بسمه تعالی

دانشکده دامپزشکی

سال تحصیلی: ۹۱– ۱۳۹۰ **شماره پایان نامه: ۴۲۹ –۲ک**

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد ایمنی‌شناسی

عنوان:

تأثیر لیپوپلی‌ساکارید و پلی–ریبو سیتیدیلیک اسید به عنوان (آگونیست‌های TLR)، برمیزان تولید نیتریک اکساید و القاء آپوپتوزیس در سلول‌های T فعال شده توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمال موش

هیئت محترم داوران:

جناب آقای دکتر احمد مرشدی، دانشیار دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

استاد راهنما اول و رئیس هیئت داوران

جناب آقای دکتر امیر توکمه‌چی، استادیار میکروبیولوژی، پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی، دانشگاه ارومیه

استاد راهنمای دوم

جناب آقای دکتر نوروز دلیرژ، استادیار دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

استاد مشاور

جناب آقای دکتر شهرام شهابی، دانشیار دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

داور خارجی

جناب آقای دکتر عبدالغفار اونق، استادیار دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

داور داخلی

تنظیم و نگارش: رامین محمدی موالو

شهریور ۱۳۹۱

حق چاپ برای دانشگاه ارومیه محفوظ است

تقدیم به

پدرم، اسطوره استقامت و سربلندی چون کوه

مادرم، اسطوره عشق و ایثار

برادر و خواهرم، اسطوره بخشندگی و عظمت

هستی‌ام از آن شماست.

و امان و تنهایی و بارون.....

سپاسگزاری

پس از حمد و سپاس پروردگار متعال، تقدیر و سپاسگزاری خالصانه و خاضعانه خویش را از:

استاد محترم راهنمای اول، جناب آقای **دکتر احمد مرشدی** و استاد محترم راهنمای دوم جناب آقای **دکتر امیر توکمه چی** که بار، نمودهای دلسوزانه خودشان، راهنمایی این پایان نامه را تقبل نموده و در کلیه مراحل این پایان نامه مرا یاری نمودند.

استاد محترم مشاور، جناب آقای دکتر **نوروز دلیرژ**، استاد بزرگ من که در تمامی عرصه علم و اخلاق از هیچ کمکی دریغ نورزیدند.

استاد محترم، جناب آقای **دکتر شهرام شهابی** و استاد محترم، جناب آقای **دکتر عبدالغفار اونق** که قبول زحمت فرموده و داوری پایان نامه را بر عهده گرفتند.

دوستان عزیزم جنابان: **دکتر آرام مکاری زاده**، **دکتر یاسر جعفری**، **دکتر رضا حبیبیان**، **مهندس اصغر علیاری**، **مهندس یوسف حیدر ثانی** و کارشناس ارشد **سرکار خانم الهام دارابی** که نهایت همکاری و صداقت را در تمامی مراحل این پژوهش بابنده داشته اند.

در اینجا بر خود لازم دانسته تا از تمامی اساتید و کارشناسان آزمایشگاه های دانشکده دامپزشکی (جنابان: **آقاپور**، **حیدر ثانی**، **کاظم نیا**، **علیاری**، **کریمی**، **مرواریدی و بدلی**) که در طول چهار سال دوره کارشناسی و کارشناسی ارشد از محضرشان درس های علم و اخلاق آموختم تشکر و قدردانی کردد.

رامین محمدی موالو

۱۳۹۱/۷/۱۰

چکیده فارسی: پایان نامه به شماره ۴۲۹–۲ک کارشناسی ارشد ایمنی‌شناسی دانشگاه ارومیه

سال تحصیلی ۱۳۹۰–۱۳۹۱

نگارنده: رامین محمدی موالو

عنوان: تأثیر LPS و Poly: IC به عنوان (آگونیست‌های TLRs)، بر میزان تولید نیتریک اکساید و القاء آپوپتوزیس در سلول‌های T فعال شده توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمال موش.

سلول‌های بنیادی مزانشیمال به عنوان سلول‌های پیشساز غیر خونساز و چند توانی معرفی می‌شوند که در طیف وسیعی از بافت‌های بالغ بدن یافت می‌گردند. گیرنده‌های شبه Toll، یکی از گیرنده‌های ایمنی بیان شده در سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمال می‌باشند که می‌توانند طیف وسیعی از عملکردهای سلول را تحت الشعاع قرار دهند.

در مطالعه حاضر بعد از ایجاد بیهوشی در ۱۸ سر موش سوری از استخوان‌های ران و درشت‌نی به روش فلاشینگ سوسپانسیون سلولی تهیه گردید و سلول‌های مزانشیمال به روش چسبندگی پلاستیک جداسازی گردیدند. در مرحله بارآمدگی ۷۰ – ۶۰ ٪، پاساژ سوم کشت سلولی، سلول‌ها با آگونیست‌های Poly: IC و LPS در دو زمان مجزای ۱ ساعت و ۱۲ ساعت مجاور شدند. پس از گذشت ۱ و ۱۲ ساعت مایع روئی برداشت گردید و سطح نیتریک اکساید به شیوه Griess سنجیده شد. متعاقباً درصد آپوپتوزیس سلول‌های T در سیستم هم‌کشت سلول‌های طحال–مزانشیمال به روش فلوسایتومتریک Achridin/PI اندازه‌گیری گردید.

نتایج نشان داد که تیمار سلول‌های مزانشیمال با Poly: IC در غلظت‌های ۱ و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و LPS در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر در دو زمان مجزای ۱ و ۱۲ ساعت موجب افزایش معنی‌دار در درصد سلول‌های T آپوپتوزیس شده در مقایسه با گروه بدون تیمار کنترل می‌گردد.

