وزارت علوم تحقیقات و فناوری

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

پایان نامه کارشناسی ارشد

رشته سلولی و مولکولی

انتقال ژن PDX1 به سلولهای بنیادی مزانشیمی به منظور تولید سلولهای بتای پانکراس مولد انسولین

نگارش

سمیرا طالبی

استادان راهنما

دکتر احمد آل یاسین ،دکتر مسعود سلیمانی

استادان مشاور

دکتر محمد معصومی، دکتر سهیلا سهیلی

بهمن ۱۳۸۹

بسم الله الرحمن الرحيم

تقدیم به

پدر و مادر عزیزم

و

خواهر مهربانم

تقدیر و تشکر:

سپاس و ستایش خداوند مهربان و عزوجل را که با لطف و رحمت بی دریغش انجام مراحل این پژوهش را برایم میسر ساخت.

با تشکر و قدردانی

از استاد راهنما، جناب آقای دکتر احمد آل یاسین که با راهنمایی های سودمند و دلسوزانه خود در انجام این پروژه کمک های شایانی را رسانده اند و من از ایشان درس تواضع و فروتنی در زندگی را نیز به خوبی آموخته ام. از جناب آقای دکتر مسعود سلیمانی به خاطر راهنمایی های ارزشمندشان کمال تشکر را دارم. در اینجا لازم می بینم که از جناب آقای دکتر محمد معصومی و سرکار خانم دکتر سهیلا سهیلی که زحمت مشاوره اینجانب را در این پایان نامه عهده دار بودند، تشکر و قدر دانی کنم. همچنین از کلیه دوستان و هم گروهی های خود در آزمایشگاه ژنتیک پزشکی و دوست عزیزم الهام قاضی زاده و دیگر دوستان در پژوهشگاه ملی و مهندسی ژنتیک و زیست فناوری که مرا در انجام پایان نامه یاری نمودند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌کنم.

چکیده فارسی

یک روش موثر برای درمان دیابت نوع اول که در اثر نقص سلولهای بتای جزایر لانگرهانس ایجاد می شود، انتقال بافت پانکراس سالم به افراد دیابتی می باشد. ولیکن کمبود دهنده ی بافت مناسب، کاربرد آن را کاهش می دهد. لذا سلولهای بنیادی مزانشیمی (MSCs) جدا شده از مغز استخوان می تواند منبع مناسبی برای درمان دیابت نوع اول باشد. در این تحقیق بررسی امکان تمایز سلولهای مزانشیمی به سلولهای تولید کننده انسولین با انتقال ژن PDX1 توسط لنتی ویروس به سلولهای مزانشیمی انجام گردید. پروتئین PDX1 یک فاکتور رونویسی است که در تکوین پانکراس و تنظیم بیان ژن انسولین نقش کلیدی دارد. این مطالعه در نمونه حیوانی رت به انجام رسید، ابتدا سلولهای MSCs از رت جدا شده و هویتشان توسط فلوسیتومتری اثبات گردید. همچنین جهت تائید پتانسیل چند توانی آنها، به وسیله ی محیط کشتهای تمایزی به سمت آدیپوسیت و استئوسیت تمایز داده شدند. سپس وکتور لنتی ویروسی حاوی PDX1 در سلولهای ۲۹۳ ساخته شده و به سلولهای MSC ترانسفکت گردیدند. سلولهای MSC- PDX1+ توسط مارکر پرومایسین از سایر سلولهای جدا گردیدند. بیان mRNA و پروتئین PDX1 به وسیله RT-PCR و ایمنوفلورسانس نشان داده شد. همچنین، علاوه بر افزایش دادن بیان PDX1 ، محیط تمایزی نیز برای بهینه سازی تمایز سلولهای مزانشیمی به سلولهای بتای جزایر لانگرهانس استفاده گردید. بیان مارکرهای خاص سلولهای جزیره لانگرهانس پانکراس شامل glut2 ،pdx1, ngn3 و insulin با RT-PCR کمی سنجیده شد. نتایج حاصل از PCR کمی، بیان بالایی را برای ژنهای مارکر جزایر لانگرهانس نشان دادند. سلولهای MSC- PDX1+ و سلولهای MSC تیمار شده با مواد شیمیایی، مارکر سلولهای اگزوکرین پانکراس(p48) را بیان نکردند . بنابراین، نتایج بدست آمده نشان می دهند که سلولهای بنیادی مزانشیمی میتوانند به عنوان یک منبع قابل دسترس برای درمان بیماری دیابت نوع یک موثر واقع شوند.

