بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم زیستی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد زیست شناسی (ژنتیک)

جداسازی سلولهای پیش ساز اندوتلیال از خون محیطی انسان و بررسی بیان ژنهای خودبازسازی (Nanog, Sox2, Oct4 وNucleostemin) در طی فرایند تمایز این سلولها به سلولهای اندوتلیال

نگارش

حمید بیات

استاد راهنما

دکتر سید جواد مولی

اساتید مشاور

دکتر حبیب ا.. پیروی و دکتر فردین فتحی

اردیبهشت ۱۳۸۹

تقدیم به تمام معلمان بزرگوار و فداکارم

تشکر و قدردانی:

ستایش و سپاس، خالق هستی را سزاست که علم را مایه مباهات قرار داد و بر این بنده کمترین، منت گذارده و همواره هادی و راهنمایم بوده است. اکنون که به لطف و یاری خداوند متعال، مراحل نگارش و تدوین پایان‌نامه به اتمام رسیده است لازم می‌دانم مراتب امتنان و قدردانی فراوان خویش را تقدیم سرورانی نمایم که ارائه پایان‌نامه حاضر مرهون مساعدت‌های بی‌شائبه آنان بوده است.

بدین وسیله از استاد عزیزم، جناب آقای دکتر مولی که بزرگوارانه و دلسوزانه با نظرات ارزشمند و مساعدت‌های بی‌دریغ خویش راه‌گشای انجام تحقیق شدند، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از جناب آقای دکتر فتحی که به عنوان استاد مشاور، اینجانب را از نظرات ارزشمند خود بهره‌مند ساختند تشکر فراوان دارم.

از جناب آقای دکتر پیروی نیز به خاطر راهنمایی های ارزشمندشان تشکر می کنم. از اساتید خوبم در گروه، دکتر صادقی زاده، دکتر بهمنش و دکتر سلطانی به خاطر زحماتی که برای من کشیده اند، تشکر می کنم.

از همه دوستان و همکاران آزمایشگاه که در حد توانشان یاری و مساعدت های خود را از من دریغ ننموده‌اند، تشکر می کنم.

چکیده:

تا سال ۱۹۹۸ تصور بر این بود که واسکولوژنز تنها در دوران جنینی وجود دارد تا اینکه آساهارا و همکارانش برای اولین بارسلولهای پیش ساز اندوتلیال را از خون محیطی جداسازی کردند. سلولهای پیش ساز اندوتلیال یک جمعیت هتروژن از سلولهای تک هسته ای موجود در مغز استخوان می باشد که در پاسخ به ایجاد یک اندام اسکمیک از مغز استخوان وارد خون شده و در اندام مورد نظر به سلولهای اندوتلیال تمایز می یابد. این سلولها نقش اساسی در بهبود زخم ها و شرایط پاتولوژیک نظیر رشد تومور و متاستاز دارند.

سلولهای پیش ساز اندوتلیال بعضی از خصوصیات سلولهای بنیادی از قبیل توانایی ایجاد کلونی و قابلیت تمایز به چند رده سلولی از جمله سلولهای کاردیومیوسیت، ماهیچه صاف و سلولهای اندوتلیال را دارند. یکی از ویژگیهای سلولهای بنیادی توانایی خودتجدیدی این سلولها می باشد که به وسیله مکانیسم های مختلفی در انواع سلولهای بنیادی کنترل می شود. در حالی که سلولهای پیش ساز اندوتلیال یک ابزار مناسب برای سلول درمانی می باشد، بسیاری از ویژگیهای این سلولها هنوز شناخته نشده است. به عنوان مثال بیان ژنهای خود تجدیدی بطور جامع در این سلولها برسی نشده است. در این مطالعه سلولهای پیش ساز اندوتلیال از خون محیطی افراد داوطلب جداسازی و بیان مارکرهای سلولهای بنیادی مورد بررسی قرار گرفت. بطور مختصر سلولهای تک هسته ای از خون محیطی جداسازی شد و در ظروف آغشته به فیبرونکتین کشت داده شد و سلولهای پیش ساز اندوتلیال بر اساس مرفولوژی و خصوصیات رشدشان مشخص شدند.