نتیجه گیری: یافته‌ها نشان داد که Poly: IC بیشترین میزان آپوپتوزیس را در غلظت پایین (۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و پس از گذشت ۱۲ ساعت اعمال می‌نماید. در حالی که بیشترین میزان آپوپتوز سلول‌های T در تیمار با LPS در غلظت بالا (۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) و ۱ ساعت انکوباسیون به دست می‌آید ($P<0.05$). همچنین افزایش میزان آپوپتوزیس سلول‌های T در ارتباط با تولید نیتریک اکساید می باشد.

نتایج حاصل از مطالعه حاضر را می‌توان جهت موفقیت بیشتر در برنامه‌های استم سل درمانی مربوط به بیماری‌های خودایمن به کار گرفت.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمال، آگونیست، TLR، آپوپتوز، لیپوپلی‌ساکارید، Poly: IC.

فهرست مندرجات

فصل اول ۱

مقدمه ۲

فصل دوم ٤

کلیات ٤

۱-۲- تعریف سلول بنیادی و ویژگی‌های آن ٥

۲-۲- زیست‌شناسی سلول‌های مزانشیمی ٦

۱-۲-۲- سلول‌های بنیادی مزانشیمی ٦

۲-۱-۲- کنام سلول‌های مزانشیمی ۹

۲-۲- نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۱۰

۳-۲- سلول‌های بنیادی مزانشیمی ویژه بافت ۱۱

۴-۲- منشاء مشترک سلول های بنیادی مزانشیمی و خونساز ۱۱

۵-۲- سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط کشت ۱۲

۶-۲- انعطاف‌پذیری سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Plasticity of MSCs) ۱۲

۷-۲- خود نوزایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۱۳

۸-۲-تمایزسلول‌های بنیادی مزانشیمی ۱٤

۹-۲- عوامل مؤثر بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی در شرایط آزمایشگاهی ۱٥

۱۰-۲- سلول و ژن درمانی با استفاده از سلول بنیادی مزانشیمی ۱٥

۱۱-۲- ایمنی‌زایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۱٦

۱-۱۱-۲- بیان آلوآنتی ژن‌ها بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۱۸

۲-۱۱-۲- سلول‌های بنیادی مزانشیمی و سلول‌های T ۲۲

۱-۲-۱۱-۲- سلول‌های T تنظیمی (Tregulatory; Treg) ۲٤

۳-۱۱-۲- سلول‌های بنیادی مزانشیمی و سلولهای B ۲٦

۴-۱۱-۲- سلول‌های بنیادی مزانشیمی و سلول‌های کشنده طبیعی ۲۷

۵-۱۱-۲- سلول‌های بنیادی مزانشیمی و سلول‌های دندریتیک ۲۹

۱۲-۲- فرار سلول‌های بنیادی مزانشیمی از آلوراکتیویتی مشابه با فرار تومورها ۳۱
۱۳-۲- گیرنده‌های شبه تول (Toll-Like receptors) ۳۳
۱۴-۲- آپوپتوز ۳۵
۱-۱۴-۲- آپوپتوز ۳۵
۲-۱۴-۲- آپوپتوز و نکروز ۳۵
۳-۱۴-۲- مسیرهای آپوپتوزی ۳۶
۱-۳-۱۴-۲- مسیر خارجی یا آپوپتوز القاء شده توسط گیرنده‌های مرگ ۳۶
۲-۳-۱۴-۲- مسیر داخلی یا مسیر میتوکندریایی آپوپتوز ۳۷
۳-۳-۱۴-۲- کاسپازها ۳۹
فصل سوم ۴۱
مواد و روش کار ۴۱
۱-۳- کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش (muBMSCs) ۴۳
۱-۱-۳- مواد و وسایل مورد استفاده ۴۳
۲-۱-۳- روش کار ۴۳
۲ -۳- تعیین تعداد و میزان زنده بودن سلول‌ها به روش رنگ‌آمیزی با تریپان بلو ۴۵
۱-۲-۳- مواد و وسایل مورد استفاده ۴۵
۲-۲-۳- روش کار ۴۵
۳-۳- تعویض محیط کشت ۴۶
۱-۳-۳- مواد و و سایل مورد استفاده ۴۶
۲-۳-۳- روش کار ۴۶
۴-۳- مجاورسازی آگونیست‌ها ۴۷
۱-۴-۳- مواد و وسایل مورد استفاده ۴۷
۲-۴-۳- روش کار ۴۸
۵-۳- اندازه گیری نیتریک اکساید در مایع روئی کشت سلول به روش Griess ۴۹
۱- ۵-۳- مواد و وسایل مورد استفاده ۴۹

۲– ۵–۳– اساس آزمایش و روش کار ٤٩
۷–۳– جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای (MNCs) **طحال موش** ٥٠
۱–۷–۳– مواد و وسایل مورد استفاده ٥٠
۲–۷–۳– روش کار ٥١
۸–۳– سنجش آپوپتوز در سلول‌های T ٥٣
۱–۸ –۳– مواد و وسایل مورد استفاده ٥٣
۲–۸–۳– روش کار ٥٤
۸–۳– تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها ٥٦
فصل چهارم ٥٧
نتایج ٥٧
۱–۴– تیمار سلول‌های muBMSCs **با** Poly: IC **در غلظت‌های مختلف و در زمان‌های مختلف انکوباسیون** ٥٨
۲–۴– تیمار سلول‌های muBMSCs **با** LPS **در غلظت‌های مختلف و در زمان‌های مختلف انکوباسیون** ٦٠
۳–۴– تیمار سلول‌های muBMSCs **با غلظت ترکیبی کمینه** (LPS + Poly: IC (LP **در زمان‌های مختلف انکوباسیون** ٦٢
فصل پنجم ٦٤
بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادات ٦٤
۱–۵– بحث ٦٥
۲– ۵– نتیجه‌گیری ٦٧
۳– ۵– پیشنهادات ٦٧
فصل ششم ٦٨
منابع ٦٨
چکیده انگلیسی ٧٩

