بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم پایه

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

رشته زیست شناسی- گرایش سلولی و مولکولی

عنوان

بررسی امکان ماندگاری و تکثیر سلول‌های انسانی در جنین‌های اولیه موش (سویه BALB/c) به کمک ژن‌های گزارشگر

اساتید راهنما

جناب آقای دکتر احمد رضا بهرامی

سرکار خانم دکتر مریم مقدم متین

استاد مشاور

جناب آقای دکتر فرهنگ حداد

تحقیق و تالیف

زهرا حجازی

تابستان ۱۳۹۱

تقدیر و تشکر

سپاس بی کران خدای را که مرا یاری آن داد تا در راهی که قدم نهادم موفق گردم و در این راه پس از او ستایشگر کسانی، هستم که در زلال مهربانیشان مرا رهنما شدند.

از اساتید گرانقدر جناب آقای دکتر احمدرضا بهرامی و سرکار خانم دکتر مریم مقدم متین که با راهنمایی های اندیشمندانه ی خود اینجانب را یاری نموده و نکات مفید و قابل تأملی را بیان داشتند، کمال تشکر و امتنان را دارم.

همچنین از استاد محترم جناب آقای دکتر فرهنگ حداد که به عنوان استاد مشاور پیشنهادهای سودمندی داشته و از هیچ کوششی دریغ نفرمودند، قدردانی می نمایم.

از سرکار خانم دکتر مهناز منصوری و خانم راحله آرام از مرکز ناباروری نوین مشهد و جناب آقای دکتر افلاطونیان و سرکار خانم دکتر آقا رحیمی از مرکز ناباروری یزد که مرا در این مسیر یاری نمودند کمال تشکر را دارم.

از جناب آقای دکتر مهدوی شهری و سرکار خانم دکتر احمدیان که زحمت داوری این پایان نامه را قبول فرمودند سپاس گزارم.

باسپاس از

دوست بسیار عزیزم سرکار خانم شهریاری

جناب آقای حداد ، جناب آقای موسایی، جناب آقای فرشچیان ، جناب آقای صباغی، سرکار خانم فدوی ، سرکار خانم صبوری، سرکار خانم محمودی

و از کلیه دوستانی که مرا در انجام این پروژه یاری رساندند، سپاسگزارم.

تقدیم به پدر و مادر عزیزم

آنان که مهرشان گرمابخش زندگی‌ام و وجودشان امید بودنم است

تقدیم به همسرم و خانواده مهربانش

به پاس دلسوزی‌ها و حمایت‌های بی‌دریغشان

چکیده:

بسیاری از صدمات و بیماری‌های انسانی، ناشی از نارسایی در یک سلول منفرد می‌باشد. درمان با سلول‌های بنیادی یا پیش‌ساز، به دلیل جلوگیری از بروز پاسخ‌های ایمنی ناخواسته، یک رویکرد امید بخش جهت مقابله با این نارسایی‌ها می‌باشد. بنابراین هر قدمی در جهت بهبود شرایط سازگاری سلول‌های پیوند زده شده می‌تواند به عنوان یک موفقیت در زمینه سلول درمانی محسوب شود. در این مطالعه هدف، بررسی بقا و تکثیر سلول های بنیادی مزانشیمی انسانی (hMSCs) در جنین های اولیه موش (سویه BALB/c)، در شرایطی کاملاً زنوگرافیک می باشد. به این منظور، سلول های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی انسانی استحصال شد، تعیین هویت و کشت داده شدند. سلول‌ها با وکتورهای لنتی ویروسی حامل ژن‌های گزارشگر JRed و TurboGFP تراریخت شدند. عملکرد این ژن‌ها توسط میکروسکوپ معکوس فلورسنت تایید شد. سپس به منظور تحریک تخمک گذاری، هورمون های HMG و HCG به موش های ماده، به صورت زیر صفاقی، تزریق و موش های ماده و نر با یکدیگر جفت شدند. پس از نخاعی کردن موش های ماده باردار، با تشریح لوله رحمی، جنین های موش جمع آوری شدند. سلول‌های تراریخته، به تعداد ۴ عدد، به جنین موش، در مرحله دو سلولی، توسط دستگاه میکرومانیپولیتر (Micromanipulator)، در فضای زیر زونا، تزریق شد. به این ترتیب که جنین ها به وسیله پیپت نگهدارنده ویژه، همراه با فشار منفی این سوزن، در موقعیتی که اجسام قطبی قرار دارند، نگه داشته شدند. لایه زونا پلوسیدا در حدود قطر سوزن تزریق به کمک لیزر منفذ دار شد. پیپت تزریق کننده حامل سلول‌ها، به صورت ثابت و آرام در فضای زیر زونا، بین لایه زونا و غشاء بلاستومرها، قرار داده شد و سپس سلول های بنیادی به وسیله ایجاد جریان مثبت سوزن در این فضا آزاد شدند. پس از تزریق به صورت زیر زونایی، جنین ها به مدت ۷۲ ساعت کشت داده شدند. با وجود شرایط زنوگرافیک، hMSCs، در طول این مدت توانستند زنده بمانند، بدون اینکه بیان ژن‌های گزارشگر خاموش شود. همچنین این سلول‌ها درون جنین موش تکثیر یافته و سازگاری موفقیت‌آمیزی را حداقل تا مرحله‌ی تشکیل بلاستوسیست و شکافت لایه زونا نشان دادند.