کلمات کلیدی: سلولهای بنیادی مزانشیمی، سلولهای بتای پانکراس، PDX1 ، لنتی ویروس

فهرست مطالب

فصل اول ۱

مقدمه و مروری بر منابع ۱

مقدمه ۲

۱- سلولهای بنیادی ۵

۱-۱-سلول های بنیادی مرانشیمی ۸

۲- کاربرد ویروس ها درعرصه بیوتکنولوژی ۱۵

۲-۱- لنتی ویروس ها ۱۷

۳-پانکراس ۲۳

۳-۱- عملکرد پانکراس ۲۳

۳-۱-۱- اندوکرین ۲٤

۳-۱-۲- اگزوکرین ۲٤

۳-۳- تکوین پانکراس ۲٦

۳-۳-۱- آبشار بیان ژن ها در تکوین پانکراس ۲٦

۳-۳-۲- شکل گیری پانکراس ۲٦

٤- فاکتور رونویسی PDX1 (pancreatic and duodenal home box1) ۳۰

٤-۱- عملکرد PDX1 ..... ۳۰

٤-۲- بالغ شدن سلولهای بتای پانکراس ۳۰

٤-۳- شبکه رونویسی ۳۰

۵- انسولین ۳۱

۵-۱- ژن انسولین ۳۳

۵-۱-۱- تنظیم ژن انسولین ۳۳

۵-۲- ساختمان پروتئین انسولین ۳٤

۵-۳- فرم های انسولین ۳۵

۵-٤- ترشح و آزاد سازی انسولین ۳٦
۵-۵- سیگنال سلولی انسولین ۳۷
۵-٦- سیگنال انسولین ۳۸
۵-۷- اثرات فیزیولوژیک انسولین ۳۸
۵-۸- تجزیه انسولین ۳۹
۵-۹- بیماری ها و سندرم ها ۳۹
۵-۱۰- تاریخچه ٤۰
فصل دوم ٤۱
مواد و روش ها ٤۱
مواد و وسایل استفاده شده در این پروژه ٤۲
۱-جداسازی سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان از رت ٤۵
۱-۱- نحوه جداسازی و کشت سلول های بنیادی مزانشیمی از رت ٤٦
۱-۲- تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به سلولهای استئوبلاست ۵۰
۱-۳- تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به سلول های آدیپوسیت ۵۲
۲- کشت سلولهای HEK-293T ۵۳
۳- تولید لنتی ویروس نوترکیب دارای ژن PDX1 ..... ۵٤
۳-۲- ترانسفورماسیون ۵۷
۳-۳- استخراج پلاسمیدهای psPAX2، Pmd2G و LV-105-PDX1 (Maxiprepation) ۵۸
۳-٤- هضم آنزیمی کلون ژن PDX1 در وکتور Lv105 ..... ٦۰
۳-۵- ترنسفکشن با تولید لنتی ویروسهای نوترکیب در رده سلولی ۲۹۳ ..... ٦۱
۳-٦-اثبات ساخته شدن ویروس نوترکیب در رده ی سلولی ۲۹۳ ..... ٦٤
۳-٦-۱- استخراج DNA از سلولهای ۲۹۳ ..... ٦۵
۳-٦-۲- استخراج RNA ٦٦
۳-٦-۳- سنتز cDNA از RNA استخراج شده از سلولهای ۲۹۳ ..... ٦۸
۳-٦-٤- واکنش PCR و RT-PCR برای ژن پوروماپسین و **PDX1** ٦۹