فهرست جداول

جدول ۱- ۲. ویژگی‌های سلولی در انواع سلول‌های بنیادی ٦
جدول ۲- ۲. مثال‌هایی از نام‌های مختلف که در مطالعات مختلف به این سلول‌ها داده شده است ۷
جدول ۳- ۲. خصوصیات فنوتیپی و عملکردی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۱۷
جدول ۴- ۲. مقایسه سلول‌های CD_4^+ T تنظیمی ۲٤
جدول ۵- ۲. مقایسه برخی از خصوصیات سلول‌های بنیادی مزانشیمی و توموری در ارتباط با فرار از سیستم ایمنی ۳۳

فهرست نمودار

نمودار ۱- ۴. مقایسه توانایی سلول‌های muBMSCs تیمار شده با Poly: IC در غلظت‌های مختلف و در زمان‌های مختلف انکوباسیون بر القاء Apoptosis در سلول‌های T فعال شده ۵۹
نمودار ۲- ۴. مقایسه اثر غلظت‌های مختلف Poly: IC در زمان‌های مختلف انکوباسیون بر توانایی سلول‌های muBMSCs در تولید NO. ۵۹
نمودار ۳- ۴. مقایسه توانایی سلول‌های muBMSCs تیمار شده با LPS در غلظت‌های مختلف و در زمان‌های مختلف انکوباسیون بر القاء Apoptosis در سلول‌های T فعال شده. ٦۱
نمودار ۴- ۴. مقایسه اثر غلظت‌های مختلف LPS در زمان‌های مختلف انکوباسیون بر توانایی سلول‌های muBMSCs در تولید NO٦۱
نمودار ۵- ۴. مقایسه توانایی سلول‌های muBMSCs تیمار شده با غلظت ترکیبی کمینه LPS+Poly: IC (LP) و در زمان‌های مختلف انکوباسیون بر القاء Apoptosis در سلول‌های T فعال شده. ٦۳
نمودار ۶- ۴. مقایسه اثر غلظت ترکیبی کمینه LPS + Poly: IC (LP) و در زمان‌های مختلف انکوباسیون بر توانایی سلول‌های muBMSCs در تولید NO. ٦۳

فهرست تصاویر

تصویر ۱- ۲. مورفولوژی فیبروبلاستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش ۹
تصویر ۲- ۲. اثر مهاری سلول‌های بنیادی مزانشیمی وابسته به IFN-γ. ۲۲
تصویر ۳- ۲. انواع سلول‌های T تنظیمی ۲٦
تصویر ۴- ۲. تعدیل پاسخ ایمنی با تأثیر سلول‌های مزانشیمی بر سلول‌های ایمنی ۳۰
تصویر ۵- ۲. سلول‌های توموری و سلول‌های بنیادی مزانشیمی، ریز محیط سرکوبگر ایجاد می‌کنند. جزئیات مکانیسم‌ها ۳۲
تصویر ۶- ۲. واکنش‌های آبشاری فعال شدن کاسپازها توسط گیرنده‌های مرگ مسیر خارجی ۳۷

تصویر ۱- ۳. سلول های بنیادی مزانشیمی در روز ۱۰~۷ پس ازکشت، پاساژ سوم ٤۷
تصویر ۲- ۳. اندازه گیری نیتریک اکساید در مایع روئی کشت سلول ۵۰

فصل اول

مقدمه

Introduction

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌های پیشساز چندتوان غیرخونساز ساکن در مغز استخوان و سایر بافت‌های اسکلتی توصیف می‌شوند. ویژگی شاخص این سلول‌ها سهولت در جداسازی و رشد سریع آنها در شرایط Invitro می‌باشد. در حالی که همواره پتانسیل تمایزی خود را حفظ می‌کنند که این خود امکان تکثیر Invitro این سلول‌ها را در مقادیر زیاد و مناسب جهت اهداف درمانی فراهم می‌سازد.

یکی از موارد کاربرد استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مربوط به درمان بیماری‌های خودایمن نظیر مالتیپل اسکلروزیس[1]، روماتوئید آرتریت[2]، دیابت نوع I [3]و غیره می‌باشد. بخشی از مزیت کاربردی این سلول-ها در مدل بیماری‌های خودایمن مربوط به پتانسیل تعدیل ایمنی این سلول‌ها می‌باشد که درکنار پتانسیل-های تمایزی و ترمیمی، این سلول‌ها را تیمار بسیار مناسبی برای درمان بیماری‌هایی از این دست قرار می-دهد که در آن پاسخ‌های ایمنی و التهابی تشدید یابنده مسبب اصلی جراحات و آسیب‌ها می‌باشند (Porada and Almedia-Porada, 2010).

به نظر می‌رسد که تقویت پتانسیل‌های تعدیل یا سرکوب ایمنی این سلول‌ها با مداخله در حسگرهای زودرس بیان شده در سطح این سلول‌ها در شرایط Invitro می‌تواند کاربرد درمانی تقویت شده‌ای در درمان بیماری‌های خودایمن یا واکنش‌های ازدیاد حساسیتی داشته باشد (DelaRosa and Lombardo, 2010; Waterman *et al.*,2010; Bunnel *et al.*, 2010).

Pevsner-Fischer و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که TLRها[4] در سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمال موشی (muMSCs)[5] بیان شده و این TLRها به همراه لیگاندهای مربوطه، عملکرد سلول‌های بنیادی مزانشیمال را کنترل می‌کنند. مطالعات دیگر نشان می‌دهند که ویژگی‌های مهاجرت، تهاجم و ترشح فاکتورهای تعدیل کننده ایمنی این سلول‌ها به طور مؤثری تحت تأثیر درگیری آگونیست‌های اختصاصی TLRها می باشد (Waterman *et al.*, 2010).

