دانشکده دامپزشکی

گروه میکروب شناسی

سال تحصیلی ۱۳۹۱-۱۳۹۰ شماره پایان نامه: ٤٢١ک-د

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته **ایمنی شناسی**

عنوان:

تاثیر همزمان زیموزان وترکیب پپتیدوگلیکان، لیپوپلی ساکارید برمیزان تولید نیتریک اکساید و القاء آپوپتوزیس در سلول های T فعال شده توسط سلول هایژ بنیادی مزانشیمال موش

اساتید راهنما:

احمد مرشدی

امیر توکمه چی

استادمشاور:

نوروز دلیرژ

نگارنده

الهام دارابی

شهریور ۱۳۹۱

(حق چاپ و نشر برای دانشگاه ارومیه محفوظ می‌باشد)

بسم الله الرحمن الرحيم

خداوندا

ای خدای من. ای آفریدگار من. ای همه ی هستیم

بر من این نعمت را ارزانی دار که:

بیشتر در پی تسلا دادن باشم تا تسلی یافتن

بیشتر در پی فهمیدن باشم تا فهمیده شدن

بیشتر در پی دوست داشتن باشم تا دوست داشته شدن

زیرا در بخشیدن است که می یابیم

و در عفو کردن است که بخشیده می شویم

و در مردن است که حیات جاوید می یابیم

تقدیم به پدر و مادر عزیزم

مهربان فرشتگانی که لحظات ناب باور بودن، لذت و غرور دانستن، جسارت خواستن، عظمت رسیدن و تمام تجربه های یکتا و زیبای زندگیم، مدیون حضور سبز آنهاست.

به خواهران عزیزم خصوصا خواهرم، گلناز

که همواره با محبتی مادرانه و با حسی سرشار از زندگی همگام و همراه من در طی مسیر زندگی بوده اند

به برادرانم

که تکیه گاهی برای زندگیم، هستند

تقدیر و تشکر

خداوند بزرگ را به خاطر عدالت بی پایان و نعمت های بی دریغش شاکرم و بر حسب وظیفه، مراتب قدردانی خویش را از تمام کسانی که مرا در این مقطع یاری رسانده اند اعلام می دارم.

از اساتید ارجمندم جناب آقای دکتر احمد مرشدی (استاد راهنمای اول) و جناب آقای دکتر امیر توکمه چی (استاد راهنمای دوم) و جناب آقای دکتر نوروز دلیرژ (استاد مشاور) که گلشن علم و دانش را با راهنمایی های کارساز و سازنده بارور ساختند و همواره در تمامی مراحل انجام این پایان نامه به من عطا کردند، از علمی که فراوان داشتند؛ تقدیر و تشکر نمایم. لطف ایشان، همیشه در دل من جای خواهد داشت.

از اساتید ارجمند جناب آقای دکتر ملکی نژاد (داور خارجی) و سرکار خانم دکتر احمدی (داور داخلی) به پاس قبول زحمت داوری و مطالعه متن پایان نامه و ارائه پیشنهادات ارزشمندشان کمال تقدیر و تشکر را دارم.

از تمامی دوستان و همکلاسی هایم تشکر میکنم.

به پایانی نرسیدیم ولی ناگزیریم پایانی بنگاریم و این ناچاری خرده ها می آفریند، مشتاقیم دانایان خرده ها بنمایند تا بزداییم و بزدایند.