کلمات کلیدی: hMSCs، وکتور لنتی ویروسی، جنین اولیه موش ، تزریق زیر زونایی سلول، تکثیر سلول

جدول حروف اختصاری بکار رفته

حروف اختصاری بکار رفته	اصطلاح مربوطه	ترجمه فارسی
ASCs	Adult Stem Cells	سلول های بنیادی بالغ
APC	Antigene presenting cell	سلول های ارائه دهنده آنتی ژن
GVO	Germinal Vesicle Oocyte	-
NOA	Non Obstructive Azoospermia	آزو اسپرمی غیر انسدادی
PCG	Polycomb group proteins	-
BMP	Bone Morphogenetic Protein	-
GVHD	Graft vrsus host disease	-
NKC	Natural Killer cell	سلول های کشنده طبیعی
G-CSF	Granulocyte-colony-stimulating factor	-
MLD	Metachoromatic leukodystrophy	-
LSD	Lysosomal storage disease	بیماری های ذخیره لیزوزومی
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle’s Medium	-
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	-
EBs	Embryoid Bodies	اجسام شبه جنینی
ESCs	Embryonic Stem Cells	سلول های بنیادی جنینی
FBS	Fetal Bovine Serum	سرم جنینی گاو
HSCs	Hematopoietic Stem Cells	سلول های بنیادی هماتوپوئیتیک
ICM	Inner Cell Mass	توده داخل سلولی
iPSCs	induced Pluripotent Stem Cells	سلول های بنیادی پرتوان القایی
LIF	Leukemia Inhibitory Factor	-
MEFs	Mouse Embryonic Fibroblats	فیبروبلاست های جنینی موش

MSCs	Mesenchymal Stem Cells	سلول های بنیادی مزانشیمی
hADMSC	Human adipose-drived mesenchymal stem cell	سلول های بنیادی مزانشیمی گرفته شده از بافت چربی انسانی
NSCs	Neural Stem Cells	سلول های بنیادی عصبی
PBS	Phosphate Buffered Salin	-
rpm	rotation per minute	دور در دقیقه
SCNT	Somatic Cell Nuclear Transfer	انتقال هسته سلول سوماتیکی