۳-٦-٥- الکتروفورز محصولات PCR ۷۲
۳-۷-جمع آوری و تغلیظ ویروس ۷۲
٤- انتقال ژن PDX1 به سلولهای مزانشیمی مغز استخوان (MSCs) ۷٤
٤-۲- تهیه منحنی مرگ و میر سلولهای بنیادی مزانشیمی در حضور پرومایسین ۷٥
٤-۳- انتخاب کردن سلولهای MSC بیان کننده PDX1 ..... ۷٥
٤-٤- استخراج RNA از سلولهای MSC اینفکت شده ۷٦
٥-گرفتن بافت پانکراس از رت ۷٦
٥-۱- استخراج RNA از بافت پانکراس ۷۷
٦- بررسی کمی بیان ژنها ۸٤
٦-۱- بررسی کمی بیان ژن مبنای Gapdh ۸۷
٦-۲- بررسی کمی بیان ژن های مارکر پانکراس ۹۰
۷- تست Immuno Fluorescent برای پروتئین PDX1 و انسولین ۸٥
۸- تست Electrochemiluminensce (ELC) برای ترشح انسولین ۸٦
فصل سوم ۸۸
نتایج ۸۸
۱-کشت سلولهای بنیادی مزانشیمی و تعیین هویتشان ۸۹
۱-۱- نتایج حاصل از بررسی های مورفولوژیک سلولهای مزانشیمی در حال تکثیر ۸۹
۱-۲- نتایج حاصل از تعیین مارکرهای سطحی سلولهای بنیادی مزانشیمی رت: ۹۰
۱-۳- نتایج حاصل از تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی رت به رده مزودرمی ۹۲
۱-۳-۱- نتایج حاصل از تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی رت به آدیپوسیت ۹۲
۱-۳-۲- نتایج حاصل از تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی رت به استئوسیت ۹۳
۲- ساختن لنتی ویروس نوترکیب دارای ژن PDX1 ..... ۹۳
۲-۱- هضم آنزیمی وکتور لنتی ویروس نوترکیب LV-105 حاوی PDX1 ..... ۹٤
۲-۲-نتایج حاصل از تکثیر پلاسمیدهای لنتی ویروسی ۹٤
۲-۳- اثبات ساخته شدن لنتی ویروس نوترکیب در سلولهای ۲۹۳ ..... ۹٥

۲-۳-۱- PCR و RT-PCR ژن PDX1 ..... ۹۵
۳-نتایج حاصل از infection سلولهای MSC جدا شده از رت ۹۷
۳-۱- RT-PCR ۹۸
٤-تمایز سلول های MSC به سلول های شبه پانکراس با محیط تمایزی ۹۹
٤- بررسی اثر overexpression ژن PDX1 در سلولهای MSC ۹۹
٤-۱- RT-PCR کمی ۹۹
٥- تست Immunofluorescence(IF) برای پروتئین PDX1 ..... ۱۱۳
٦- بررسی بیان انسولین در اثر overexpression ژن PDX1 ..... ۱۱٥
۷- نتایج حاصل از بررسی ترشح انسولین ۱۱٦
فصل چهارم ۱۱۷
بحث و نتیجه گیری ۱۱۷
٤-۱- ساخت لنتی ویروس ۱۱۸
٤-۲- بیان ژن PDX1 ..... ۱۱۸
٤-۳- طول مدت بیان PDX1 ..... ۱۱۹
٤-٤- بالا بودن کارایی ترانسداکشن سلولهای مزانشیمی ۱۱۹
٤-٥- بررسی عملکرد PDX1 در سلولهای بنیادی مزانشیمی ۱۱۹
پیشنهادات ۱۲۱
فصل پنجم ۱۲۲
منابع ۱۲۲

.

فهرست اشکال

تصویر ۲-۱- ساختار ژنتیکی لنتی ویروس ها (ویروسHIVI) ۱۸

تصویر ۲-۲- طراحی وکتور نوترکیب لنتی ویروس ۲۱

شکل ۳-۱- پانکراس ۲۲

شکل ۳-۲- پانکراس مهره داران ۲٤

شکل۳-۳- یک مدل ساده برای فاکتورهای رونویسی موثر در تکوین پانکراس..... ۲۸

شکل ۵-۱- سیکل انسولین. ۳۲

شکل۵-۲- فرم های انسولین ۳۵

شکل ۵-۳- توالی اسید آمینه انسولین ۳۵

شکل ۵-٤- هورمون انسولین ۳٦

شکل ۳-۱- نقشه وکتور، ژن ها و محل قرارگیری آن در پلاسمیدPmd2G ۵۵

شکل ۳-۲- نقشه وکتور، ژن ها و محل قرارگیری آن در پلاسمیدpsPAX2 ..... ۵٦

شکل۳-۳- مراحل ترانسفکشن ٦٤

شکل ۷-۱- منحنی استاندارد برای gapdh..... ۸۳

تصویر ۱-۱- کشت سلولهای بنیادی مغز استخوانرت..... ۹۰

تصویر ۱-۲ - نتایج حاصل از آنالیز فلوسیتومتری سلولهای MSC ۹۱

تصویر ۱-۳- تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی رت به ادیپوسیت ۹۲