در مرحله اول بیان مارکرهای سلولهای پیش ساز اندوتلیال شامل ژنهای: CD34, CD31, VCAM KDR و Tie-1 به وسیله RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. سپس با استفاده از ایمونو سیتو شیمی بیان ژنهای CD34, CD31 بررسی شد. علاوه بر این سلولهای جدا شده توانایی اتصال به لکتین و جذب LDL را داشتند. در مرحله بعد بیان بعضی از مهمترین ژنهای خود بازسازی از جمله Oct4-A, Sox-2, Nanog, Nucleostemin, ZFX و همچنین Oct4-B و Oct4-B1 بررسی شد.

نتایج ما نشان داد که هیچ یک از ژنهای Oct4-A، Sox-2 وNanog در سلولهای پیش ساز اندوتلیال بیان نمی شود. همچنین ما برای اولین بار بیان ژنهای Oct4-B و Oct4-B1 را در این سلولها نشان دادیم. نتایج ما همچنین نشان داد که دو ژن مارکر سلولهای بنیادی یعنی Nucleostemin وZFX در این سلولها بیان می شوند و بیانشان از روز چهارم تا یازدهم یک روند کاهشی را دارد. در مجموع سلولهای به دست آمده بیان بسیاری از مارکرهای سلولهای اندوتلیال را نشان می دهند که نشان می دهد این سلولها درحالت تمایزی نسبتا بالایی هستند واز طرف دیگر پروفایل بیانی ژنهای خود تجدیدی نشان می دهد که این سلولها توانایی خودتجدیدی محدودی دارند.

واژگان کلیدی : واسکولوژنز، سلولهای پیش ساز اندوتلیال، خودتجدیدی، سلولهای بنیادی

فهرست مطالب:

۱- مقدمه

۱-۱- مکانیسم های رگزایی..... ۲

۱-۱-۱-آنژیوژنز..... ۲

۱-۱-۲- واسکولوژنز..... ۳

۱-۱-۳- واسکولوژنز در افراد بالغ..... ۴

۱-۲- سلولهای بنیادی..... ۶

۱-۲-۱- انواع سلولهای انواع سلولهای بنیادی از لحاظ پتانسیل ایجاد سلولهای تمایز یافته..... ۷

۱-۲-۲- سلولهای پروژنیتور..... ۸

۱-۲-۳- انواع سلولهای پروژنیتور..... ۹

۱-۳- مشخصات سلولهای پیش ساز ا ندوتلیال..... ۹

۱-۴- سلولهای پیش ساز اندوتلیال و سرطان..... ۱۱

۱-۵- سلولهای پیش ساز اندوتلیال و بیماریهای قلبی عروقی..... ۱۲

۱-۶- سلولهای پیش ساز اندوتلیال و دیابت..... ۱۳

۱-۷- سلولهای پیش ساز اندوتلیال و استئوژنز..... ۱۴

۱-۸- فاکتورهای موثر روی بیولوژی سلولهای پیش ساز اندوتلیال..... ۱۴

۱-۸-۱- استروژن..... ۱۴

۱-۸-۲- لپتین..... ۱۵

۱-۸-۳- استاتین ها.....۱۵
۱-۸-۴- اریتروپویتین.....۱۵
۱-۹- سلولهای پیش ساز اندوتلیال در درمان.....۱۶
۱-۹-۱- افزایش سلولهای پیش ساز اندوتلیال در خون.....۱۶
۱-۹-۲- سلول درمانی آنفارکتوس قلبی.....۱۶
۱-۱۰- سلولهای بنیادی..... ۱۷
۱-۱۰- مکانیسمهای کنترل خود بازسازی و تمایز سلولهای بنیادی.....۱۷
۱-۱۰-۱- مسیرهای هدایت سیگنال.....۱۸
۱-۱۰-۲- فاکتورهای تنظیمی درونی.....۱۹
۱-۱۱- ژنهای مورد مطالعه ۲۰
۱-۱۲- ضرورت تحقیق و اهداف آن.....۲۷

۲- مواد و روشها

۲-۱- جداسازی و کشت سلولهای پیش ساز اندوتلیال.....۳۱
۲-۱-۱- روش تهیه محیط کشت EGM2 .....۳۱
۲-۱-۲- روش تهیه کلرید آمونیوم ۰/۸ درصد.....۳۱
۲-۱-۳- کوت کردن پتری دیش۶ خانه با فیبرونکتین.....۳۲
۲-۱-۴- طرز تهیه محلول DPBS-EDTA.....۳۲
۲-۱-۵- جداسازی سلولهای تک هسته ای خون ۳۲
۲-۱-۶- جداسازی سلولهای پیش ساز اندوتلیال.....۳۴