فهرست مطالب

فصل اول: کلیات

۱-۱ مقدمه ۲

۱-۱-۱ انواع مختلف پزشکی ترمیمی ۳

۱-۱-۱-۱ سلول درمانی ۳

۱-۱-۱-۲ درمان با عوامل رشد ۴

۱-۱-۱-۳ استفاده از پروتئین‌های نوترکیب ۴

۱-۱-۱-۴ استفاده از مولکول‌های کوچک ۴

۱-۱-۱-۵ مهندسی بافت ۵

۱-۱-۱-۶ ژن درمانی ۵

۱-۲ سلول درمانی ۵

۱-۲-۱ تاریخچه سلول درمانی ۵

۱-۲-۲ منابع سلولی قابل دسترس در سلول درمانی و مشکلات استفاده از آن ها ۷

۱-۲-۲-۱ سلول‌های بنیادی بالغ (ASCs) ۷

۱-۲-۲-۱-۱ سلول‌های بنیادی خونی (HSCs) ۸

۱-۲-۲-۱-۲ سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) ۸

۱-۲-۲-۱-۳ سلول‌های بنیادی عصبی (NSCs) ۱۰

۱-۲-۲-۲ سلول‌های بنیادی جنینی ۱۰

۱-۳ برنامه ریزی مجدد سلولی ۱۱

۱-۳-۱ انواع روش‌های القاء برنامه ریزی مجدد ۱۲

۱-۳-۱-۱ انتقال هسته سلول سوماتیک (SCNT) ۱۲

۱-۳-۱-۲ ادغام سلولی ۱۴

۱-۳-۱-۳ استفاده از عصاره سلول‌های پر توان ۱۵

۱-۳-۱-۴ تولید سلول‌های پرتوان به وسیله فاکتورهای مشخص ۱۶

۱-۳-۱-۴-۱ انتخاب سلول مناسب به منظور ایجاد سلول‌های iPS ۱۸

۱-۳-۱-۴-۲ ایجاد سلول‌های iPS، از رده‌های مختلف سلولی حامل بیماری خاص ۲۱
۱-۳-۱-۴-۳ الگوی بیانی فاکتورهای بر نامه ریزی مجدد: ۲۵
۱-۳-۱-۴-۴ مولکول‌های دخیل در برنامه‌ریزی مجدد و پرتوانی ۲۶
۱-۳-۱-۴-۵ بررسی تغییرات اپی ژنتیک در برنامه نویسی مجدد ۲۸
۱-۳-۱-۴-۶ چالش‌های موجود در استفاده‌های درمانی از iPSCs ۳۰
۱-۴ ظرفیت جنین‌های اولیه موش، به عنوان ریز محیط پیشنهادی جهت القای تمایززدایی، در یک مدل زنوگرافت در شرایط *ex vivo* ۳۳
۱-۴-۱ مراحل تکوین جنین موش، از لقاح تا لانه گزینی ۳۳
۱-۴-۲ ظرفیت و موقعیت مولکولی جنین اولیه موش ۳۶
۱-۵ سلول‌های بنیادی مزانشیمی گرفته شده از بافت چربی انسانی (hADMSCs)، منبع سلولی انتخابی جهت بررسی تکثیر و ماندگاری در جنین‌های اولیه موش ۳۷

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱ تجهیزات و مواد مورد استفاده ۴۰
۲-۱-۱ تجهیزات مورد استفاده ۴۰
۲-۱-۲ مواد و وسایل مورد استفاده ۴۱
۲-۲ استحصال و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی انسانی ۴۳
۲-۲-۱ جمع آوری بافت چربی ۴۳
۲-۲-۲ شستشوی بافت چربی ۴۳
۲-۲-۳ هضم کلاژنازی ۴۳
۲-۲-۴ جدا کردن سلولهای تک هستهای (MNCs) از بافت چربی ۴۳
۲-۲-۵ تعیین خلوص سلول‌های جمع آوری شده ۴۴
۲-۳ پاساژ سلولی ۴۵
۲-۳-۱ پاساژ سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۴۶
۲-۳-۲ کشت و پاساژ سلول‌های HEK 293T ۴۶
۲-۴ انجماد سلولی ۴۷
۲-۵ خروج سلول‌های فریز شده از انجماد ۴۷
۲-۶ محیط کشت باکتری ۴۸

۲-۶-۱ تهیه محیط کشت مایع ۴۸
۲-۶-۲ تهیه محیط کشت جامد ۴۸
۲-۷ کشت باکتری ۴۸
۲-۷-۱ کشت باکتری در محیط مایع ۴۸
۲-۷-۲ کشت باکتری روی محیط جامد ۴۹
۲-۸ سیستم انتقال ژن ۴۹
۲-۹ ترانسفورماسیون ۵۱
۲-۹-۱ مستعد سازی باکتری‌ها ۵۱
۲-۹-۲ ترانسفرم کردن باکتری‌های مستعد شده ۵۲
۲-۱۰ اسخراج پلاسمید و تعیین کیفیت آن ۵۳
۲-۱۰-۱ استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی در حجم کوچک (mini prep) ۵۳
۲-۱۰-۲ تهیه ژل آگارز ۵۴
۲-۱۰-۳ الکتروفورز پلاسمیدهای استخراج شده ۵۵
۲-۱۱ ترانفکشن و تولید ویروس‌های نوترکیب ۵۵
۲-۱۱-۱ ترانسفکشن سلول‌های HEK 293T ۵۶
۲-۱۱-۲ ترانسداکشن سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی انسانی ۵۷
۲-۱۲ مراحل استخراج جنین از موش و کشت آن ۵۷
۲-۱۲-۱ القاء تخمک گذاری و جفت گیری ۵۸
۲-۱۲-۲ نخاعی کردن موش ماده باردار و جدا کردن لوله رحمی ۵۸
۲-۱۲-۳ کشت جنین موش ۶۱
۲-۱۳ تزریق زیر زونایی سلول‌های MSCs بااستفاده از میکرومانیپولیتر ۶۱