تصویر ۱-٤ - تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی رت به استئوسیت ۹۳

تصویر ۲-۱- محصول هضم آنزیمی وکتور ترانسفر لنتی ویروسی ۹٤

تصویر۲-۲- نتیجه استخراج پلاسمید ۹۵

تصویر ۲-۳- محصول PCR و RT-PCR ژنPDX1 ..... ۹٦

تصویر ۲-٤- محصول PCR و RT-PCR ژن مقاومت به پرومایسین ۹٦

تصویر ۳-۱- سلول ها ی MSC آلوده نشده و شده با ویروس ۹۷

تصویر ۳-۲- محصول استخراج RNA و سنتز cDNA ۹۸

تصویر۳-۳- محصول RT-PCR ژن PDX1 ..... ۹۸

شکل ٤-١- نتایج PCR کمی ژن PDX1 ..... ۱۰۰

شکل ٤-٢-نتایج بررسی کمی ژن ngn3 ..... ۱۰۲

شکل ٤-٣-نتایج بررسی کمی ژن Glucagon ۱۰٤

شکل ٤-٤-نتایج بررسی کمی ژن Glut2 ..... ۱۰٦

شکل ٤-٥-نتایج بررسی کمی ژن Insulin1 ..... ۱۰۹

شکل ٤-٧-نتایج بررسی کمی ژن P48 ..... ۱۱۰

شکل ٤-٨-نتایج بررسی کمی ژن Gapdh ۱۱۲

شکل٥-١- تست IF برای پروتئین PDX1 ..... ۱۱٤

شکل ٦-١- تست IF برای پروتئین انسولین ۱۱٥

شکل ٧-١- میزان ترشح انسولین ۱۱٦

فهرست جداول

جدول ١-١- مثال هایی از نام های مختلف MSC ۹

جدول ١-٢- سلول های بنیادی مزانشیم انسانی و رت ۱۲

جدول ٣-١ - آنزیم های تولید شده توسط پانکراس ۲٤

جدول٥-١- توالی تنظیمی و فاکتورهای متصل شونده به آنها برای ژن انسولین ۳٤

جدول ٣-٢-١- مواد ومقادیر آنها برای PCR پرومایسین ۷۱

جدول ٣-٢-٣- توالی پرایمر های پرومایسین و PDX1 ..... ۷۲

جدول ٦-١- ترکیبات برای هر واکنش ۸۲

جدول٦-٢- زمان و دمای برای ژن خانه دار gapdh ۸۲

جدول٦-٣- پرایمرها و طول قطعات ۸٤

جدول ٤-١- مقادیر Ct های گزارش شده توسط PCR کمی برای PDX1 ..... ۱۰۱

جدول ٤-٢- مقادیر Ct های گزارش شده توسط PCR کمی برای ngn3 ..... ۱۰۳

جدول ٤-٣- مقادیر Ct های گزارش شده توسط PCR کمی برای Glucagon ۱۰٥

جدول ٤-٤- مقادیر Ct های گزارش شده توسط PCR کمی برای Glut2 ..... ۱۰۷
جدول ٤-٥- مقادیر Ct های گزارش شده توسط PCR کمی برای Insulin ۱۰۹
جدول ٤-٧- مقادیر Ct های گزارش شده توسط PCR کمی برای P48 ..... ۱۱۱
جدول ٤-٨- مقادیر Ct های گزارش شده توسطPCR کمی برای Gapdh ۱۱۲

فصل اول

مقدمه و مروری بر منابع

مقدمه

دیابت شیرین یک مشکل جدی برای سلامت انسان است که در حال حاضر ۲۰۰ میلیون نفر در جهان را تحت تاثیر قرار داده است و انتظار می رود تعداد این بیماران تا سال ۲۰۳۰ به بیش از ۳۵۰ میلیون نفر برسد که حدود ۱۰٪ از آنها به دیابت نوع یک مبتلا هستند و به طور عمده به وسیله تزریق انسولین درمان می شوند (Suheir *et al*., 2009). دیابت نوع یک وابسته به انسولین است و در اثر نقص و ناکارآمد بودن سلولهای بتای تولید کننده انسولین ایجاد میشود (wajeeh *et al*., 2008) بنابراین دیابت نوع یک با جایگزینی سلولهای بتای عملکردی که به میزان کافی انسولین بسازند قابل جبران و درمان است (Ryan *et al*., 2002; wajeeh *et al*., 2008).

