انواع سلول‌های خونی بدن را تولید می‌کنند اما قادر به تولید سلول-های دیگر نیستند.

یک توان[7] یا پیش ساز: سلول‌هایی که یک نوع سلول خاص را تولید می‌کنند مثل سلول‌های اسپرماتوگونیال که تنها می‌توانند اسپرم تولید کنند(SchÖler., 2007).

سلول‌های بنیادی با توانایی‌های مختلف را می‌توان از منشأهای متفاوتی بدست آورد. سلول‌هایی که از جایگاه ها یا نیچ‌های مختلف بدست می‌آیند دارای مزایا و معایبی هستند که به طور مختصر بررسی می‌شود

---

1. Germ line
2. Potency
3. Totipotent
4. Zygot
5. Pluripotency
6. Multipotency
7. Unipotent

۱-۲-۱-سلول‌های بنیادی جنینی

سلول‌های بنیادی جنینی سلول‌های همه توانی هستند که می‌توان آن‌ها را از توده‌ی سلولی درون جنینی بلاستوسیست در طی گاسترولاسیون جداسازی کرد(Donovan & Gearhart, 2001). این سلول‌ها اولین بار در سال ۱۹۹۸ جداسازی شدند(Thomson *et al.*, 1998).

سلول‌های جداشده از توده‌ی سلولی درون جنینی جنین در حال تکوین می‌توانند در مرحله‌ی تمایز نیافته باقی بمانند و جسم شبه جنین[1] که ساختاری با همه‌ی انواع سلول‌های جنینی است ایجاد کنند. سلول‌های بنیادی جنینی منبع سلولی واجد توانایی خودنوزایی نامحدود و توانایی تمایز را فراهم می‌کنند. با توجه به توانایی سلول‌های بنیادی درتبدیل شدن به انواع سلول‌های سوماتیک و سلول‌های لایه‌ی زایای یک موجود زنده‌ی کاملاً تکوین یافته، این سلول‌ها پیش‌سازهای تعهد نیافته‌ای از سه لایه‌ی زاینده‌ی جنینی یعنی: اکتودرم، اندودرم و مزودرم هستند(Sylvester & Longaker, 2004). سلول‌های بنیادی جنینی سلول‌های وابسته به منشأ هستند و با تواناییشان در گسترده شدن بصورت نامحدود، خودنوزایی و تبدیل شدن به سلول-های تمایز یافته تعریف می‌شوند. یکی از مشخصات سلول‌های بنیادی توانایی آنها در تقسیم شدن در جهت تکوین سلول‌های تمایز یافته‌ی عملکردی و میرا است. برای ساختن سلول‌های جدید سنتز DNA باید اتفاق بیافتد. چرخه سلولی تحت کنترل دقیق هوموستاتیک قرار دارد تا تقسیم سلولی را با مرگ سلولی هماهنگ کند. سایکلین‌ها و کینازهای وابسته به سایکلین(Cdk) پروتئین‌های اصلی چرخه‌ی سلولی هستند کـه از طریق فسفریله کردن ژن‌های هدف اعمال اثر می‌کنند. هیستون‌ها می‌توانند توسط مکانیسم‌های مختلفی مانند استیلاسیون[2] و متیلاسیون[3] در جهت ساخت یوکروماتین مناسب برای رونویسی که فاکتورهای رونویسی می-توانند به آنها دسترسی داشته باشند و به نواحی پروموتر متصل شوند و یا هتروکروماتین بسته و فشرده که به لحاظ رونویسی غیر فعال است تغییرکنند. مطالعات ابتدایی پیشنهاد می‌کند که پرتوانی در سلول‌های بنیادی جنینی بر اساس اصلاح منحصر به فرد هیستون است که بر بیان ژن در سلول‌های بنیادی جنینی موثر است. روشن شدن مکانیسم این تغییرات ممکن است به فهم فرایندهای تکوین، متعهد شدن[4]، محدودیت تـوان(پتانسیل) و پیری[5] کمک کند. بـا توجه به تمام توانایی‌هـای سلول‌های بنیادی جنینی برای کاربردهای تحقیقاتی و درمانی استفاده از این سلول‌ها(به خصوص در انسان)با مشکلات اخلاقی روبروست که استفاده از این سلول‌ها را محدود می‌کند(Azuara *et al.*, 2006).