الهام دارابی

شهریور ۹۱

فهرست

چکیده: I

کلیات ۲

۱-۱)مقدمه وهدف ۲

۱-۲) تاریخچه ٤

۱-۳) ویژگیهای اصلی و عمومی سلولهای بنیادی ۴

۱-۳-۱) خصوصیات کلیدی سلولهای بنیادی ٦

۱-٤) سلولهای بنیادی از لحاظ پتانسیل تمایز ۷

۱-۵) انواع سلولهای بنیادی ۷

۱-٦) تفاوت سلولهای بنیادی جنینی با سلولهای بنیادی بالغ ۸

۱-۷) کنام اکولوژی ۹

۱-۷-۱) رده بندی کنام ها ۹

۱-۸) سلولهای بنیادی، کنام، درمان ۱۱

۱-۹) ایمنی سلولهای بنیادی ۱۱

۱-۹-۱) آنتی ژنها گروه خونی ۱۱

۱-۹-۲) آنتی ژنهای سازگاری نسجی فرعی ۱۲

۱-۹-۳) مولکولهای HLA ۱۲

۱-۱۰) مسیرهای تمایز در سلولهای بنیادی بالغ ۱۲

۱-۱۱) سلولهای بنیادی و کاربرد آ نها ۱۳

۱-۱۱-۱)تمایز به هپاتوسیت و درمان بیماریهای کبدی ۱۳

۱-۱۱-۲)سلولهای بنیادی مزانشیمی وتمایز به هپاتوسیتها ۱۳

۱-۱۱-۳) تمایز سلولهای بنیادی جنینی به کاردیومیوسیت ۱۴

۱-۱۱-٤)تمایز به سلولهای مولد انسولین و درمان دیابت ۱۴
۱-۱۱- ۵) تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به استخوان ۱۵
۱-۱۱-٦)تمایز سلولهای بینیادی مزانشیمی به غضروف ۱۵
۱-۱۲)زیست شناسی سلولهای بنیادی مزانشیمی ۱۵
۱-۱۳) کنام سلولهای بنیادی مزانشیم ۱۷
۱-۱٤) جداسازی وتعیین هویت سلول های بنیادی مزانشیمی ۱۸
۱-۱۵) منابع مختلف دسترسی به سلولهای بنیادی مزانشیمی ۱۹
۱-۱٦) نشانگرهای سطحی سلولهای بنیادی مزانشیمی ۱۹
۱-۱۷) مورفولوژی سلولهای بنیادی مزانشیمی در محیط کشت ۲۰
۱-۱۸) انعطاف پذیری سلولهای بنیادی بالغ ۲۱
۱-۱۹) سلولهای بنیادی مزانشیمی و توانایی خود نوزایی ۲۲
۱-۲۰) تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی ۲۲
۱-۲۱) پتانسیل تمایزی سلول بنیادی مزانشیمی ۲۳
۱-۲۱-۱) هتروژن بودن کشت سلول بنیادی مزانشیمی ۲۳
۱-۲۱-۲) پتانسیل تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی به چندین رده سلولی ۲۳
۱-۲۱-۳) عوامل مؤثر بر تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی در شرایط آزمایشگاهی ۲٤
۱-۲۲)سلول و ژن درمانی با استفاده از سلول بنیادی مزانشیمی ۲٤
۱-۲۳) ایمنی زایی سلولهای بنیادی مزانشیمی ۲۵
۱-۲۳-۱) بیان آلوآنتی ژنها بر روی سلولهای بنیادی مزانشیمی ۲٦
۱-۲۳-۲)سلولهای بنیادی مزانشیمی و سلولهای T ۲٦
۱-۲۳-۳) سلولهای B و سلولهای بنیادی مزانشیمی ۲۷
۱-۲۳-٤) سلول کشنده طبیعی و سلولهای بنیادی مزانشیمی ۲۸
۱-۲۳-۵) سلولهای بنیادی مزانشیمی و سلولهای دندریتیک ۲۸
۱-۲٤) پیش نیازهای سلولهای مزانشیمی در مقیاس بالا جهت کاربردهای کلینیک ۲۹

۱-۲٤-۱) مواد شروع اولیه ۲۹
۲-۲٤-۱) غلظت سلولها درهنگام کشت دادن ۲۹
۳-۲٤-۱)تعداد پاساژها ۳۰
٤-۲٤-۱)محیط کشت ۳۰
۱-۲۵) TLR ۳۰
۲٦-۱) آپوپتوز ۳۲
۱-۲٦-۱) آپوپتوز در شرایط فیزیولوژیک ۳۲
۲-۲٦-۱) آپوپتوز در شرایط پاتولوژیک ۳۲
۳-۲٦-۱) مسیرهای شروع آپوپتوز ۳۳
٤-۲٦-۱) مسیر برون زاد (شروع شده توسط گیرنده مرگ) ۳۳
۵-۲٦-۱) مسیر درون زاد(میتو کندر یایی) ۳۳
٦-۲٦-۱) مرحله اجرایی آپوپتوز ۳٤
۲۷-۱) فلوسایتومتری ۳۵

مواد و روش کار ۳۷

۱-۲)کشت باکتری وجداسازی پپتیدو گلیکان ولیپو پلی ساکارید دیواره ۳۷
۱-۱-۲) مواد و وسایل لازم: ۳۷
۲-۱-۲) روش کار ۳۸
۱-۲-۱-۲) نحوه تهیه بافر لیز کننده ۳۸
۲-۲) جداسازی وکشت سلول: ۳۸
۲-۲-۲) روش کار ٤۰
۱-۲-۲-۲)حیوانات استفاده شده ٤۰
۲-۲-۲-۲) جداسازی و کشت سلولهای بنیادی مزانشیمال مغز استخوان ٤۰
۱-۳-۲-۲-۲) مواد و وسایل لازم: ٤۱

۲-۳-۲-۲-۲)روش کار ٤۲
۳-۲-۲-۲)تعیین تعداد و میزان زنده بودن سلولها ٤۲
٤-۲-۲-۲)تریپسینه کردن و پاساژ دادن سلولها ٤۲
۱-٤-۲-۲-۲) مواد و وسایل لازم: ٤۲
۲-٤-۲-۲-۲)روش کار ۴۳
۵-۲-۲-۲)مجاورسازی آگونیستها : ٤۳
۳-۲) جداسازی سلول های تک هستهای از طحال موش ٤۳
۱-۳-۲) مواد و وسایل لازم ٤٤
۲-۳-۲) روش کار ۴۵
٤-۲) سنجش میزان آپوپتوز به روش رنگ آمیزی Acridin –Orange/PI توسط دستگاه فلوسایتومتری..... ٤٦
۱-٤-۲)مواد و وسایل لازم: ٤٦
۲-٤-۲) مراحل آمادهسازی سلولها برای فلوسایتومتری ٤۷
۵-۲) اندازه گیری نیتریک اکساید در مایع رویی به روشGriess..... ٤۷
۱-۵-۲)مواد و وسایل لازم: ٤۷
۲-۵-۲) اساس آزمایش: ٤۸
٦-۲) تجزیه و تحلیلهای آماری ۴۸