امروزه تحقیقاتی برای درمان دیابت نوع یک انجام شده است که در آنها از بازسازی ویا انتقال بافت پانکراس برای جایگزینی سلولهای بتای تخریب شده استفاده شده است (Shimon *et al*., 2007). هر چند که این روشها با دو مشکل اساسی که یکی تولید میزان مناسب سلولهای بتا است که انسولین را نیز به میزان کافی بسازند و در پاسخ به سیگنالهای فیزیولوژیکی آنرا آزاد کنند و دیگری محفوظ ماندن این سلولها از پاسخ ایمنی بدن بیمار است, مواجه می باشد. البته این تکنیکها به صورت کلینیکی قابل استفاده نیستند.

به همین دلیل به نظر می رسد سلول درمانی روش مطمئن و کارآمد تر از انتقال بافت است (Shimon *et al*., 2007). سلولهای بنیادی جنینی و بالغ می توانند در اثر بیان بعضی فاکتورهای رونویسی خاص یا در حضور فاکتورها و شرایط خاص محیط کشت در *in vitro* و *in vivo* به سمت بافتهای خاصی تمایز یابند (Dor *et al*., 2004). سلولهای بنیادی بالغ که یک تکوین ابتدایی دارند، در اثر مکانیسمهای نا مشخصی می توانند دوباره برنامه ریزی شوند و ژنهای جدیدی را بیان کنند که سبب تمایز آنها به سمت بافت دیگری شوند(Shimon *et al*., 2007). در سالهای اخیر , سلولهای بنیادی مزانشیمی به خاطر پتانسیل تمایزی بالایی که دارند بسیار مورد توجه قرار گرفته اند. تحقیقات نشان می دهند که سلولهای مزانشیمی مشتق شده از dipose (Timper *et al*., 2006)، مغز استخوان (Moriscot *et al*., 2005) و پانکراس (Seeberger *et al*., 2006) میتوانند به سمت بیان فنوتیپ اندوکرین پانکراتیک متمایز شوند، علاوه بر این توانایی MSCs نیز برای تمایز به سلولهای تولید کننده انسولین نشان داده شده است (Yanhua *et al*., 2007).

در تحقیقات انجام شده آبشاری از فاکتورهای رونویسی که مسئول تکوین سلولهای پانکراتیک و islet هستند نیز توصیف شده اند. بعضی از این فاکتورهای رونویسی می توانند بخشی از برنامه تکوینی سلولهای بتا را در سلولهای غیر پانکراتیک راه اندازی کنند (Shimon *et al*., 2007).

امروزه تغییر ژنتیکی در سلولهایی که برای درمان استفاده می شوند بسیار رواج دارد. برای انتقال ژنهای خارجی به درون سلول باید از یک روش موثر استفاده شود. وکتورهای ویروسی مشتق شده از adenoviruses, adeno-associated viruses, retroviruses و lentiviruses برای انتقال و القای تمایز در سلولها استفاده می شوند که تا کنون کاربردهای موثر و موفقیت آمیزی از وکتورهای لنتی ویروس ارائه گردیده است. برای مثال از وکتور لنتی ویروسی برای انتقال ژن VEGF برای القای رگزایی استفاده شده است (Jazwa *et al*., 2007).

فاکتورPDX1 که با نامهای IDX-1, IPX-1 و STF-1 نیز شناخته می شود, یک فاکتور رونویسی می باشد که تنظیم کننده اصلی تکوین سلولهای پانکراتیک و همچنین عملکرد سلولهای islet است (Jun *et al*., 2009). PDX1 در تنظیم بیان ژن انسولین و چندین ژن مربوط به سلولهای islet نقش اساسی دارد (Tamar *et al*., 2005).