---

1. Embryoid body
2. Acetylation
3. Methylation
4. Commitment
5. Aging

۱-۲-۲-سلول‌های بنیادی زایا[1]

در ۱۹۹۸ گروه محققینی تحت رهبری Gerhart سلول‌های بنیادی پرتوان را از سلول‌های زایای اولیه‌ی جنین‌های ۹-۵ هفته‌ای پس از لقاح انسان در محیط کشت جداسازی کردند(Shamblott *et al.*, 1998). از آن زمان سلول‌های زایای جنینی به همراه سلول‌های بنیادی جنینی دو گروه سلول بنیادی پرتوان اصلی انسان هستند. در برابر سلول‌های بنیادی چند توان، سلول های بنیادی پرتوان دو توانایی قابل توجه دارند: این سلول‌ها می‌توانند به طور نامحدود در شرایط آزمایشگاهی تکثیر شده و گسترش یابند و در شرایط تمایز نیافته و پرتوان یعنی شرایطی که توانایی تبدیل شدن به هرسه لایه‌ی زاینده یعنی اکتودرم، مزودرم و آندودرم را دارند، حفظ شوند و به همین دلیل از این سلول‌ها برای توسعه‌ی استراتژی‌های جدید بازسازی بافت و پیوند در بیماری‌های تحلیل برنده به خصوص آسیب‌های نورونی یا تحلیل‌های عملکردی استفاده می‌شوند. سلول‌های زایای جنینی انسان[2] از سلول‌های پیش ساز زایا در ناحیه‌ی ستیغ تناسلی[3] جنین‌های مراحل ابتدایی که بدست آوردن آنها از دست‌یابی به بلاستوسیست ساده‌تر است حاصل می‌شوند. خوشبختانه Gerhart و گروهش پس از جداسازی سلول‌های بنیادی زایای جنینی متوجه شدند که این سلول‌ها به طور خودبخودی با تشکیل ساختارهای سه بعدی از اجتماع سلول‌ها یعنی جسم شبه جنین تمایل به تمایز دارند. سلول‌های بنیادی زایای انسانی در شرایطی مشابه با سلول‌های بنیادی موشی یعنی در حضور LIF[4]، فاکتور رشد فیبروبلاستی[5] و بر لایه‌ی زاینده‌ی فراهم‌کننده‌ی‌فاکتورسلول‌های-بنیادی[6]متصل‌به‌غشا جداسازی‌می‌شوندکه‌این مسئله پیشنهاد دهنده‌ی مکانیسم‌های حفظ شده در طی تکامل-است (Turnpenny *et al.*, 2005). استفاده‌ازاین‌سلول‌هانیزبه‌دلیل‌مسائل‌اخلاقی‌بامحدودویت‌هایی‌روبروست.

۱-۲-۳-سلول‌های بنیادی مایع آمنیوتیک و جفت[7]

شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد جفت انسان دارای سلول‌های پرتوان و یا چندتوان است. انواع ویژه‌ای از سلول‌های بنیادی مانند تروفوبلاستیک، خون‌ساز و سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مقالات مختلفی مورد بحث قرار گرفته‌اند. برخلاف دیگر قسمت‌های جفت، اپی تلیوم آمنیوتیکی از اپی بلاست پرتوان در روز هشتم پیش از گاسترولاسیون که نقطه‌ی هدایت کننده‌ی هر سلول برای تخصصی شدن در جهت هدفی

---

1. Germ stem cells
2. Human Embryonic Germ cell; hEGC
3. Gonadal Ridge
4. Leukemia Inhibitory Factor; LIF
5. Fibroblast Growth Factor (FGF)
6. Stem Cell Factor (SCF)
7. Placenta and Amniotic floid Stem Cell