نتایج ۵۰

۱-۳) نتایج بررسی میکروسکوپی مورفولوژی سلول های بنیادی مزانشیمال ۵۰
۲-۳) نتایج حاصل نتایج مربوط به آزمایش سنجش میزان آپوپتوز به روش رنگ آمیزی Acridin- orange -PI ۵۱
۱-۲-۳) نتایج حاصل از آپوپتوز سلولهای T مجاور شده با سلولهای مزانشیم تیمار شده با زیموزان ۵۲
۲-۲-۳)نتایج حاصل از آپوپتوز سلولهای T مجاور شده با سلولهای مزانشیمال تیمار شده با پپتیدو گلیکان -لیپوپلی ساکارید..... ۵۳
۳-۲-۳)نتایج حاصل از آپوپتوز سلولهای T مجاور شده با سلولهای مزانشیمال تیمار شده با مخلوط زیموزان ؛ پپتیدو گلیکان –لیپوپلی ساکارید درغلظت بالا و پایین ۵٤

۳-۳) نتایج حاصل از اندازه گیری نیتریک اکساید در مایع رویی سلولهای بنیادی مزانشیمی ۵۵
۱-۳-۳)نتایج حاصل از اندازه گیری نیتریک اکساید در مایع رویی سلولهای مزانشیمال تیمارشده با زیموزان ۵۵
۲-۳-۳)نتایج حاصل از اندازه گیری نیتریک اکساید در سلولهای مزانشیمال تیمارشده با پپتیدو گلیکان – لیپوپلی ساکارید ۵٦
۳-۳-۳) نتایج حاصل از اندازه گیری نیتریک اکساید در سلولهای مزانشیمال تیمارشده با مخلوط زیموزان ؛ پپتیدو گلیکان – لیپوپلی ساکارید ۵۷
بحث ونتیجه گیری.....۶۰
نتیجه گیری : ۶۲
پیشنهادات ٦۲
منابع: ۶۴
چکیده انگلیسی ۷۳

چکیده فارسی:پایان نامه ٤٢١-ک-٢ کارشناسی ارشد ایمنی شناسی

سال تحصیلی۹۲-۹۱

نگارنده: الهام دارابی

عنوان پایان نامه :تاثیر همزمان زیموزان وترکیب پپتیدوگلیکان-لیپوپلی ساکارید برمیزان تولید نیتریک اکساید و القاء آپوپتوزیس در سلول های T فعال شده توسط سلول های بنیادی مزانشیمال موش.

سلول‌های بنیادی مزانشیمال بعنوان سلول‌های پیش ساز غیر خون ساز وچند توانی معرفی می‌شوند که در طیف وسیعی از بافتهای بالغ بدن یافت می‌شوند. TLRها یکی از گیرنده‌های ایمنی بیان شده در سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمال می باشد که می تواند طیف وسیعی از عملکردهای سلول را تحت الشعاع قراردهند. اخیراً مشخص شده است تحریکTLRهای ویژه در سطح سلول-های بنیادی مزانشیمال می‌تواند پاسخ‌های ایمنی ناشی از این سلول‌ها را به سمت فنوتیپ‌های پیش‌التهابی(MSC-1) یا ضدالتهابی (MSC-2)جهت دهی کند. در این مطالعه از ٤٠سر موش سوری استفاده گردید. بعد از بیهوشی از استخوان فمور و تیبیا سوسپانسیون سلولی تهیه شد. پس از ٢٤ ساعت انکوبه کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی به روش چسبندگی به کف فلاسک جدا شدند. پس از رسیدن سلول های MSC به تراکم ۷۰٪، با آگونیست‌های TLR، شامل زیموزان ، پپتیدوگلیکان-لیپوپلی ساکارید و مخلوط زیموزان و پپتیدوگلیکان-لیپوپلی ساکارید در دو غلظت بالا و پایین ودر دو زمان ۱و۱۲ ساعت تیمار شدند. سپس مایع رویی سلول‌ها جهت اندازه گیری نیتریک اکساید جمع‌آوری شد. آپوپتوز در سلول‌های T مجاور شده با MSC به روش فلو سایتومتری و با رنگ آکریدین – اورنج ، PI اندازه گیری شد. یافته‌ها افزایش معنی‌داری در آپوپتوز سلول‌هایT مجاور شده با MSC تیمار شده با زیموزان در غلظت پایین (۵µg/ml) ودر زمان ۱ساعت نشان دادند (P <۰/۰۵). در مقابل بیشترین نیتریک اکساید تولید شده در مایع همین سلول‌ها در غلظت پایین(۵µg/ml) زیموزان و مدت۱۲ ساعت مشاهده گردید (P <۰.۰۵). در مورد پپتید و گلیکان - لیپوپلی ساکارید، بیشترین آپوپتوز در سلول‌های T در دوز پایین(۵ ng/ml) و در مدت ۱۲ ساعت و بیشترین میزان نیتریک اکساید در این گروه در غلظت بالا(۱۰ng/ml) و زمان۱ ساعت مشاهده شد(P <۰/۰۵). در مورداستفاده ازمخلوط زیموزان+پپتیدوگلیکان-لیپوپلی ساکارید، بیشترین آپوپتوز درسلول‌های Tدرغلظت بالا(۱۰ng/ml:۲۵µg/ml) و مدت ۱ساعت و بالاترین میزان نیتریک اکساید درغلظت پایین(۵ ng/ml:۵µg/ml) و در مدت ۱۲ساعت مشاهده گردید. (P <۰/۰۵). در نهایت با مشاهده آپرپترز القا شده در سلرل‌های T توسطMSC می‌توان چنین نتیجه گرفت که تحریک TLRهای سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمال موش با غلظت مناسب زیموزان و پپتیدو گلیکان – لیپوپلی‌ساکاریدو وبا زمان انکوبه مناسب می تواند این سلول‌هارا به طرف سلول ضد التهابی(MSC2) که سرکوبگر سلول‌های T خود واکنش گراز طریق آپوپتوزیس هستند، سوق دهند.