مطالعات اخیر نشان می دهند PDX1 فاکتوری است که موجب القای تمایز سلولهای بنیادی intestinal و سلولهای بنیادی جنینی به سمت سلولهای تولید کننده انسولین می شود. علاوه بر این تحقیقات انجام شده توسط Yanhua و همکارانش نشان می دهد که وکتورهای آدنو ویروسی حاوی PDX1 تولید انسولین را در سلولهای بنیادی مزانشیمی القا کرده اند (Yanhua L., *et al*., 2007). هر چند استفاده از وکتورهای آدنو ویروسی محدودیتهایی مانند القای پاسخ التهابی و بیان موقت ژن وارد شده را دارا می باشند (Jazwa *et al*., 2007). علاوه بر این، استفاده از مواد بیوشیمیایی نیز می تواند در القای تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی به سلولهای بتای پاتکراس موثر باشد (Li-Bo *et al*., 2004).

در این مطالعه, وکتور نوترکیب لنتی ویروسی دارای ژن PDX1 ساخته و سلولهای بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان با این وکتور نوترکیب (LV-PDX-1) ترانسفکت شدند. سلولهای MSC اینفکت شده با محیط کشت تمایزی نیز مجاوز شدند. سپس بیان ژن PDX1 و سایر مارکرهای سلولهای بتای پانکراس از جمله انسولین در سلولهای بنیادی مزانشیمی ترنسداکت شده و

تیمار شده با مواد بیوشیمیایی، توسط RT-PCR کمی بررسی گردید. همچنین تولید انسولین از سلولهای تمایز یافته توسط ایمنو فلورسانس و ECL نیز اثبات گردید.

۱- سلولهای بنیادی

یکی از یافته های جدید علم پزشکی شناسایی و جدا کردن نوع جدیدی از سلولها در داخل بدن پستانداران، به نام سلولهای بنیادی است که به دلیل داشتن پتانسیل های بالا درزمینه تقسیم شدن و تمایز به سلول های تخصصی بدن بسیار مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است (Maurizaio *et al*., 2006). درمقاله ای که درشماره ۲۹۰ مربوط به سال ۲۰۰۰ مجله علمی Science به چاپ رسید بزرگترین پیشرفت غیر منتظره سال ۱۹۹۹ ، جدا سازی سلول های بنیادی انسان عنوان شد (Mezey *et al*., 2000). این سلول ها به دلیل ویژگی های خاصی که دارند قادر هستند انواع مختلف سلولها را تولید کنند. لذا بسیار مورد توجه پژوهشگران هستند. مطالعه بر روی سلولهای بنیادی حوزه ای از دانش است که به مطالعه چگونگی ایجاد یک موجود کامل از یک سلول، همچنین چگونگی تعویض سلول های آسیب دیده با سلول های سالم در موجود بالغ می پردازد. راه های زیادی برای استفاده از سلول های بنیادی در تحقیقات بالینی وجود دارد. با این حال از نظر تکنیکی سختی های زیادی بین تئوری های امید بخش در درمان بیماری ها ورسیدن به یک روش عملیاتی مناسب دردرمان آن ها وجود دارد که پرکردن این فاصله تنها با انجام آزمایشات وتحقیقات بیشتر وبیشتر امکان پذیر است. تمام سلول های بنیادی بدون توجه به منبع آن ها ، دارای شماری ویژگی های مشترک و عمومی هستند که مهم ترین آن ها قدرت تقسیم و خود نوزایی، عدم تخصصی بودن برای بافتی، قدرت تبدیل شدن به سلول های تخصصی می باشد.

سلول های بنیادی براساس توان تمایز به سه صورت تقسیم بندی می شوند :

- همه توان[1] : این سلول ها می توانند همه سلول ها اعم از سلول های فرد وسلول های برون جنینی (جفت) را بسازند مانند بلاستومرهای یک جنین دو سلولی که هر سلول آن می تواند یک فرد کامل را بسازد.
- پرتوان[2] : سلول هایی هستند که می توانند غالب یا همه سلول های یک فرد را بسازند. مثلاً سلول های بنیادی جنینی تحت شرایط خاص می توانند یک فرد را بسازند ولی قادر به ایجاد سلول های برون جنینی (جفت) نیستند.