۲-۲- پاساژ سلولهای پیش ساز اندوتلیال.....۳۴
۲-۳-کشت سلول های NT2.....۳۶
۲-۳-۱- ذوب نمودن سلول‌های منجمد شده NT2.....۳۶
۲-۳-۲- انجماد سلولهای NT2.....۳۷
۲-۴- بررسی انکورپوریت Dil-Ac-LDL توسط سلولهای پیش ساز اندوتلیال.....۳۷
۲-۵- بررسی توانایی اتصال سلولها به Lectin I.....۳۸
۲-۶- بررسی مارکرهای CD34 و CD31 با استفاده از روش ایمونوسیتوشیمی.....۳۹
۲-۶-۱- روش تهیه محلول مسدود کننده.....۳۹
۲-۶-۲- روش تهیه محلول شستشو.....۴۰
۲-۶-۳- روش تهیه محلول پارافرم آلدهید.....۴۰
۲-۷- بررسی بیان ژنهای خود بازسازی در سلولهای پیش ساز اندوتلیال
با استفاده از تکنیک RT-PCR.....۴۱
۲-۷-۱- استخراج RNA تام سلولی.....۴۲
۲-۷-۱-۱- روش تهیه آب تیمار شده با DEPC.....۴۳
۲-۷-۲- بررسی کمی و کیفی RNAی استخراج شده.....۴۴
۲-۷-۲-۱-UV اسپکتروفتومتری.....۴۴
۲-۷-۲-۲- الکتروفورز ژل آگارز.....۴۵
۲-۷-۲-۲- ۱- روش تهیه محلول‌ها و بافرهای مورد نیاز در الکتروفورز.....۴۶
۲-۷-۲-۲- ۲- عکس‌برداری از ژل آگارز.....۴۷
۲-۸- تیمار RNA با آنزیم DNase I.....۴۷

۲-۹- واکنش رونویسی معکوس.....۴۸

۲-۱۰- واکنش PCR ۵۰

۲-۱۰-۱- طراحی پرایمر.....۵۰

۲-۱۰-۲- آماده سازی پرایمرهای PCR.....۵۲

۲-۱۰-۳- انجام واکنش PCR.....۵۲

۲-۱۰-۴- بهینه سازی دمای انجام واکنش PCR ۵۳

۲-۱۰-۵- بهینه سازی تعداد سیکل های PCR.....۵۴

۲-۱۰-۶- تأیید محصولات PCR ۵۴

۲-۱۱- بررسی بیان ژن OCT4 با استفاده از ایمونوسیتوشیمی.....۵۵

۲-۱۲- بررسی بیان ژن های خودبازسازی Nucleostemin و ZFX در تمایز سلولهای پیش ساز اندوتلیال در روزهای مختلف کشت.....۵۷

۲-۱۳- بررسی بیان ژن های OCT4-B، OCT4-B1 در سلولهای پیش ساز اندوتلیال با استفاده از تکنیک Real-time PCR.....۵۷

۲-۱۳-۱- پرایمرها و پروپها.....۵۷

۲-۱۳-۲- انجام واکنش Real-time PCR.....۵۸

۳- نتایج

۳-۱- جداسازی و کشت سلولهای پیش ساز اندوتلیال.....۶۲

۳-۲- بررسی انکورپوریت Dil-Ac-LDL و اتصال به LectinI توسط سلولهای پیش ساز اندوتلیال.....۶۴

۳-۳- بررسی کمی و کیفی RNA های استخراج شده.....۶۵

۳-۴- بهینه سازی دمای انجام واکنش PCR ۶۶

۳-۵- بهینه سازی تعداد سیکل های PCR..... ۶۷

۳-۶- بررسی بیان مارکرهای سلولهای اندوتلیال در روز هفتم..... ۶۸

۳-۷- بررسی بیان ژنهای CD31 و CD31 در سطح پروتئین با استفاده از تکنیک ایمونوسیتوشیمی..... ۶۸