فصل سوم: نتایج

۳-۱ استحصال و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۶۵
۳-۱-۱ نتایج خلوص سلول‌های گرفته شده از بافت چربی ۶۵
۳-۲ نتیجه استخراج پلاسمید ۶۶
۳-۳ نشان دار کردن مولکولی hADMSCs با مارکرهای گزارشگر GFP و JRed ۶۷
۳-۳-۱ تولید ذرات ویروسی در سلول‌های میزبان HEK 293T ۶۷
۳-۴ ترانسداکشن سلول‌های hADMSCs ۶۷

۳-۵ استخراج جنین موش ۶۸
۳-۵-۱ جدا کردن لوله رحمی ۶۸
۳-۵-۲ نتیجه به استخراج جنین از لوله‌ی رحمی موش ۶۹
۳-۶ انتقال hADMSCs به درون جنین اولیه موش ۷۰
۳-۶-۱ تزریق زیر زونایی ۷۰
۳-۶-۲ ماندگاری و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی در جنین اولیه موش ۷۱

فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری

۴-۱ بهینه سازی استحصال موش ۷۵
۴-۲ توسعه روش تزریق سلول‌های خارجی در فضای زیر زونا ۷۶
۴-۳ ماندگاری و تکثیر سلول‌های تزریقی در مدل زنوگرافت و تداوم بیان ژن‌های گزارشگر ۷۶
۴-۴ مسیرهای پیام رسانی دخیل در سلول‌های تکثیر شده ۷۷
۴-۵ ظرفیت مولکولی جنین در القاء پدیده خودنوزایی در سلول‌های تزریق شده در شرایط زنوگرافت ۷۸
۴-۶ پیشنهادات ۸۲
منابع ۸۳

فهرست شکل‌ها

شکل ۱- ۱: مراحل تکاملی جنین اولیه موش (Wang and Dey, 2006) ۳۳
شکل ۱- ۲: جنین در مرحله دو سلولی (درشت نمایی ۴۰۰X) ۳۴
شکل ۱- ۳: جنین هشت سلولی (درشت نمایی ۴۰۰X) ۳۴
شکل ۱- ۴: جنین (درشت نمایی ۴۰۰X) چهار سلولی ۳۴
شکل ۱- ۵: جنین در اواخر مرحله‌ی مرولا (درشت نمایی ۴۰۰X) ۳۵
شکل ۱- ۶: شکافته شدن لایه زونا (درشت نمایی ۴۰۰X) ۳۶
شکل ۱- ۷: بلاستوسیست (درشت نمایی ۴۰۰X) ۳۶

شکل ۲- ۱: نقشه وکتور pLEX ۵۰
شکل ۲- ۲: نقشه وکتور psPAX2 ..... ۵۰
شکل ۲- ۳: نقشه وکتور Pmd2.G ۵۱
شکل ۲- ۴: اجسام چربی در دو طرف ستون مهره‌ها قابل مشاهده می‌باشد (فلش ها) ۵۹
شکل ۲- ۵: جدا کردن لوله رحمی ۵۹
شکل ۲- ۶: محیط کشت Hams F1 ، حاوی قسمتی از لوله رحمی ۵۹
شکل ۲- ۷: محیط کشت قطره ای ۶۰
شکل ۲- ۸: پوشیده شدن سطح قطره ها با Mineral oil ۶۰
شکل ۲- ۹: پیپت دهانی، جهت جابجایی جنین‌ها ۶۱
شکل ۲- ۱۰: قسمت‌های مختلف دستگاه Micromanipulator ۶۳