خاص است، مشتق می‌شوند. اجزای دیگر جفت مانند کوریون از تروفواکتودرم خارج جنینی تمایز می‌یابند. از آنجا کـه آمنیون از اپـی بلاست در زمانـی که اپی بلاست پرتوانی خود را حفظ می‌کند تمایز مـی‌یابد، منطقی است کـه انتظار داشته باشیم کـه سلول‌های اپی تلیال آمنیوتیک ممکن است از تخصصی شدن که با گاسترولاسیون همراه است رهایی یافته و برخی خصوصیات اپی بلاست مانند پرتوانی را حفظ کنند.

غشای تقریباً شفاف و نازک آمنیون که شامل سلول‌های اپی بلاست[1] و سلول‌های فیبروبلاست مزانشیمی آمنیوتیک است پس از چند بار شستشو برای از بین بردن خون موجود بدست می‌آید. برای جداسازی سلول-های اپی بلاست آمنیوتیکی غشای آمنیونی تریپسینه شده و سلول‌های اپی بلاست آمنیوتیکی از بافت پیوندی محافظ و نیز سلول‌های فیبروبلاست جدا می‌شوند. در حضور فاکتور رشد اپیدرمی[2] و یا عامل تغییر شکل دهنده‌ی آلفا[3] سلول‌های اپی‌بلاست به سرعت تکثیر شده و یک لایه سنگفرشی شکل از سلول‌های پوششی تشکیل می‌دهند (Miki & Storm, 2006).

سایتوکاین‌ها و ویمنتین به عنوان مارکرهایی برای شناسایی سلول‌های با دودمان‌های مختلف استفاده می-شوند. ویمنتین به طور طبیعی توسط سلول‌های مزانشیمی مانند فیبروبلاست‌ها یا مایوسیت‌ها و نیز سلول‌های اندوتلیالی عروق بیان می‌شود. گزارش‌های اخیر پیشنهاد می‌کند کـه ویمنتین می‌تواند یک مارکـر برای سلول‌های بنیادی یا پیش ساز، به خصوص سلول‌های بنیادی عصبی باشد (Klassen *et al.*, 2004)..

روش نهایی برای تعیین پرتوانی سلول‌های بنیادی جدا شده از اپی تلیوم آمنیوتیکی تولید حیوانات کایمرا از طریق تزریق یک سلول بنیادی درون یک بلاستوسیست است. اگر سلول بنیادی در همه‌ی لایه‌های زاینده مشارکت کند پرتوانی آن تأئید می‌شود (Miki & Storm, 2006). تاماگاوا و همکاران رده‌های سلولی که از تمام آمنیون جداسازی شده بودند شامل سلول‌های اپی‌بلاست آمنیوتیکی[4] و فیبروبلاست‌های مزانشیمی آمنیوتیک[5] را شناسایی و معرفی کرده‌اند. پیش از این گزارش شده که برخی‌سلول‌های‌اپی‌بلاست آمنیوتیک‌آنتی‌ژن‌های‌سطحی‌ویژه‌ی سلول‌های‌بنیادی‌جنینی‌مانند SSEA-3, SSEA-4,TRA1-60,TRA1-81 را بیان می‌کنند. به علاوه سلول‌های اپی بلاست آمنیوتیکی مارکرهای مولکولی پرتوانی مانند Oct-4 وNanog را بیان می‌کنند و تمایز آنها به همه‌ی لایه‌های زاینده اثبات شده است. این اطلاعات پیشنهاد مـی-کند کـه مانند سلول‌هـای بنیادی جنینی، سلول‌های اپی‌بلاست آمنیوتیکی می‌توانند برای پیوند سلولی و

[1]. Epiblast
[2]. Epidermal Growth Factor (EGF)
[3]. Transforming Growth Factor-α (TGF-α)
[4]. Amniotic Epiblast (AE)
[5]. Amniotic Mesenchymal Fibroblast (AMF)