واژگان کلیدی: آگونیست سلول‌های بنیادی مزانشیمال، TLR، نیتریک اکساید،

فصل اول:

کلیات

(Rewiev Of Literature)

کلیات

۱-۱)مقدمه وهدف

در مقاله ای که در شماره ۲۹۰ مربوط به سال ۲۰۰۰ مجله علمی science به چاپ رسید، بزرگترین پیشرفت غیر منتظره سال۱۹۹۹، جداسازی سلولهای بنیادی انسان عنوان شد (Brazelton *et al.*, 2000). این سلولها به دلیل ویژگی بس توانی که دارند و قادرند انواع مختلف سلولها را تولید کنند، مورد توجه بسیاری می‌باشند. مطالعه سلول‌های بنیادی حوزه‌ای از دانش است که به چگونگی ایجاد یک موجود کامل از یک سلول می‌پردازد. همچنین چگونگی جایگزینی سلول‌های آسیب دیده با سلول‌های سالم در موجود بالغ نیز در این حوزه از دانش قرار می گیرد. مطالعه سلول‌های بنیادی ازگذشته در بسیاری از حوزه‌های علوم مطرح بوده است. ازجمله آن‌ها می‌توان جنین شناسی، رشد و تکوین، سرطان به ویژه از نظر مولکولی و پزشکی پیوند را نام برد(Alison *et al.*, 2000). این سلول‌ها نیز، موضوع پژوهش‌های بی‌شماری برای دهه‌های طولانی تا زمان شبیه سازی دالی[1] بوده اند. پس از آن با جداسازی سلول‌های بنیادی جنین انسان، توجه بیشتری معطوف به جنبه‌های اخلاقی، قانونی، علمی و پزشکی این سلول‌ها شد. درسال‌های اخیر توجه زیادی به زیست شناسی سلول‌های بنیادی بالغ شده است. بخشی از این توجه به دلیل بحث های اخلاقی و جدال های حقوقی بوده است که پیرامون استفاده از سلولهای بنیادی جنینی برای درمان بیماری های انسانی، پیوند بافت و اندام و همچنین پزشکی باز ترمیمی[2] مطرح بود. اطلاعات فزاینده در طول سال های اخیرحاکی از آن است که توانایی سلول های بنیادی بالغ برای تمایز به سلول های مختلف، به مراتب بیشتر از آن است که در گذشته تصور می‌شد. در واقع، امروزه اعتقاد بر این است که سلول‌های بنیادی بالغ قادرند علاوه بر تمایز به سلول‌هایی که از آن منشا گرفته اند، به سلول-های بافت‌های دیگر نیز تبدیل شوند. در این صورت به جرات می توان گفت که این سلول ها می توانند به عنوان منبع بافتی بسیار ارزشمندی در استفاده های بالینی به حساب آیند. همچنین سلول های بنیبادی بالغ امکان پیوندهای اتولوگ[3]را فراهم می کنند که در نتیجه موجب حذف خطر احتمالی دفع پیوند می‌شوند (Rasmusson *et al.*, 2005). سلول‌های بنیادی بالغ در اکثر بافت-های بالغ وجود دارند. اما با این وجود، خصوصیات آنها در بافت‌های کمی از جمله مغز استخوان و روده به خوبی مطالعه شده‌ا ند. این سلول‌ها به عنوان سلول‌هایی تعریف می شوندکه با تقسیم نامتقارن از طرفی منجر به تجدید و حفظ خود می شوند و از سوی دیگر سلول دختری تولید می کنند که قادر است وارد مرحله تمایزی شود. باوردیگری که برای مدت طولانی در مورد سلول‌های بنیادی وجود داشت این بود که این سلول‌ها تنها قادرند به سلول‌هایی تمایز پیدا کنند که مرتبط با بافتی است که از آن جدا شده اند. در سال های اخیر توجه به ویژگی انعطاف پذیری که در مورد سلول‌های بنیادی بالغ مشاهده شده است، این باور مورد سوال