TLRها یکی از سنسورهای ایمنی زودرس بیان شده در سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد که قادر به تعدیل یا تغییر فعالیت این سلول‌ها می‌شود و اخیراً مشخص شده است که فعال‌سازی TLRهای ویژه در سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌تواند این سلول‌ها را به سمت فنوتیپ پیش‌التهابی MSC1[6] یا ضدالتهابی MSC2 پولاریزه کند.

تصور می‌شود که فنوتیپ پیش‌التهابی MSC1 یک نوع پاسخ زودرس سلول به آسیب بافتی بوده و در مقابل فنوتیپ سرکوبگر یا تعدیل کننده ایمنی MSC2 در هضم یا تجزیه دیررس آسیب‌های بافتی، نقشی مشابه مونوسیت‌های جهت‌دهی شده به سمت التیام جراحت دارند (Waterman *et al.*,2010; Bunnel *et al.*, 2010).

1 . Multiple sclerosis
2. Rheumatoid arthritis
3. Type 1 diabetes
4. Toll-Like Receptors
5. murine Mesenchymal stem cells
6. Mesenchymal stem cell

به لحاظ ساختمانی و عملکردی TLRها، گلیکوپروتئین‌های غشاء گذر تیپ I می‌باشند که یک دومین خارج سلولی غنی از تکرارهای لوسین و یک منطقه داخل سلولی حاوی تکرارهای وارونه انتهایی TIR[1] دارند و از طریق تعامل با آداپتور مولکول‌های مختلف حاوی دمین TIR در داخل سلول منجر به فعال شدن آبشاری از القاء فاکتورهای نسخه برداری مختلف می‌گردند(Miggin *et al.*, 2006).

تاکنون در مورد انسان ۱۱ نوع و در مورد موش ۱۳ نوع TLR شناسایی شده است. سلول‌های مزانشیمال موشی (muMSCs) mRNA[2] مربوط به TLR1 تا TLR8 را بیان کرده اما TLR9 را بیان نمی‌کنند (Liotta *et al.*, 2007).

مطالعات اخیر پیشنهاد می‌کنند که TLRهای بیان شده در سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمال قادرند فعالیت تعدیل یا سرکوب ایمنی این سلول‌ها را در غیاب INF-γ[3] از طریق سیگنالینگ IFN-β[4] اتوکراین که وابسته به تیروزین کیناز R می‌باشد افزایش دهند (Ghannam *et al.*, 2010).

یکی از توانمندی‌های سرکوب ایمنی سلول‌های بنیادی مزانشیمال مربوط به قابلیت القاء آپوپتوزیس در سلول‌های T فعال شده می‌باشد که کارایی آن در تیمار بیماری‌های خودایمن با واسطه سلول‌های T می‌تواند بسیار حائز اهمیت باشد. به نظر می‌رسد که این اعمال اثر در سلول‌های بنیادی مزانشیمال انسانی از طریق تولید آنزیم IDO[5] انجام می‌پذیرد که باعث تبدیل تریپتوفان (مورد نیاز جهت رشد و تکثیر سلول‌های T) به کینیورین (یک متابولیت سمی) می‌شود. در مورد سلول‌های بنیادی مزانشیمال موشی این کار بیشتر از طریق تولید NO[6] انجام می‌پذیرد. برخی مطالعات دیگر حاکی از آن است که بخشی از این توانایی می‌تواند مربوط به بیان Fas-L[7] تحت شرایط خاص در سطح این سلول‌ها باشد (Mazar *et al.*, 2009).

در مطالعه پیش رو با استفاده از آگونیست‌های TLR3 (Poly: IC)[8]، TLR4 (LPS)[9] با مقادیر مختلف و در زمان‌های انکوباسیون مختلف اقدام به تحریک سلول‌های مزانشیمال موشی (muMSCs) کرده و تأثیر آن بر روی توانایی القاء آپوپتوزیس در سلول‌های T فعال شده، میزان تولید NO و ارتباط بین این دو مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

1. Terminal inverted repeats
2. Messenger RNA
3. Interferon-γ
4. Interferon-β
5. Indoleamine 2,3-dioxygenase; IDO
6. Nitric oxide: NO
7. Fas-ligand
8. Poly: IC: Poly-ribo inosinic, poly-ribo cytidylic acid
9. LPS: Lipopolysaccharide

فصل دوم

کلیات

Review of Literature

کلیات:

۱-۲- تعریف سلول بنیادی[1] و ویژگی‌های آن

مفهوم سلول بنیادی از قوانین حاکم بر تکوین جنین به دست آمده است. در حقیقت یک سلول بنیادی را می‌توان یک "سلول مادر" نامید یعنی سلولی که می‌تواند مولد سلول‌های دیگر باشد.