۳-۸- بررسی بیان ژن های خودبازسازیOct4-A, Oct4-B ،Oct4-B1 ،Sox-2, Nanog, Nucleostemin و ZFX در سلول های پیش ساز اندوتلیال..... ۶۹

۳-۹- تایید محصولات PCR..... ۷۲

۳-۹- بررسی بیان ژن Oct-4 در سطح پروتئین با استفاده از تکنیک ایمونوسیتوشیمی..... ۷۳

۳-۱۰- بررسی بیان ژن های خودبازسازی ZFX و Nucleostemin در طول روزهای مختلف کشت سلولهای پیش ساز اندوتلیال..... ۷۶

۳-۱۱- بررسی بیان ژنهای Oct4-B، Oct4-B1 درسلولهای پیش ساز اندوتلیال با استفاده از تکنیک Real time PCR..... ۷۷

۴- بحث و نتیجه گیری

۴-1- جداسازی سلولهای پیش ساز اندوتلیال از خون محیطی انسان..... ۸۰

۴-۲-تایید ماهیت اندوالیالی سلولهای جدا شده..... ۸۲

۴-۳- پروفایل بیانی ژنهای خود بازسازی در سلولهای پیش ساز اندوتلیال..... ۸۳

پیشنهادات..... ۸۶

منابع و مواخذ..... ۸۹

فهرست شکلها

شکل ۱-۱- تصویر شماتیک از مکانیسم عروق زایی به وسیله سلولهای
پیش ساز اندوتلیال.....۶
شکل ۱-۲- ساختار واریانت B1 و مقایسه آن با واریانت B.....۲۳
شکل ۱-۳- تصویر شماتیک از نقش ژن ZFX در خودتجدیدی سلولهای
بنیادی.....۲۷
شکل ۳-۱- تصویر سلولهای پیش ساز اندوتلیال جدا شده ۶۳
شکل ۳-۲- یک کلونی از سلولهای پیش ساز اندوتلیال.....۶۳
شکل ۳-۳- بررسی توانایی جذب LDL و اتصال به لکتین سلولهای جدا شده
در روز هفتم.....۶۴
شکل ۳-۴- RNA تام سلولی الکتروفورز شده.....۶۶
شکل ۳-۵- بهینه سازی دمای انجام واکنش PCR.....۶۶
شکل ۳-۶- بهینه سازی سیکل های ژن GAPDH.....۶۷
شکل ۳- ۷ - بررسی بیان مارکر سلولهای اندوتلیال.....۶۸
شکل ۳-۸- بررسی ایمونوسیتوشیمی ژنهای بیان ژنهای CD31 و CD34.....۶۹
شکل ۳-۹ بررسی بیان ژنهای Oct4 -A ، Nanog و Sox2 در سلول های
پیش ساز اندوتلیال با استفاده از تکنیک RT-PCR ۷۰
شکل۳-۱۰- بررسی بیان ژنهای Nucleostemin و ZFX در سلول های پیش ساز اندوتلیال
با استفاده از تکنیک RT-PCR.....۷۱
شکل۳-۱۱- بررسی بیان ژنهای Oct4-B، Oct4-B1 در سلول های پیش ساز اندوتلیال انسان
با استفاده از تکنیک RT-PCR.....۷۲

۳-۱۲- تایید محصول PCR ژن Nucleostemin به وسیله برش با آنزیم KpnI..... ۷۳

۳-۱۳- تایید محصول PCR ژن ZFX به وسیله برش با آنزیم MvaI..... ۷۳

شکل۳-۱۴- بررسی ایمونوسیتوشیمی بیان ژن Oct-4 در سلول های پیش ساز اندوتلیال انسان..... ۷۴

شکل ۳-۱۵ بررسی بیان ژن Nucleoctemin و ZFX در طی روزهای مختلف کشت در سلولهای پیش ساز اندوتلیال..... ۷۵

شکل ۳-۱۸- نمودارهای سیگموئیدی Real-time PCR ژنهای Oct4-B و Oct4- B1..... ۷۶

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مکانیسمهای رگزایی :