1 .Dolly
2. regenerative
3.outolog

قرار گرفته است (De Ugarte *et al.*, 2003). اغلب مطالعات درمورد ویژگی انعطاف پذیری این سلول‌ها،پیرامون سلول‌های بنیادی مغزاستخوان صورت گرفته است. به دنبال انتقال سلول‌های مغز استخوان به موش، این سلول‌ها به شماری از سلول‌های متفاوت ازجمله عضله اسکلتی، عضله قلبی، سلول‌های اندوتلیال، سلول‌های کبدی و مغزی تمایز می یابند. همچنین نشان داده شده است که به دنبال انتقال سلول‌های مغز استخوان به انسان، این سلول‌ها در کبد قابل ردیابی هستند. این امر نشانگر آن است که مشابه انعطاف پذیری که در موش دیده می شود، درانسان نیز می تواند رخ دهد(Alison *et al.*, 2000). با توجه به ویژگی پر توانی و همچنین انعطاف پذیری سلول‌های بنیادی،این سلول ها امروزه در پزشکی پیوند بسیار مطرح می باشند. بحث های اخلاقی و جدال های بی شماری پیرامون استفاده از سلول‌های بنیادی به ویژه سلول‌های بنیادی جنینی و مطالعه روی آنها وجود دارد. با وجود پیشرفت‌هایی که دراستفاده از سلول‌های بنیادی به دست آمده است، چه در استفاده از آنها برای رفع مشکلات ناباروری در انسان و چه در پزشکی پیوند بافت و اندام، بیشترین نگرانی‌ها در مورد استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی برای تولید گونه انسان می باشد. با وجودی که مشاهده می شود الگوی بیان ژن‌ها در حیواناتی که حاصل از انتقال هسته به سلول‌های بالغ می باشند تغییر کرده است و همچنین میزان موفقیت در تولید افراد سالم کم بوده است و باوجودی که بسیاری از اختلالات فیزیکی در مطالعاتی مشابه با آن دیده شده است، هنوز بحث‌های جدی هم بر علیه انتقال هسته به سلول تخم بدون هسته و هم‌برعلیه استفاده از سلول-های بنیادی جنینی برای تولید یک موجود کامل وجود دارد(Mclaren 2001). هر ساله، میلیون‌ها نفر انسان از بیماری‌های خطرناک و باز زاینده چون بیماری های سیستم عصبی (به طور نمونه پارکینسون، MS و سکته مغزی)،بیماری‌های قلبی، بیماری-های‌کبدی، بیماری‌های پانکراس و سایر اندام‌ها رنج می برند یا حتی می‌میرند. درمان با سلول‌های بنیادی می تواند موجب بهبود بسیاری از بیماری‌ها گردد. اما این امر چه پیامدهایی به همراه خواهد داشت به ویژه زمانی که این سلول‌ها از جنین گرفته شود. امروزه هرگونه روش درمانی آزمایشی جدید در پزشکی، بحث‌های اخلاقی چه برای پزشکان و چه برای بیماران به همراه دارد. اما استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی و مطالعه آنها یک چالش دیگر به همراه دارد و آن بحث تخریب جنین انسان است و این که کدام یک ارجحیت دارد، حفظ جنین انسان و یا تخریب آن به منظور مطالعه سلول‌های بنیادی و استفاده بعدی آن در پزشکی (Mclaren 2001). با وجود مطالعات بسیار پیرامون سلول‌های بنیادی، هنوز پرسش‌های فراوانی در مورد آنها وجود دارد که جواب داده نشده است. همچنین به مانند سایر علوم، پیشرفت و کشف یافته‌های جدید در این سلول‌ها، خود پرسش‌های بی شمار دیگری را به همراه می آورد. می توان گفت با وجود تمام پیشرفت‌ها تا به امروز، در ابتدای راه هستیم و هنوز نکات مبهم بسیاری در مورد این سلول ها وجود دارد که نیازمند پژوهش‌های بیشتر می باشد. هدف ما از مطالعه حاضر بررسی تاثیرآگونیستTLR2,6 (زیموزان) و TLR2,4(پپتیدوگلیکان ،لیپو پلی ساکارید) با دو غلظت مختلف و درزمان‌های مختلف انکوباسیون بر تحریک سلول های مزانشیمال موشی و تاثیر آن بر توانایی این سلول ها در تولید NO و القاء آپوپتوز در سلول های T فعال شده است.

۲-۱) تاریخچه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی واقع در مغز استخوان برای اولین بار توسط فردنستین وپتراکوا در سال ۱۹٦٦ شناسایی شدند (Friedenstein *etal.*, 1966). این محققین در مطالع ای سلول‌های پیش ساز مغز استخوان را، از استخوان موش صحرایی استخراج کردند ولی اولین شواهد قطعی توسط فردنستین در اواسط سال ۱۹۷۰ ارائه شد. این محقق نمونه‌های مغز استخوان را در یک ظرف پلاستیکی کشت داد و پس از ٤ ساعت یا بیشتر سلول‌های غیر چسبنده را دور ریخت. در اصل سلول‌های دور ریخته شده سلول‌های بنیادی رده خونساز بودند. او گزارش کرد که بخش کوچکی از سلول‌های چسبنده مغز استخوان از لحاظ ظاهر ناهمگون بوده وبخشی که اتصالات محکمی با سطح ظرف کشت برقرار کرده دوکی شکل بوده و تجمعات دو تا چهار سلولی ایجاد کرده این تجمعات به مدت ٤-۲روز خاموش باقی ماندند وپس از آن به سرعت تکثیر یافتند. این سلول‌ها پس از چندین بار پاساژ به صورت یکدست دوکی ظاهر شدند. مهمترین ویژگی این سلول‌ها،داشتن توانایی ایجاد کلون‌هایی شبیه بافت استخوان و غضروف بود.