یک سلول بنیادی از دیدگاه دانشمندان به عنوان یک سلول تمایز نیافته با توانایی تکثیر، خودنوزایی و تولید دودمان‌های سلولی متفاوت در نظر گرفته می‌شود. به این ترتیب تخم لقاح یافته به عنوان سلول بنیادی همه‌توان[2] در نظر گرفته می‌شود زیرا توانایی تولید همه نوع سلول و ایجاد یک موجود کامل را داراست. طی فرایند ریخت‌زایی، سلول‌ها تکثیر یافته، مهاجرت کرده و تمایز می‌یابند. بخشی از سلول‌ها پرده‌های اطراف جنینی را می‌سازند و برخی دیگر تشکیل دهنده توده سلول داخلی جنین می‌شوند. این دسته از سلول‌ها قدرت تشکیل تمام بافت‌ها و سلول‌ها را دارند. توده داخلی جنین واجد سلول‌هایی است که از قدرت خودنوزایی نامحدود برخوردارند و می‌توانند به هر سه لایه جنینی (اکتودرم: پوست و دستگاه عصبی مرکزی؛ مزودرم: استخوان، غضروف، چربی، عضله، خون؛ اندودرم: دستگاه تنفسی و گوارشی) تبدیل شوند. این سلول‌ها به عنوان سلول‌های پرتوان[3] در نظر گرفته می‌شوند. طی گذر از مراحل ریخت‌زایی، تعداد کمی از سلول‌های بنیادی به صورت خاموش و غیر متعهد حفظ می‌شوند تا در آینده و بر اساس نیاز فعال شده و به سایر دودمان‌ها تمایز یابند. به این سلول‌ها، سلول‌های چندتوان[4] گویند که توانایی تمایز به تعداد بسیاری از بافت‌ها را دارا می‌باشند. بارزترین مثال این سلول‌ها، سلول‌های بنیادی خونساز و سلول‌های بنیادی مزانشیمی است. سلول‌های چندتوان در نهایت به سلول‌های بنیادی تک‌توان[5] یا پیشساز[6] تمایز می‌یابند که تنها قادر به تولید یک رده سلولی می‌باشند و قدرت خودنوزایی محدودی دارند. این سلول‌ها را می‌توان در بافت‌های بالغین جستجو کرد (Sanchez-Ramos *et al.*, 2006) (جدول ۱-۲).

1. Stem cell
2. Toti potent
3. Pluri potent
4. Multi potent
5. Uni potent
6. Progenitor

جدول ۱- ۲. ویژگی‌های سلولی در انواع سلول‌های بنیادی (Sanchez-Ramos *et al.*, 2006).

واژه	تعریف	مثال
همه‌توان	قادر به تولید یک موجود کامل است.	بلاستومر
پرتوان	قادر به تولید بسیاری از سلول‌ها است و قدرت نوسازی نامحدود دارد.	سلول بنیادی جنینی
چندتوان	قادر به تولید بسیاری از انواع سلول‌ها می‌باشد و قدرت نوسازی طی طول عمر موجود دارد و چنانچه پیوند شود زیر مجوعه‌های سلولی دیگر را می‌سازد.	سلول‌های بنیادی خونساز و سلول‌های بنیادی مزانشیمی
تک‌توان یا پیشساز	قادر به تولید تعداد محدودی از انواع سلولی است و قدرت نوسازی محدود داشته و یا ندارد.	سلول‌های بنیادی عصبی

۲-۲- زیست‌شناسی سلول‌های مزانشیمی

۱-۲-۲- سلول‌های بنیادی مزانشیمی

سلول‌های بنیادی از لحاظ منشاء به دو دسته عمده سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی بزرگسالان تقسیم می‌شوند. از مهمترین سلول‌های بنیادی بزرگسالان که امروزه توجه اکثر محققین را به خود جلب کرده است، می‌توان به سلول‌های بنیادی مزانشیمی اشاره کرد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی در ترمیم بافت‌هایی با منشاء مزانشیمی مثل استخوان، غضروف، ماهیچه، تاندون و چربی شرکت می‌کنند و البته این سلول‌ها به عنوان سلول‌های حمایت کننده برای سلول‌های هماتوپویتیک در مغز استخوان نیز هستند. حضور این سلول‌ها در مغز استخوان برای اولین بار توسط یک پاتولوژیست آلمانی موسوم به Cohnheim در حدود ۱۴۰ سال قبل (۱۸۶۷) شناسایی شده بود (Ross *et al.*, 1970).

در دسترس‌ترین منبعی که برای استفاده از این سلول‌ها پیشنهاد می‌گردد همان مغز استخوان است گرچه این سلول‌ها از منابع دیگری مثل کبد، خون نوزادان، خون بندناف و مایع آمنیوتیک نیز قابل جداسازی هستند. این سلول‌ها ۰/۰۰۱ تا ۰/۱ درصد از جمعیت سلول‌های هسته‌دار مغز استخوان انسان را تشکیل می‌دهند، از ستیغ استخوان ورک[1] جدا شده و قابلیت جداسازی از استخوان‌های فمور[2] و تیبیال[3] را هم دارند و جالب این که توانایی ازدیاد و تکثیر در محیط آزمایشگاهی را به خوبی نشان داده‌اند. در حیوانات بزرگتر نیز مغز استخوان معمولاً از محل‌های مشابه با آنچه که برای انسان گفته شد تهیه می شود (Murphy

1. Iliac crest
2. Femur
3. Tibial

(2003 ,*et al.*، ولی در جوندگان، از بخش‌های دیافیز استخوان‌های تیبیا و فمور جمع‌آوری می‌گردد (Eslaminejad *et al.*, 2006).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی، که به عنوان سلول‌های زمینه‌ای مغز استخوان و یا سلول‌های پیشساز مزانشیمی هم شناخته شده‌اند، سلول‌هایی با قابلیت تکثیر و پرتوان هستند که قابلیت تمایز به انواع مختلفی از سلول‌های رده مزانشیمی را دارند و از آنها به عنوان سلول‌های بنیادی بزرگسال نام برده می‌شود. در مطالعات مختلف این سلول‌ها را با نام‌های متفاوت به کار برده‌اند که در حقیقت همگی همان سلول‌های بنیادی مزانشیمی هستند (جدول ۲-۲) (Baksh and Tuan, 2004).

جدول ۲-۲. مثال‌هایی از نام‌های مختلف که در مطالعات مختلف به این سلول‌ها داده شده است **(Baksh and Tuan, 2004)**.