1 . Totipotent
2. Pluripotent

- چند توان[1]: این دسته از سلول های بنیادی تعداد محدودتری از انواع سلولی را می توانند ایجاد کنند، مانند سلول های بنیادی واقع در بافت های بزرگسالان (Hans *et al*., 2007; Sinsicalco *et al*., 2008).

انواع سلول های بنیادی

به طور کلی سلول های بنیادی دارای دو منشأ جنینی و بزرگسالان هستند وهر دوی این سلول ها در مطالعات زیست شناسی تکوینی، طب پیوند، توسعه دارو سازی، ناهنجاری شناسی وتولید موش های ترانس ژن اهمیت دارند.

سلول بنیادی جنینی سلولی است مشتق از جنین با توان تقسیم زیاد که می تواند تقریباً به تمام سلول های بدن تمایز یابد. این سلول ها از مرحله بلاستوسیست جنین به دست می آیند. بلاستوسیست مرحله ای از تکوین درپستانداران پیش از لانه گزینی است که معمولاً ٤ یا ٥ روز بعد از لقاح ایجاد می شود. دراین مرحله جنین ۱۰۰تا ۲۰۰ سلول دارد که همه از نظر ژنتیکی یکسان هستند. این سلول ها آغاز کننده تکوین جنین هستند پتانسیل تبدیل شدن به تمام بخش های بدن را دارند(Thamson *et al*., 1998).

سلول های بنیادی بالغ، سلول های تمایز نیافته ای هستند که بین سلول های تمایز یافته یک بافت یا اندام وجود دارند وقادرند خود را تجدید کرده ونیز به سلول های تمایز یافته بافت تبدیل شوند. لذا، کار آنها بقاء و تعمیر بافتی است که درآن یافت می شوند. تاریخچه کشف سلول های بنیادی بالغ به بیش از ٤٠ سال پیش برمی گردد. درسال ۱۹٦۰ میلادی، پژوهشگران متوجه شدند که مغز استخوان دارای دو نوع جمعیت سلول های بنیادی است، سلول های بنیادی خون ساز که انواع سلول های خونی را می سازد و سلول های بنیادی استرومال که جمعیت سلولی مخلوطی هستند و استخوان، غضروف، چربی وبافت همبند را می سازند. سلول های بنیادی بالغ به تعداد بسیار اندک در بافت های بالغ وجود دارند ودر هر بافتی به صورت" بدون تقسیم " برای سال های باقی مانده تا زمانی که توسط یک بیماری ویا آسیب بافتی دوباره فعال شوند. بافت های بالغی که دارای سلول های بنیادی اند شامل : مغز، مغز استخوان، خون محیطی، رگ های خونی، عضلات اسکلتی، پوست وکبد هستند. امروزه پژوهشگران زیادی سعی بر استخراج وکشت این سلول ها برای تولید

[1] . Multipotent

رده های خاص سلولی برای درمان بیماری های مختلف دارند. کشت این سلول ها در محیط آزمایشگاه نیاز به لایه تغذیه کننده نداشته وتراتوما تشکیل نمی دهند. مارکر Oct4 را بیان کرده وفاقد" کنترل مرحله G1[1] " در چرخه سلولی اند. سلول های بنیادی بالغ در عین حال که فعالیت تلومرازی بالایی دارند اما تعداد تقسیمات آن ها محدود و قابل کنترل است (Baksh *et al*., 2004).

مزایا ومعایب سلول های بنیادی جنینی و بالغ عبارتند از:

الف: منشاء سلول های بنیادی جنینی، جنین وبافت های جنینی است. این موضوع از نظر اخلاقی قابل بحث است درحالی که سلول های بنیادی بالغ را می توان از خود بیمار گرفت ودر محیط کشت رشد داد وسپس دوباره به بیمار برگرداند.

ب: مهمترین استفاده ومزیت سلول های بنیادی بالغ اینست که این سلول ها متعلق به بافت بدن بیمار است، درنتیجه توسط سیستم ایمنی دفع نمیشود اما سلول های بنیادی جنینی احتمال دفع توسط سیستم ایمنی میزبان را دارند.

ج: سلول های بنیادی جنینی از نظر قدرت تمایز قادر به تشکیل کلیه سلول هایی که از سه لایه جنینی منشاءمی گیرند هستند درحالی که سلول های بنیادی بالغ قادرند به طیف محدودی از رده های سلولی ویا تنها به سلول های بافتی که از آن منشاء گرفته اند تمایز یابند.