رگهای خونی به وسیله دو مکانیسم مختلف تولید می شوند که عبارتند از آنژیوژنز[1] و واسکولوژنز[2]. فرایند نخست شامل جوانه زدن رگهای جدید از رگهای قبلی بوده و بطور طبیعی هم در دوران جنینی و هم در دوران بلوغ می تواند رخ دهد (۱). در حالی که واسکولوژنز شامل ایجاد عروق خونی از سلولهای مزانشیمی نابالغ می باشد (۲). تا یک دهه قبل اعتقاد بر این بود که این مکانیسم فقط در دوران جنینی وجود دارد در حالی که مطالعات اخیر نشان داده که خون محیطی بزگسالان حاوی رده های سلولی مشتق شده از مغز استخوان می باشد که ویژگی آنها مشابه آنژیوبلاست های جنینی است. این سلولها قابلیت تکثیر و تمایز به سلولهای اندوتلیال بالغ را دارند و سلولهای پیش ساز اندوتلیال[3](EPC) خوانده می شوند (۳و۴).

۱-۱-۱ - آنژیوژنز :

آنژیوژنز یا رگزایی به معنی تشکیل مویرگهای جدید از عروق اولیه است. رگزایی در حالات مختلف پاتولوژیک از قبیل رشد تومور، متاستاز، آرتریت روماتوئید و همچنین در فرایند های فیزیولوژیک مانند رشد و نمو اندام، ترمیم زخم و تولید مثل دخیل می باشد (۱).

آنژیوژنز یک فرایند لازم در فیزیولوژی طبیعی است و در صورتی که تعادل بین فاکتورهای القاکننده و مهارکننده آنژیوژنز بر هم بخورد، شرایط برای ایجاد برخی بیماریها بوجود می آید (۱).

برای فرایند رگزایی ۱۰ مرحله متوالی در نظر گرفته می شود، که یک یا چند مرحله از این مراحل می تواند هدف عوامل محرک بازدارنده رگزایی باشد. جزئیات این مراحل به این صورت است که هنگامیکه بافتها دچار هیپوکسی[4] (کمبود اکسیژن) می شوند، این بافتهای آسیب دیده اقدام به سنتز و رهاسازی

---

[1]- Angiogenesis

[2]- Vasculogenesis

[3] - Endothelial progenitor cell

[4] - Hypoxia

فاکتورهای آنژیوژنیک می کنند (۱)، سپس فاکتورهای مذکور با اتصال به گیرنده های خود واقع بر سطح سلولهای اندوتلیال منجر به فعال شدن آنها می شوند (۵و۶). در مرحله بعد پروتئازها از این سلولها رها شده تا غشای پایه را حل کنند (۷) که با حل شدن غشای پایه، سلولهای اندوتلیال مهاجرت و تکثیر می یابند(۸). علاوه بر این مولکولهای اتصالی (از قبیل اینتگرین αvβ5وα3βv) نیز به کشیدن و جلو رفتن رگهای خونی در حال جوانه زدن کمک می کنند (۹). در ادامه متالوپروتئازهای ماتریکس[1] جهت تجزیه ماتریکس خارج سلولی و آغاز بازسازی مجدد آن تولید می گردند (۱۰)، سپس برهم کنش آنژیوپوئیتین – Tie2 موجب تعدیل تشکیل لوله می شود (۱۱) و سیستم EphB-ephrinB نیز تنظیم تشکیل حلقه را بر عهده می گیرند (۱۲) در نهایت پریسیتها و سلولهای ماهیچه صاف برای پایدار کردن رگهای خونی تازه تشکیل شده به این ساختار اضافه می شوند (۱۳).

۱-۱-۲- واسکولوژنز:

برخلاف آنژیوژنز که در تمام مراحل زندگی انسان وجود دارد، واسکولوژنز فقط در دوره کوتاهی از مراحل جنینی دیده می شود(۲). البته امروزه واژه واسکولوژنز به ایجاد رگهای خونی در افراد بالغ که با سلولهای پیش ساز اندوتلیال در ارتباط است هم اطلاق می شود (۳) .