شکل ۳- ۱: مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در طی کشت ۶۵
شکل ۳- ۲: بررسی قابلیت تمایز سلول‌های hADMSCs به سلول‌های چربی و استخوانی ۶۶
شکل ۳- ۳ الگوی حرکتی پلاسمیدهای استخراج شده ۶۶
شکل ۳- ۴: نتایج حاصل از ترانسداکشن سلول‌های بنیادی مزانشیمی با ناقلین ویروسی ۶۸
شکل ۳- ۵: مراحل اولیه جداسازی لوله رحمی ۶۸
شکل ۳- ۶: نمایش بخشی از لوله رحمی که به صورت شفاف ۶۸
شکل ۳- ۷: مراحل انتهایی تشریح لوله‌ی رحمی ۶۹
شکل ۳- ۸: جنین‌های بدست آمده همراه با سلول‌های کمولوس اطراف آن از لوله‌ی رحمی موش ۶۹

شکل ۳- ۹: جنین‌های قرار داده شده در محیط کشت حاوی هیالورونیداز ۶۹
شکل ۳- ۱۰: تزریق زیر زونایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی..... ۷۱
شکل ۳- ۱۱: میکروگراف‌های حاصل از جنین‌های موش که حامل سلول‌های بنیادی نشان‌دار شده انسانی می‌باشد..... ۷۳

فصل اول

کلیات

۱-۱ مقدمه

پیشرفت‌های اخیر در علم پزشکی هرچند توانسته طول عمر بیماران را به طور محسوسی افزایش دهد، اما به رغم تحقیقات صورت گرفته جهت درمان بیماری‌های تحلیل رونده[1] بافتی مانند بیماری‌های قلبی ناشی از سکته، بیماری‌های عصبی و بیماری‌های استخوانی و غضروفی، هنوز درمان قطعی ارائه نشده است. در این نوع بیماری‌ها عضو مبتلا بخشی از عملکرد خود را به علل مختلفی از دست می‌دهد. از عوامل موثر در این چنین بیماری‌هایی می‌توان به کهولت سن، حوادث عروقی، تغذیه، عوامل محیطی و ژنتیکی اشاره کرد. افراد مبتلا به چنین بیماری‌هایی در حال حاضر انتخاب‌های کمی برای درمان دارند که شامل موارد زیر می‌باشد:

- دارو درمانی طولانی مدت، که اغلب منجر به کنترل بیماری می‌شود ولی آن را معالجه نمی‌کند.
- پیوند اعضا، که محدودیت‌های عمده آن اندک بودن تعداد اعضا اهدا شده و در مواردی رد پیوند است.

بر همین اساس در سال ۲۰۰۷ میلادی، پزشکی ترمیمی[2] که عبارت است از جایگزینی بافت‌های از دست رفته با بافتی زنده و دارای عملکرد مناسب، به عنوان یکی از شاخه‌های علم پزشکی معرفی شد. در این علم، پزشکان به جای استفاده از دارو برای تحریک سازوکارهای ترمیمی موجود در بدن، از سلول و به خصوص سلول‌های بنیادی[3] (SCs) برای جبران سلول‌های از دست رفته بافتی و از مهندسی بافت[4] برای تولید بافت در آزمایشگاه و پیوند آن به جای بافت آسیب دیده استفاده می‌کنند.

هدف پزشکی ترمیمی، احیا مجدد عملکرد عضو آسیب دیده با جایگزینی آن با اجزاء زنده است. البته این ایده جدیدی نیست و اولین پیوند مغز استخوان برای احیا عملکرد بافت خون‌ساز در سال ۱۹۵۶ میلادی انجام شده است. یکی از نکات کلیدی در این فرآیند، جلوگیری از رد پیوند توسط سیستم ایمنی است. در سال ۱۹۵۶، پزشکان برای حل این مشکل، از پیوند دوقلوهای یکسان استفاده نمودند. در اواخر دهه ۶۰ و

[1] Degenerative diseases
[2] Regenerative medicine
[3] Stem Cells
[4] Tissue engineering

اوایل دهه ۷۰ آنها توانستند این مشکل را با یکسان سازی نوع بافت دهنده و گیرنده تا اندازه زیادی حل نمایند و این به آن معنی بود که گیرنده می‌توانست سلول‌ها را از یک فرد غیر فامیل که از نظر بافتی با بیمار یکسان است نیز دریافت نماید. اما گرایش اخیر به پزشکی ترمیمی بیشتر ناشی از شناخت و تعریف سلول‌های بنیادی و همچنین مهندسی بافت است (Lescaudron, *et al.*, 2012).