باتوجه به محدودیت های کاربرد سلول های بنیادی جنینی نظیر ایجاد تومور پس از انتقال به موجود زنده، مسائل مربوط به رد پیوند ومحدودیت درمنبع ومسائل اخلاقی، بررسی امکان استفاده از سلول های بنیادی در بافت بالغ، عدم تکثیر سریع آن ها درمقایسه با سلول های بنیادی جنینی وقدرت تمایزی پایین آن ها از مشکلات درحال بررسی استفاده بالینی از این سلول هاست. بنابراین سوالات زیادی درمورد قدرت وچگونگی تمایز سلول های بنیادی بالغ باقی مانده است.

درخصوص قابلیت انعطاف پذیری سلول های بنیادی بالغ، ابتدا درسال ۱۹۹۹، ژورنال Science مقاله ای تحت عنوان"Turning Brain into Blood" منتشر کرد(Bjornson *et al.*, 1999). سپس درسال ۲۰۰۰، همین ژورنال مقاله دیگری تحت عنوان " Turning Blood into Brain" چاپ نمود (Mezey *et al*., 2000).

[1] . G1 Control point

به تدریج بعد از آن مقالاتی دیگر حاکی از قابلیت تبدیل وتمایز سلول های بنیادی بالغ به سلول های بافت های دیگر به چاپ رسید (Phinney *et al*., 2005). درخصوص عوامل متعددی که بر روی رفتار سلول های بنیادی اثر گذارند، عوامل رشد وسیتوکین ها هستند که درهر بافتی متفاوت اند. سلول های بنیادی در هر بافت تحت تأثیر عوامل متعددی درهمان بافت به سلول های اختصاصی آن بافت تبدیل می شوند. تغییر فاکتورها وعوامل محیطی درمحیط آزمایشگاه می توانند موجب تغییر سرنوشت این سلول ها شود، خصوصیتی که آن را پلاستیسیته[1] یا Transdifferentiation گویند (Wislet-Gendebien *et al*., 2005). در واقع خصوصیات سلول های بنیادی به دلیل بیان یک سری ژن های خاص درآن هاست وتغییر دربیان این ژن ها موجب تغییر رفتار سلول می شود. سیتوکین ها وعوامل رشد از طریق گیرنده های سلولی روی بیان ژن ها اثر می گذارند. با درک چگونگی اثراین مولکولها ومواد برروی فعالیت سلول های بنیادی می توان رفتار آنها را در محیط کشت کنترل کرد و آنها را در به سمت تمایز به سوی یک رده خاص سوق داد. سلول های بنیادی بالغ درتمام بافت های حیوانات دیده شده اند وبا توجه به مکانی که به آن تعلق دارند، بسیار متفاوت هستند وبرخلاف سلول های بنیادی جنینی که با توجه به منشاء مشخص می شوند (توده داخلی جنینی)، این سلول ها مشخصه قطعی بدین معنی ندارند ودائماً بر شناسایی تعداد بافت های بالغی که دارای سلول های بنیادی اند افزوده می گردد. لیستی از بافت هایی که دربدن دارای سلول های بنیادی بالغ هستند به این قرارست: مغز استخوان، گردش خون محیطی، مغز،طناب نخاعی،پالپ دندان، عروق خونی، عضلات اسکلتی، پوست، قرنیه، کبد، پانکراس و... (Sakaguchi *et al*., 2005). امروزه مطالعه و استفاده از سلول های بنیادی مغز استخوان توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده است.

۱-۱- سلول های بنیادی مزانشیمی

مهم ترین منبع سلول های بنیادی مزانشیم درسال های اخیر مغز استخوان است که سلول های مورد نظر به راحتی از آن جدا وکشت داده می شوند (Friedenstein *et al*., 1976). این سلول ها در ترمیم بافت هایی بامنشاء مزانشیمی مثل استخوان، غضروف، ماهیچه، تاندون و چربی شرکت می کنند والبته این سلول ها به عنوان سلول های حمایت کننده برای سلول های هماتوپوئتیک درمغز استخوان نیز هستند (Caplan *et al*.,2005). سلول های مزانشیم را از منابع فرعی دیگری هم مثل

[1] . Plastisity