واسکولوژنز در دوران جنینی هم در قسمت های داخل جنینی[2] و هم در قسمت های خارج جنینی[3] دیده می شود که دارای مکانیسم های تقریبا متفاوتی هستند. واسکولوژنز در قسمت های خارج جنینی قبل از قسمت های داخل جنینی انجام می شود و در پستانداران با ظهور جزایر خونی در لایه مزودرم کیسه زرده آغاز می شود (۱۴). جزایر خونی در واقع محل تجمع سلولهای آنژیوبلاست می باشد. پس از مدتی سلولهای بیرونی جزایر خونی به آنژیوبلاست و سلولهای داخلی به توده ای از سلولهای هماتوپویتیک جنینی تبدیل

[1] - Matrix metalloproteinasese

[2] - Extraembryoni

[3]- Intraembryonic

می شوند. سلولهای آنژیوبلاست در نهایت به سلولهای اندوتلیال و سلولهای هماتوپویتیک انواع سلولهای خونی را ایجاد می کنند. جزایر خونی برای تشکیل شبکه عروق به یکدیگر متصل می شوند (۱۵).
مطالعات اخیر نشان داده که واسکولوژنز در قسمت های خارج جنینی می تواند با تمایز مستقیم آنژیوبلاست ها از مزودرم و مستقل از جزایر خونی نیز انجام شود (۱۴).

واسکولوژنز در قسمت های داخل جنینی هم انجام می شود و به نظر می رسد اندوکاردیوم اولین ساختار اندوتلیالی است که در جنین تشکیل می شود. با مهاجرت سلولهای آنژیوبلاست که از ناحیه (presomitic cranial mesoderm) منشا می گیرند به ناحیه پریکاردیال، این ناحیه همزمان با تشکیل میوکاردیوم، یک شبکه رگی را نیز ایجاد می کند(۱۴). این شبکه پس از مدتی دچار باز آرایی شده و لوله اندوکاردیال را ایجاد می کند، که اولین ساختار رگی در جنین می باشد. برای توسعه این شبکه آنژیوبلاست بیشتری به این ناحیه مهاجرت کرده و به سلول اندوتلیال تبدیل می شوند (۱۶).

۱-۱-۳- واسکولوژنز در افراد بالغ:

تا یک دهه قبل اعتقاد بر این بود که تمایز سلولهای پیش ساز اندوتلیال به سلولهای اندوتلیال که واسکولوژنز نام دارد، فقط در دوران جنینی وجود دارد(۲). مطالعات اخیر نشان داده که خون محیطی بزرگسالان حاوی رده های سلولی مشتق شده از مغز استخوان می باشد که ویژگی آنها مشابه آنژیوبلاست های جنینی است (۱۷). این سلولها قابلیت تکثیر و تمایز به سلولهای اندوتلیال بالغ را دارند و سلولهای پیش ساز اندوتلیال خوانده می شوند. بنابراین مشخص شد که واسکولوژنز در افراد بالغ نیز وجود دارد. مطالعات بعدی جزئیات این فرایند را نشان داد (۱۸).

کاهش جریان خون در یک ناحیه از بدن به علت آسیب دیدگی یا مسدود شدن عروق سبب ایجاد حالت هیپوکسی در آن ناحیه از بدن می شود. پاسخ طبیعی بافت به این حالت افزایش تولید و ترشح فاکتورهایی است که التهاب و واسکولوژنز را برای کاهش حالت هیپوکسی تحریک می کند (۱۹).

HIF-1[1] در اکثر سلولها بیان می شود و از دو زیر واحد a وb تشکیل شده است (۲۰). در مقدار طبیعی اکسیژن زیر واحد a توسط پروتئازها تجزیه شده و از بین می رود، اما زمانی که بافت دچار هیپوکسی شود زیر واحد a پایدار می شود(۲۱). HIF-1 رونویسی از چندین فاکتور آنژیوژنیک را فعال می کند که شامل آنژیوپویتین (۲۲) ,VEGF[2](۲۳) SDF1,[3] (۲۴)MCP1,[4] (۲۵) و اریتروپویتین (۲۶) می باشد. این فاکتورها سبب آزاد شدن سلولهای CD34+EPC و CD14+EPC از مغز استخوان به خون شده و آنها را به ناحیه ای که دچار کمبود اکسیژن شده هدایت می کند.