مشاهدات ابتدایی فردنستین، توسط چندین محقق به ویژه Piersma و همکاران و Owe درطول سال ۱۹۸۰ توسعه پیدا کرد. این مطالعات نشان داد که سلول‌های جدا شده با روش فردنستین در اصل سلول‌های چند توان بوده و قادرند به رده‌های استخوانی، غضروفی، چربی و حتی عضلانی متمایز شوند (Piersma *et al.*,1985; Own 1988).

۳-۱) ویژگی‌های اصلی و عمومی سلول‌های بنیادی

تمام سلول‌های بنیادی بدون توجه به منبع آن‌ها دارای شماری ویژگی مشترک و عمومی به شرح زیر هستند.

۱- فاقد ساختاره‌ای ویژه بافتی بوده که اجازه می‌دهد سلول عمل خاصی را انجام دهد. در نتیجه فاقد اعمال ویژه بافتی هستند اگرچه قادرند به سلول‌های تخصص یافته تبدیل شوند.

۲-سلول‌های تمایز نیافته‌ای هستند که قادر به تقسیم وتجدید خود برای مدت طولانی‌اند. برخلاف سلول‌های دیگر مانند عضله و خون که قادر به تکثیر خود نیستند، می توانند بارها تقسیم گردند. یک جمعیت آغازی سلول بنیادی پس از ماه‌ها تکثیر در آزمایشگاه، تولید میلیون‌ها سلول می کند. سلول‌های حاصل اگر تخصصی نشوند، نیز قادرند مانند والدین برای مدت‌ها تکثیر شوند. این سلول‌ها دچار پیری نشده و بدون محدودیت تقسیم می شوند. موضوع مهم برای دانشمندان، عامل‌های اختصاصی یا شرایط ویژه‌ای است که موجب می شود سلول‌های بنیادی به صورت غیر تخصصی باقی بمانند.

۳- کاریوتیپ طبیعی خود را حفظ می‌کنند. مشخص شده است حتی پس از ۲۸۰ بار تکثیر باز هم سلول‌های بنیادی دارای کاریوتپ طبیعی اند. در حالی که معمولا سایر سلول‌ها پس از چند تقسیم در کاریوتیپ آن‌ها تغییراتی صورت می گیرد. این ویژگی سلول‌های بنیادی یکی ازدلایل نامیرا[1] بودن نسبی این سلول‌ها است.

٤- می توانند به سلول‌های تخصصی تبدیل شوند. تبدیل سلول‌های بنیادی به سلول‌های تخصص یافته را تمایز[2]گویند. علائم درونی مانندژن‌های درون سلولی، علائم بیرونی مانند ترشحات شیمیایی سلول‌ها، تماس‌های فیزیکی توسط سلول‌های مجاور وحضور مولکول‌های معین در محیط در تبدیل این سلول‌ها به سلول‌های تخصص یافته نقش دارند. هنوز به بسیاری از این پرسش‌هادر این زمینه پاسخ داده نشده است. به طور نمونه آیا این علائم برای همه سلول‌های بنیادی یکسان هستند؟ آیا می توان علامت ویژه‌ای را شناسایی کرد که موجب تمایز به سوی یک نوع سلول خاص شود(Mclaren 2001).

۵- می توانند در غیاب سرم تکثیر شوند، برخلاف سلول‌های دیگر که برای رشد خود نیازمند عامل‌های سرمی هستند، سلول‌های بنیادی قادرند در غیاب سرم نیز به تکثیرخود ادامه دهند. این ویژگی سلول‌های بنیادی آن‌ها را شبیه سلول‌های سرطانی می سازد.

٦-تابع مهار تماسی نیستند، سلول‌های بنیای برخلاف سایر سلول‌ها تابع مهار تماسی و وابسته به سطح برای تکثیرخود نمی باشند. بنابراین به تکثیر خود به صورت لایه‌های متعدد ادامه می‌دهند.در واقع در این سلول‌ها، هیچ گونه توقف چرخه سلولی و سکون وجود ندارد. این ویژگی نیز،آنها را مشابه سلول‌های سرطانی می سازد.

۷-به عنوان سلول‌های توموری شرطی هستند، غیر از کاریوتیپ طبیعی، این سلول‌ها هنگام تزریق به حیوان بالغ (به طور نمونه یک موش بالغ)، تولید تراتوکارسینوما[3]می کنند. بنابراین به آن‌ها سلول‌های توموری شرطی[4] گفته می شود.

۸-هر سلول قادر به تولید کلنی[5]می باشد، البته این مسئله بیشتر در موش مشاهده شده است و در انسان سلول‌ها بیشتر به سوی مرگ یا تمایز کشیده می شوند.