نام	تعریف
Precursor of non-haematopoietic tissue	سلول‌های چسبنده مغز استخوان: شامل سلول‌های شبه فیبروبلاست، سلول‌های اندوتلیال و مونوسیت/ماکروفاژها می‌باشد.
Colony forming unit-fibroblast (CFU)	کلونی‌های سلول‌های فیبروبلاستی با حضور معمول سلول‌های مونوسیت و ماکروفاژ
Mesenchymal Stem Cells (MSCs)	سلول‌های کخ با خاصیت چسبندگی‌شان به سطوح جامد شناخته می شوند.
Marrow Stromal Cells	سلول‌های چسبنده مغز استخوان که شامل سلول‌های شبه فیبروبلاست، سلول-های اندوتلیال و کلونی‌های مونوسیت/ماکروفاژ است.
Bone marrow stromal [Stem cells (BMSSCs) and/or Stromal progenitor cells (SPCs)	سلول‌های غیر هماتوپویتیکی با منشاء مزانشیمی که از نظر ریخت‌شناختی شبیه سلول‌های فیبروبلاست می‌باشند.
RS-1,RS-2, mMSCs (RS: Recycling stem cell)(m:mature)	R-S-1: سلول‌های دوکی شکل نازک – R-S-2: سلول‌های دوکی شکل تقریباً نازک mMSCs : سلول‌های دوکی شکل پهن‌تر
Multipotent adult progenitor cells (MAPCs)	سلول‌های پیشساز مشتق از مغز استخوان کشت داده شده

اولین جداسازی موفقیت آمیز این سلول‌ها حدود چهار دهه پیش در سال ۱۹۶۶ توسط Friedenstein و همکاران انجام گرفته است. آنها توانستند سلول‌های پیشساز غضروف و استخوان را که شبیه سلول‌های فیبروبلاست بودند از مغز استخوان رت جدا و در محیط آزمایشگاه رشد دهند (Friedenstein and Petrakova, 1966) ، این جداسازی بر اساس خاصیت چسبندگی سلول‌های مزانشیمی به ظروف کشت، برخلاف عدم چسبندگی سلول‌های هماتوپویتیک صورت پذیرفت که در حقیقت این روش جداسازی تا به امروز به عنوان روش استاندارد برای جدا کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان شناخته شده و استفاده می‌گردد (Kemp *et al.*, 2005). جداسازی و تعیین هویت و بررسی ویژگی‌های این سلول‌ها در تعدادی از مهره‌داران مثل انسان (Alhadlaq *et al.*, 2004)، موش (Meirelles *et al.*, 2003)، گوسفند (Shang *et al.*, 2001) و گاو (Niku *et al.*, 2004) به خوبی صورت گرفته است. کلونی‌های سلول‌های مزانشیمی که به این روش به دست می‌آیند کلونی‌های غیر یکنواختی خواهند بود که احتمالاً حاوی سلول-های استئوبلاست و سلول‌های پیشساز استخوان، سلول‌های چربی، فیبروبلاست‌ها، سلول‌های رتیکولار، ماکروفاژها، سلول‌های اندوتلیال و حتی جزئی از سلول‌های خونی و سلول‌های بنیادی هماتوپویتیک نیز

هستند. بنابراین در حقیقت این سلول‌های چسبنده به ظرف، اگر توانایی تمایز به سلول‌های استخوانی، چربی و غضروفی را در محیط آزمایشگاه نشان دهند، به عنوان سلول‌های بنیادی مزانشیمی شناخته خواهند شد (Alhadlaq, 2004).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی در حقیقت سلول‌هایی هستند که بر اساس تعریف انجمن بین‌المللی سلول درمانی International Society for Cellular Therapy (ISCT) دارای سه ویژگی زیر می‌باشند:

۱. در شرایط کشت معمولی در ظروف کشت پلاستیکی به کف ظرف بچسبند.

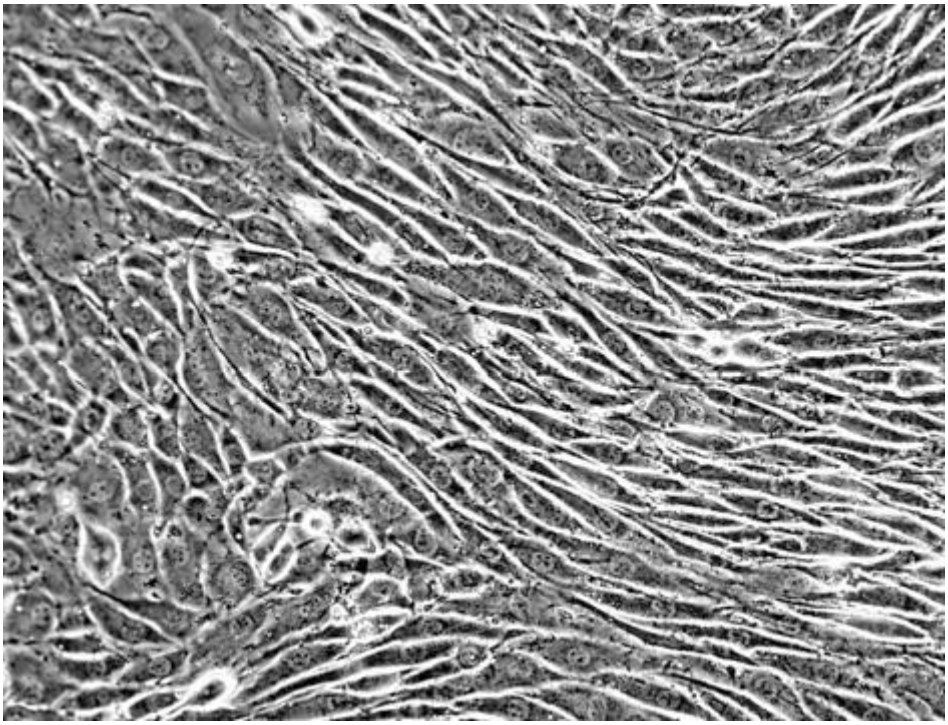
۲. شاخص‌های سطحی CD_{105}، CD_{73}، CD_{90} را بیان کنند و نسبت به بیان شاخص‌های هماتوپویتیک بالاخص CD_{45}، CD_{34} و سایر شاخص‌ها از قبیل CD_{14}، CD11b، CD_{79}، CD_{19} و HLA-DR منفی باشند.