۱-۱-۱ انواع مختلف پزشکی ترمیمی

۱-۱-۱-۱ سلول درمانی[1]

الف) درمان با استفاده از سلول‌های خود بیمار

در روش‌های درمانی که از سلول‌های خود بیمار برای ترمیم اعضا استفاده می‌شود، نوع پیوند، پیوند اتولوگ[2] و یا پیوند خودی نامیده می‌شود. به رغم نتایج اولیه امیدوار کننده در برخی مطالعات انجام گرفته، لازم است که برای حصول نتیجه نهایی مطالعات بالینی با تعداد نمونه‌های بیشتری انجام شود (Komanduri, *et al.*, 2006).

ب) درمان با استفاده از سلول‌های دهنده غیرخودی

در روش‌های درمانی که به جای سلول‌های خود بیمار از سلول‌های یک فرد دیگر استفاده می‌شود، نوع پیوند، پیوند آلوژن[3] و یا پیوند غیرخودی نامیده می‌شود. پیوند مغز استخوان در بیماران مبتلا به تالاسمی و یا بعضی از انواع سرطان‌های خون و همین طور پیوند خون بند ناف، در بیماران مبتلا به سرطان خون، مثال‌هایی از این نوع درمان است. سلول‌های بنیادی جنینی[4] (ESCs) غیرخودی نیز در سال‌های اخیر در چندین مطالعه بالینی در کشورهایی مانند ایالات متحده آمریکا و انگلستان، مورد استفاده قرار گرفته

[1] Cell therapy
[2] Outologue
[3] Allogeneic
[4] Embryonic Stem Cells

است. پیوند آلوژن چالش‌های بیشتری را در مقایسه با پیوند اتولوگ ایجاد می‌نماید که یکی از اصلی‌ترین چالش‌ها در این زمینه مشکلات رد پیوند توسط سیستم ایمنی بدن است (Komanduri, *et al.*, 2006).

۱-۱-۱-۲ درمان با عوامل رشد

سلول‌های بدن برای رشد و تمایز نیازمند دریافت علائمی از محیط اطراف هستند که این علائم می‌تواند اغلب به واسطه مواد و هورمون‌های موجود در محیط خارج سلولی ایجاد شود. حضور این عوامل، علاوه بر افزایش بقاء سلول‌های باقی‌مانده، موجب رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی بزرگسال در موضع نیز می‌گردد که این نیز به نوبه خود باعث ترمیم در عضو می‌گردد.

۱-۱-۱-۳ استفاده از پروتئین‌های نوترکیب[1]

بخش عمده‌ای از مواد محیط خارج سلولی که علائم تکثیری و تمایزی را موجب می‌شوند، ماهیت پروتئینی دارند. این پروتئین‌ها روی گیرنده‌های سلولی قرار گرفته و با ارسال پیام به هسته باعث تغییر در عملکرد سلول می‌شوند. ایجاد مدل با استفاده از سلول‌های بنیادی در آزمایشگاه، کمک شایانی به شناخت مولکول‌هایی که موجب افزایش ترمیم اعضاء بدن می‌شوند، کرده است (Wurm, 2004).

۱-۱-۱-۴ استفاده از مولکول‌های کوچک[2]

برای ارسال پیام توسط پروتئین‌ها و یا عوامل رشد تنها بخش کوچکی از مولکول که از نظر ساختار فضایی قرینه گیرنده است، در جایگاه اتصال قرار گرفته و پیام را ارسال می‌نماید. تقلید این ساختار توسط مولکول‌های کوچکی که اغلب ماهیت آلی و یا معدنی دارند، می‌تواند هزینه‌های تولید را در این بخش به طور چشمگیری کاهش دهد، چرا که تولید پروتئین‌های نوترکیب به فناوری و امکانات ویژه‌ای نیازمند است که اغلب هزینه‌های بسیار بالایی را دارند.