۹-دارای سطح بالایی از آنزیم تلومراز هستند، تلومراز برای جلوگیری از کوتاه شدن طول تلومر در طول تقسیمات متعدد سلولی لازم است. طول تلومر عامل محدود کننده تقسیم سلول است. در هر تقسیم سلول، در سلول‌های عادی مقداری از طول تلومرکم می شود تا سرانجام به جایی می رسد که سلول نمی تواند تقسیم شود. اما در سلول‌های بنیادی تلومراز به طور مرتب طول تلومر را ترمیم می کند. درنتیجه این سلول‌هاقادرند به طور نامحدود به تقسیم خود ادامه دهند. در بسیاری از سرطان‌ها مشاهده شده که

1.immortalize
2. differentiation
3.teratocarcinoma
4 .conditional tumour cells
5 .colonogenic

تلومراز دارای فعالیت بوده اما در سلول‌های عادی، پس از دوران جنینی، تلومراز غیر فعال مشاهده شده و تنها در سلول‌های بنیادی فعال باقی می ماند.

۱۰-بیان عامل oct-٤ :پروتئینoct-٤ یک عامل رونویسی است که در روشن و خاموش کردن ژن‌ها در زمان مناسب برای تمایز و رشد جنین موثر است. سلول‌های تمایز نیافته‌ای چون سلول‌های بنیادی این پروتئین را می سازند اما در سلول‌های تمایز نیافته ژن آن خاموش است(Keating,2006).

۱۱-سلول‌های بنیادی فاقد کروموزومx غیر فعال هستند. بر خلاف سلول‌های مربوط به موجود مونث که در اوایل جنینی یکی ازکروموزوم xهای آن‌ها غیر فعال می شود در سلول‌های بنیادی این امر رخ نمی دهد.

۱۲-سلول‌های بنیادی فاقد مرحله کنترل های G_1 هستند. این مرحله در تنظیم طول چرخه سلول وجلوگیری از ورود سلول به تقسیم نقش دارد.

۱۳-در سلول‌های بنیادی ژن connexin بیان نمی‌شود و فعالیت[1] (GJIC) وجود ندارد. ژنconnexin در خلال تکامل زیستی حفظ شده و همزمان با انتقال از تک سلولی به پرسلولی‌ها ایجاد شده است. عملکرد این ژن ایجاد یک کانال غشایی است که به صورت نیمه می باشد و با نیمی از کانال غشایی سلول مجاور خود در یک ردیف قرار گرفته و ایجاد اتصال باز (gap junction) می‌کند که یک مجرای غیر فعال برای عبور یون‌ها ومولکول‌های کوچک است تا سلول‌های موجود در یک بافت از نظر محیط الکتریکی و فعالیت متابولیکی یکنواخت شوند. GJIC ها باکنترل رشد،تمایز، آپوپتوز وپاسخ سازشی سلول‌های تمایز یافته ارتباط دارد. سلول‌های سرطانی فاقد این اتصال بوده و سلول‌های بنیادی نیز این اتصال را ندارند(Burdon *et al.*,1997).

۱-۳-۱) خصوصیات کلیدی سلول‌های بنیادی

سلول‌های بنیادی دو ویژگی کلیدی دارندکه آن‌ها را از سایر سلول‌ها متمایز کرده است. آنها می توانند خود را برای مدت طولانی بازیابی تولید کنند[2] و دیگر اینکه می توانند تحت شرایط خاص در بدن و یا آزمایشگاه، سلول‌هایی تولید کنند که در نهایت به انواع خاصی از سلول‌ها تبدیل شوند. روندی که آن را تحت عنوان تمایز یا تخصصی شدن می نامند (نوری دلویی ، ١٣٨٤).

1.Gap Junctioal Intercellular Communication
2.self renewal

٤-١) سلول‌های بنیادی از لحاظ پتانسیل تمایز

همه توان(Totipotent): همه توانی به معنی پتانسیل ایجاد همه نوع سلول برای مجموعه اندام-ها در هر مرحله ازتکوین است. همه توانی بسیار نادراست .در انسان و سایر پستانداران فقط هشت سلول اولیه ایجاد شده از تخم، همه توان هستند (نوری دلویی، ١٣٨٤).

پرتوان (Pluripotent): این سلول‌ها می توانند هر نوع سلولی را در بدن بزرگسالان تولید کنند. سلول‌های بنیادی جنینی، پرتوان هستند. زیرا می توانند به هر نوع سلولی به جز آنهایی که جفت و بند ناف را تشکیل می دهند، تبدیل شوند.

چندتوان(Multipotent): اغلب برای توصیف سلول‌هایی به کار می رود که می توانند به چندین سلول متفاوت، در رده خاصی از سلول‌ها تبدیل شوند. به عنوان مثال انواع سلول‌های خونی یا سلول‌های پوستی.

٥-١) انواع سلول‌های بنیادی

پژوهشگران دونوع از سلول‌های بنیادی جانوری و انسانی را مورد مطالعه قرار می دهند: الف- سلول‌های بنیادی جنیی. ب- سلول‌های بنیادی بالغ. این دو نوع سلول دارای خصوصیات متفاوت از یکدیگر می باشند.