۳. باید توانایی تمایز به سلول‌های چربی، غضروف و استخوان را در شرایط آزمایشگاهی داشته باشند (Keating, 2006).

MAPC[1] نوعی سلول مزانشیمی نابالغ محسوب شده و از طریق کشت مغزاستخوان در محیط حاوی فاکتورهای رشد ویژه از قبیل فاکتور رشد اپیدرمی[2] و فاکتور رشد مشتق از پلاکت‌ها[3] به دست می‌آید. MAPCها توانایی تشکیل انواع سلول‌ها، مارکرهای ویژه سلول رده خونساز نظیر sca-1، C-Kit یا CD45 را بیان نمی‌کنند و قادرند حتی در محیط فقیر از لحاظ مواد غذایی به طور نامحدود رشد یابند (Jiang *et al.*, 2002).

این سلول‌ها از نمونه‌های مغز استخوان با قابلیت چسبندگی خود به ظروف کشت جدا می‌گردند و در محیط کشت DMEM[4] دارای گلوکز اندک که با ده درصد[5] سرم جنین گاوی و ال-گلوتامین تکمیل شده است، بر طبق روش استاندارد کشت داده می‌شوند که در این حالت جمعیت آنها در زیر میکروسکوپ نوری به صورت سلول‌های تک لایه شبیه سلول‌های فیبروبلاست دیده می‌شوند. سلول‌های مزانشیمی با روش‌های مختلفی در محیط‌های کشتی که حاوی سرم گاوی و یا انسانی است کشت و گسترش داده می‌شوند. اما در طی پاساژهای مختلف است که این سلول‌ها به یک جمعیت یکنواخت از لحاظ چسبندگی به ظرف و از لحاظ ریخت‌شناسی (سلول‌های دوکی شکل) می‌رسند (شکل۱-۲) (Eslaminejad *et al.*, 2006).

1. Multi potent adult progenitor cell
2. Epidermal growth facor
3. Platelete-drived growth factor
4. Dulbecco's Modified Eagle's Medium
5. Fetal Bovine Serum



تصویر ۱- ۲. مورفولوژی فیبروبلاستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش (Eslaminejad *et al.*, 2006).

از آنجایی که میزان این سلول‌ها در مغز استخوان بسیار پائین است و تاکنون شاخص خاصی جهت جداسازی این سلول‌ها ارائه نشده است لذا جداسازی آنها تنها منحصر به جداسازی شان از طریق کشت گردیده است (Alhadlaq, 2004).

۲-۱-۲- کنام[1] سلول‌های مزانشیمی

کنام یک سلول در حقیقت مجموعه‌ای از عوامل فیزیکی و شیمیایی است که سلول را احاطه می‌کنند. در حقیقت می‌توان از کنام به عنوان ابرحجم چند بعدی که سلول را احاطه کرده است نام برد. البته کنام مشخصی در مغز استخوان وجود دارد که در حقیقت بقای سلول‌های هماتوپویتیک را از طریق رهاسازی فاکتورهای متعدد و ایجاد شرایط چسبندگی برای آنها فراهم می‌نماید. به نظر می‌رسد که این کنام در واقع از سلول‌های پیشساز استخوان تشکیل شده باشد. استروما و سلول‌های استرومایی همچنان که یک مکان فیزیکی را برای بلوغ سلول‌های خونی فراهم می‌نمایند، طیف وسیعی از ترشحات و سیگنال‌هایی از سلول-های مختلف را دارند که برای متعهد شدن، تمایز و بلوغ سلول‌های هماتوپویتیک مورد نیاز است، به ویژه سلول‌های اندوتلیایل، سلول‌های چربی، ماکروفاژها، سلول‌های رتیکولار، فیبروبلاست‌ها، سلول‌های پیشساز استخوان، سلول‌های هماتوپویتیک و سلول‌های مشتق از آنها هستند که این فضای فیزیکی مغز استخوان را تشکیل می‌دهند (Calvi *et al.*, 2003). در حقیقت این فضایی است که در مغز استخوان برای سلول‌های مزانشیمی فرض می‌شود. سؤالی که در این مورد مطرح می‌شود این است که خود این سلول‌های مزانشیمی

1. Niche

از همان کنامی که خود برای سلول‌های هماتوپویتیک می‌سازند، تأثیر می‌گیرند یا از کنامی که سلول‌های هماتوپویتیک برای آنها ایجاد می‌کنند؟ البته می‌توان اینگونه فرض کرد که در حقیقت این دو رده سلولی (سلول‌های مزانشیمی و سلول‌های هماتوپویتیک) در تعاملی متقابل باهم یک کنام ویژه می‌سازند که هر دوی آنها از آن و از یکدیگر تأثیر می‌گیرند. لازم به ذکر است که سیگنال‌های درون سلولی و خارج سلولی که این دو رده سلولی در طی تکامل خود دریافت می‌کنند کاملاً متفاوت است. لذا شناخت هر چه بهتر این کنام شرایط کشت و گسترش بهتر سلول‌های مزانشیمی را در محیط آزمایشگاه برای ما فراهم می سازد. کنام سلول‌های مزانشیمی مختص به مغز استخوان نخواهد بود و در بافت‌های مختلف کنام‌های متفاوتی را تجربه می‌کنند و یا شاید این که سلول‌های مزانشیمی در جاهای مختلف بدن هم کنام‌های یکسانی را تجربه نمایند (Baksh *et al.*, 2004).