[1] Recombinant proteins
[2] Small molecules

۱-۱-۱-۵ مهندسی بافت

مهندسی بافت در تلاش است که با ایجاد تغییرات روی سلول‌ها و یا بافت‌ها در محیط آزمایشگاهی از آن‌ها برای ترمیم اعضاء آسیب دیده و یا از دست رفته استفاده نماید. یکی از اهداف اصلی این علم، تولید بافت زنده در آزمایشگاه برای پیوند است. در این روش سلول‌ها روی داربستی قرار می‌گیرند که این داربست ساختاری شبیه بافت مورد نظر در بدن را داشته و باعث ایجاد فضایی سه‌بعدی و همچنین ارسال پیام‌ها برای رشد و تکثیر سلول‌ها می‌گردد (Nugent and Edelman, 2003).

۱-۱-۱-۶ ژن درمانی[1]

تولید پروتئین‌ها و عوامل رشد در سلول‌ها توسط ترجمه رمزهای ژنتیکی صورت می‌گیرد. اختلال در این رمزها به واسطه جهش و یا کاهش بیان آنها می‌تواند تاثیر به سزایی در روند ترمیم اعضا داشته باشد. از همین رو محققان سال‌ها است که تلاش می‌کنند با انتقال کدهای ژنتیکی سالم به داخل سلول‌ها آنها را وادار به تولید و ترشح عوامل رشد و یا پرتئین‌های ساختاری نمایند که تا کنون چندان موفق نبوده است. در سال‌های اخیر با معرفی سلول‌های بنیادی و انتقال این رمزها به این سلول‌ها، امید استفاده از این روش را افزایش داده است (Lipinski, *et al.*, 2012).

۱-۲ سلول درمانی

۱-۲-۱ تاریخچه سلول درمانی

تئوری سلول درمانی در قرن ۱۶ توسط Phillippus Aureolu Paracelsus (1493-1541)بیان شد.

قلب، قلب را التیام می‌بخشد. شش، شش را، کبد، کبد را و هم‌سان، هم‌سان را [2].

[1] Gene therapy
[2] Heart heals heart, lung heals lung, spleen heals spleen, like cures like

سلول درمانی موضوع جدیدی نیست. استفاده از بافت‌های حیوانی به منظور درمان بیماری‌های مربوط به انسان از زمان‌های قدیم وجود داشته است و در رساله پزشکی مصر باستان، Ebers، شواهدی از این قبیل درمان‌ها وجود دارد.

منشأ سلول‌درمانی در اوایل ۱۸۰۰ قابل ردیابی می‌باشد. هنگامی که دکتر (1817-1894) Charles-Edward Brown-Sequard تلاش کرد تا با تزریق عصاره بیضه حیوانی بتواند زندگی انسان را طولانی‌تر کند، به طوری که این عصاره در بین دانشمندان به عنوان اکسیر Brown-Sequard شناخته می‌شد.

سلول درمانی کنونی به وسیله Dr. Niehans در سال ۱۹۳۱ به تکامل رسید.

در یک عمل جراحی که در آن غده‌های پاراتیروئید بیماری صدمه دیده بود، بیمار دچار تشنج شد و نزدیک بود جان خود را از دست بدهد. دکتر Niehans، زمان کافی برای کاشت غده را نداشت و بنابراین محلولی از سلول‌های پاراتیروئید گوساله را برای تزریق آماده کرد. نتیجه این تزریق برگشت بیمار به زندگی بود.

Jean Dausset طی آزمایشات خود توانست آنتی‌ژن‌های HLA را در سطح سلول شناسایی کند. با علم به اینکه افراد با دارا بودن الگوی آنتی‌ژن HLA مشابه، این امکان وجود دارد که پاسخ ایمنی در فرد گیرنده بروز نکند، پیوند مغز استخوان به صورت آلوژنیک گسترش یافت.

در سال ۱۹۸۸ برای اولین بار سلول‌های بنیادی خون بند ناف[1] با موفقیت، به منظور تولید سلول‌های خونی و ایمنی به فردی که دچار کم‌خونی فانکونی[2] بود پیوند زده شد.

در سال ۱۹۹۷ پیوند سلول‌های بنیادی بند ناف به یک فرد بالغ که از لوسمی میلوژنیک رنج می‌برد صورت گرفت که گسترش این سلول‌ها در شرایط *ex vivo* و خارج از بدن صورت پذیرفت .

[1] Umbilical cord stem cells
[2] Fanconi anemia