سلول‌های بنیادی جنینی

در سال١٩٨١، دانشمندان موفق به کشف راه‌هایی برای به دست آوردن سلول‌های بنیادی از جنین موش در اوایل مراحل جنینی شدند. سرانجام مطالعه این سلول‌هابرای نزدیک به‌دو دهه، در سال ١٩٩٨دانشمندان را قادر به جدا سازی سلول‌های بنیادی انسان و رشد این سلول‌ها در آزمایشگاه نمود (نوری دلویی، ١٣٨٤). سلول‌های بنیادی جنینی از جنین ٥-٣ روزه مشتق می شوند. این جنین یک توپ توخالی به نام بلاستوسیت[1]است که دارای سه ساختار است:

١-تروفوبلاست[2]: لایه سلولی که بلاستوسیت را احاطه کرده است.

٢-بلاستوسل[3] حفره توخالی درون بلاستوسیت.

٣-توده سلولی درونی: یک گروه تقریبا شامل ٣٠ سلول است که در یک انتهای بلاستوسل قرار دارد. این سلول‌ها همان سلول‌های جنینی هستند که تقسیم شده و تمام سلول‌ها تخصص یافته را که برای تشکیل موجود لازم است تولید می کند. توده داخلی فرد و تروفوبلاست جفت را می سازد(Burdon 2002).

1.blastocyst
2. trophoblast
3. blastocoel

سلول‌های بنیادی بالغ

سلول‌های بنیادی بالغ ،سلول‌های تمایز نیافته‌ای هستند که بین سلول‌های تمایز یافته یک بافت یا اندام وجود دارند و قادرند خود را تجدید کنند و همچنین به سلول‌های تمایز یافته بافت تبدیل شوند. در نتیجه وظیفه آنها بقا و ترمیم بافتی می باشد که در آن یافت می شوند. برخلاف سلول‌های بنیادی جنینی که منشا آنها مشخص است، منشا سلول‌های بنیادی بالغ در یک بافت، نامشخص است. تاریخچه کشف سلول‌های بنیادی بالغ به حدود ٦٠سال پیش برمی‌گردد. در سال ١٩٦٠میلادی، پژوهشگران متوجه شدند که مغز استخوان دارای دو نوع جمعیت سلول بنیادی می‌باشد. سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک[1]که انواع سلول‌های خونی را می سازد. ودیگری سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان[2] که جمعیت سلولی مخلوطی هستند که استخوان، غضروف، چربی و بافت همبند را می سازد. در سال‌های اخیر در مغز نیزسلول‌هایی یافت شدند که قادر به تبدیل به سلول‌های عصبی بوده و سه نوع سلول آستروسیت، الیگودندروسیت و نورون را تولید می کنند. سلول‌های بنیادی بالغ در بسیاری ازبافت‌ها و اندام ها دیده شده اند. یک نکته مهم درباره آن‌ها این است که تعداد بسیار کمی از آن‌ها درهر بافت وجود دارد و در هر بافتی در یک مکان به صورت بدون تقسیم[3] برای سال‌ها وتا زمانی که توسط یک بیماری یا آسیب بافتی دوباره فعال شوند باقی می مانند. بافت‌های بالغ که دارای سلول‌های بنیادی اند شامل مغز، مغز استخوان، خون محیطی، رگ‌های خونی، عضلات اسکلتی، پوست وکبد می باشند. امروزه سعی بر کشت این سلول‌ها برای تولید تیپ‌های سلولی خاص برای درمان بیماری‌های مختلف می باشد (نوری دلویی، ١٣٨٤).

٦-١) تفاوت سلول‌های بنیادی جنینی با سلول‌های بنیادی بالغ

بسته به نوع استفاده، این دو تیپ سلول دارای مزایا و معایبی هستند، برای مثال، توانایی آن‌ها برای تولید تعداد و نوع سلول‌های تمایز یافته از جمله تفاوت‌های آن‌ها محسوب می شود. سلول بنیادی جنینی قادر است به همه انواع سلول‌های بدن تبدیل شود. اما نوع بالغ تنها قادر است به چند نوع سلول آن هم سلول‌های بافتی که از آن منشا گرفته است تبدیل شود. کشت این سلول‌ها درمقیاس وسیع امکان پذیر است. اما تعداد سلول‌های بنیادی بالغ در بافت‌های بالغ محدود است و روش‌های گسترش و افزایش تعداد آن‌ها، در محیط کشت هنوز بهبود نیافته اند. سلول‌های بنیادی بالغ در محیط کشت تمایل به تمایز دارند. به هنگام گسترش کشت آنها، باید مرتب سلول‌های تمایز یافته را جدا کرد زیرا تیپ‌های سلولی خاص و تولیدات آنها ممکن است موجب مهار کشت سلولی شود. درنتیجه تمایزسلول ها موجب انقراض کشت می شود. در واقع پژوهشگران قادر نیستند محیطی دقیقا همانند محیطی که سلول‌های بنیادی در محیط زنده دارند درست کنند. برخلاف سلول بنیادی جنینی که بزرگترین چالش آنها، کنترل تمایز

1 .Hematopoietic STEM cell
2. Bown Marro Mesenchymal Stem cell