۲-۲- نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی

تا به حال مطالعات زیادی در ارتباط با شناسایی مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان انجام گرفته است. در این ارتباط مارکر سطحی Sca-1 به عنوان یک شناسه سطح سلولی ویژه برای سلول-های غیرخونساز مزانشیمی انسانی شناسایی شده است (Campagnoli *et al.*, 2001). همچنین مشخص شده است که آنتی‌ژن SB-10 که در سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمی وجود دارد با تمایز سلول به استخوان، ناپدید می‌شود (Bruder *et al.*, 1997). در یک مطالعه‌ای از آنتی‌بادی SH-2 بر علیه سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده شد و مشخص گردید که این آنتی‌بادی با اپی‌توپ گیرنده TGF-β[1] که CD105 نامیده می‌شود، واکنش نشان می‌دهد. از این آنتی‌بادی در انتخاب ایمنی - مغناطیسی[2] سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی استفاده می‌شود. البته باید توجه کرد که CD_{105} در سلول‌های اندوتلیال نیز وجود دارد (Cheifetz *et al.*, 1992). همچنین دو آنتی‌بادی SH-3 و SH-4 نیز با اپی‌توپ CD_{73} واکنش نشان می‌دهند (Haynesworth *et al.*, 1992) و با سلول‌های خونساز و استئوسیت واکنش نشان نمی‌دهند. متأسفانه همه آنتی‌ژن‌های شناسایی شده برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی، در انواع دیگر سلول‌ها نیز بیان می‌شود و در نتیجه نمی‌توان از این آنتی‌ژن در مطالعات Invivo استفاده کرد. بنابراین مطالعه مکانیسم های تکثیر، حرکت و لانه گزینی سلول‌ها در بدن و سلول‌های پیوند شده امکان پذیر نمی‌باشد. البته باید توجه کرد که نشانگرهای گفته شده برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان بوده و در گونه‌های دیگر این نشانگرها بیان نمی‌شوند و اصولاً بر اساس مطالعات انجام شده، سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از گونه‌های حیوانی مختلف از این نظر متفاوتند. به طوری که در سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش نشانگرهای بیان شونده عبارتند از Sca-1، C-kit و CD_{44} (Eslaminejad *et al.*, 2007).

1. Transforming growth factor-β
2. Immuno magnetic

روی هم رفته می‌توان گفت که مطالعات انجام شده نشان دهنده این است که فنوتیپ آنتی‌ژنی سلول-های بنیادی مزانشیمی منحصر به فرد نبوده و این سلول‌ها مخلوطی از ویژگی‌های سلول‌های مزانشیمی، اندوتلیالی، اپیتلیالی و عضلانی را دارا هستند. سلول بنیادی مزانشیمی، معمولاً آنتی‌ژن‌های تیپیکال سلول-های خونساز یعنی CD_{45}، CD_{34} و CD_{14} را بیان نمی‌کنند (Minguell *et al.*, 2001).

۳-۲- سلول‌های بنیادی مزانشیمی ویژه بافت

علاوه بر مغز استخوان، سایر منابع اولیه سلول‌های بنیادی مزانشیمی شامل بافت پریوست (Fukumoto *et al.*, 2003)، استخوان ترقوه (Noth *et al.*, 2002)، بافت چربی (Dragoo *et al.*, 2003)، غشاء مفصلی (Wickham *et al.*, 2003)، عضله اسکلتی (Jankowsk *et al.*, 2002)، دندان شیری (Miura *et al.*, 2003) و حتی بافت ژل وارتون[1] بندناف (Sarugaser *et al.*, 2005) است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از تمام موارد ذکر شده قابل تمایز به چندین رده سلولی هستند. برای مثال در سال ۲۰۰۱ Bari و همکاران نشان دادند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از پرده سینویوم پس از پیوند قادرند در بازسازی عضله موش Nude شرکت نمایند و در نتیجه پروتئین دیستروفین در غشاء سلول عضلانی موش مبتلا به عضلات دیستروفیک بیان شد. همچنین نشان داده شده است که سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی دارای توانایی مشابه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی پرده سینویوم هستند. مطالعات نشان داده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و چربی از لحاظ رشد، پیری و تمایز چند رده‌ای تفاوت‌های بسیار اندکی دارند. بنابراین می‌توان از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دست آمده از بافت‌های مختلف در سلول درمانی استفاده کرد و این که چه نوعی مورد استفاده قرار گیرد بستگی به این دارد که کدام بافت قابل دسترس‌تر است (Dragoo *et al.*, 2003).

۴-۲- منشاء مشترک سلول های بنیادی مزانشیمی و خونساز

در سال ۱۹۹۵، Huss و همکاران در طی مطالعات خود دریافتند که سلول‌های چسبنده CD_{34}^- با مورفولوژی فیبروبلاستی قادرند به سلول‌هایی با ویژگی‌های خونساز تمایز یابند. این محققین چنین استدلال کردند که در مغز استخوان سلول بنیادی مشترک خاموشی وجود دارد که فیبروبلاستی بوده و آنتی‌ژن CD_{34} را بیان نمی‌کند. این سلول‌ها تحت شرایط ویژه قادرند آنتی‌ژن CD_{34} را بیان کنند و به سلول‌های پیشساز خونساز و مزانشیمی تبدیل شوند. همچنین این گروه محققین پیشنهاد کردند که در طی این فرایند ممکن است به طور معکوس برخی سلول‌های فعال با توقف بیان CD_{34} به سلول بنیادی خاموش فیبروبلاستی تبدیل شوند.

مطالعات انجام شده نشان می‌دهند داربست مغز استخوان که جایگاه سلول‌های بنیادی مزانشیمی چندتوان غیرمتعهد است، بافت‌های مزانشیمی در مناطق مختلف بدن را از لحاظ سلول‌های پیشساز

1. Warton's Jelly