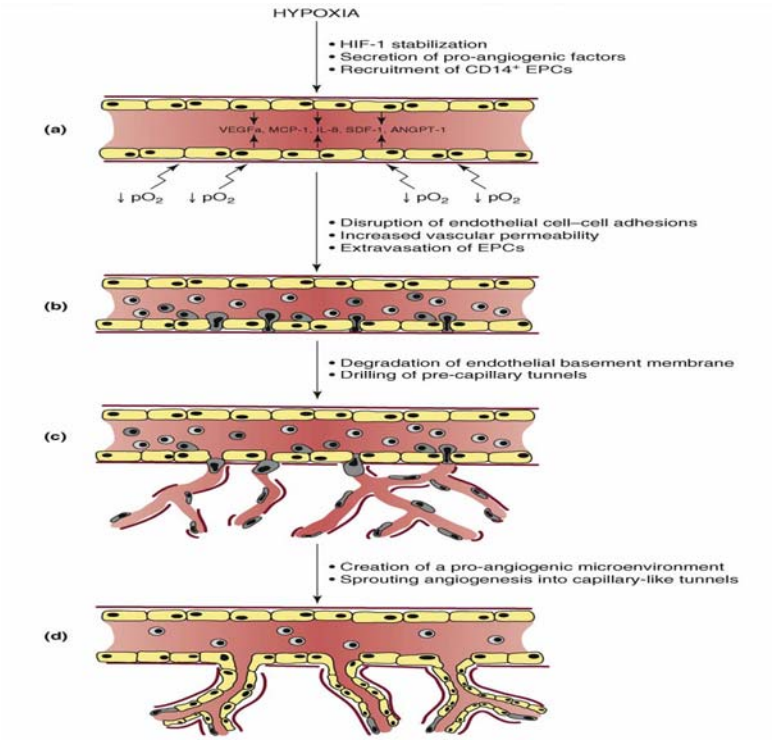
فاکتور های VEGF و MCP1 نفوذپذیری دیواره عروق را در آن ناحیه افزایش می دهد (۲۷). VEGF از طریق اتصال به رسپتور VEGFR2 در سطح سلولهای اندوتلیال باعث فسفوریلاسیون پروتئین VE-Cadherine و تجزیه آن می شود (۲۸). همچنین MCP-1 از طریق مسیر MCP1-CCR2 در سلولهای اندوتلیال سبب فسفوریلاسیون پروتئین Claudins و Occludins می شودکه در اتصالات محکم نقش دارند (۲۹). با افزایش نفوذپذیری دیواره عروق سلولهای CD14+EPC به آن نفوذ کرده و در بین سلولهای اندوتلیال قرار می گیرند (۳۰).

در مرحله بعد سلولهای CD14+EPC شروع به ترشح متالوپرتئازهای ماتریکس و متالوالاستازهای ماتریکس[5] می کنند که غشای پایه سلولهای اندوتلیال و ماتریکس خارج سلولی را تجزیه می کنند(۳۱). با تجزیه غشای پایه و مهاجرت سلولهای CD14+EPC به سوی ناحیه هیپوکسی شبکه ای از تونلها در آن

[1]- hypoxia inducible transcription factor
[2]- Vascular Endothelial Growth factor
[3]- Stromal cell-derived factor-1
[4]- monocyte chemoattractant protein-1
[5]- matrix metalloellastases

ناحیه ایجاد می شود که به عنوان الگو برای ایجاد عروق استفاده می شود (۳۱). بعد از مهاجرت سلولها CD14+EPC به این ناحیه، این سلولها با ترشح انواع سیتوکینین ها از قبیل IL8[1] سبب هدایت سلولهای CD34+EPC به این ناحیه می شوند (۳۲).

برهم کنش سلولهای CD34+ و CD14+ باعث افزایش ترشح فاکتورهای آنژیوژنیک توسط این سلولها و در نهایت ایجاد یک نیچ آنژیوژنیک در آن ناحیه می شود (۳۳) که سبب تکثیر و مهاجرت سلولهای اندوتلیال اطراف به داخل شبکه تونلی شده و آنها را به عروق بالغ تبدیل می کند (۳۴).



شکل ۱-۱- مکانیسم عروق زایی به وسیله سلولهای پیش ساز اندوتلیال. کاهش اکسیژن سبب پایدار شدن فاکتور HIF-1 سلولهای محل مورد نظر می شود که سبب ترشح فاکتورهای آنژیوژنیک می شود که EPC ها را به ناحیه مورد نظر کشیده و باعث نفوذ آنها در بین سلولهای اندوتلیال می شود. EPC ها با ترشح پروتئازها ماتریکس را تجزیه کرده و باعث ایجاد عروق جدید می شود (۳۵).

[1]- Interleukin8

۱-۲- سلولهای بنیادی

سلولهای بنیادی توسط دو خصوصیت از سلولهای عادی قابل تشخیص هستند: ۱- قابلیت خود بازسازی[1] ۲-توانائی تولید حداقل یک نوع سلول تمایز یافته[2] (۳۶)

سلولهای بنیادی پس از تقسیم، دو راه در پیش می گیرند. حداقل یکی از سلولهای دختری ناشی از آنها بصورت سلولهای بنیادی جدید با همان خصوصیات سلول والد باقی می مانند، و یک سلول دختری بنام سلول پیشساز[3]بوجود آورده که پیش از تمایز مجددا چند بار وارد تقسیم سلولی می شوند، که این امر موجب افزایش تعداد سلولهای تمایز یافته خواهد شد. به همین علت به این سلولها سلولهای موقتاً تکثیر شونده نیز گفته می شود (۳۶).

این سلولها از لحاظ محدودیت در پتانسیل تمایز و تعداد تقسیمات سلولی با سلول بنیادی والد خود تفاوت دارند. گاهی اوقات به این سلولها، سلولهای اجدادی نیز اطلاق می شود (۳۷).

۱-۲-۱- انواع سلولهای بنیادی از لحاظ پتانسیل ایجاد سلولهای تمایز یافته

Totipotent : این سلولها توانائی تقسیم و ایجاد تمامی سلولهای تمایز یافته یک ارگانیسم کامل را دارند. این توانائی در زیگوت تا مرحله ۸ سلولی مورولا به چشم می خورد (۳۸).

Pluripotent : این نوع سلولهای بنیادی توانائی تقسیم و تمایز به هریک از سه لایه جنینی (اکتودرم، مزودرم و اندودرم) را دارند ولی قادر به تشکیل جفت نمی باشند. سلولهای بنیادی جنینی جدا شده از بلاستوسیست و برخی از سلولهای بنیادی بالغ دارای این پتانسیل می باشند (۳۸).

1- Self-renewal
2- Pluripotency
3- Precursor

Multipotent : این سلولها که در بافتهای بالغ وجود دارند ظرفیت تقسیم و تمایز به دو یا تعداد محدودی از سلولها تمایز یافته را دارند. در این مورد سلولهای حاصل عمدتا مربوط به همان لایه جنینی منشا سلول بنیادین مادری می باشد. به عنوان مثال سلولهای بنیادی خونساز مغز استخوان توانائی ایجاد انواع سلولهای خونی را دارند، اما نمی توانند سلولهای مغزی را ایجاد کنند (۳۸).

Unipotent : این سلولها نیز در بافتهای بالغ وجود داشته و توانائی تمایز به یک نوع سلول را دارا می باشند. این نوع سلولها به عنوان مثال در پوست و در غدد تناسلی مردان (به شکل سلولهای اسپرماتوگونی) به وفور یافت می شوند. تنها ویژگی که این نوع سلولها را از سلولهای غیر بنیادی متمایز می کند خاصیت خود تکثیری آنهاست (۳۶).

۱-۲-۲ - سلولهای پروژنیتور :

سلولهای پروژنیتور قابلیت تمایز به یک یا چند رده سلولی را دارند. میزان این قابلیت بستگی به نوع سلول بنیادی که سلولهای پروژنیتور از آن منشا گرفته اند، دارد و نیز به نیچی که سلولهای پروژنیتور در آن قرار دارند بستگی دارد. از این نظر این سلولها شبیه سلولهای بنیادی می باشند، اما مقداری از مسیر تمایزی را طی کرده اند و در واقع این سلولها از این لحاظ بین سلولهای بنیادی[1] و سلولهای تمایز یافته قرار دارند (۳۹).

این سلولها شبیه سلولهای بنیادی قابلیت ایجاد کلنی را هم دارند اما بر خلاف سلولهای بنیادی که توانایی همانند سازی وتقسیم نامحدود را دارند، این سلولها توانایی تقسیم محدودی دارند (۴۰).

سلولهای پروژنیتوری که در قسمت های مختلف بدن وجود دارند اکثرا بصورت غیرفعال باقی می مانند و سرعت رشد کمی دارند. زمانی که قسمتی از بافت بدن دچار آسیب یا مرگ سلولی می شود سلولهای

[1]- stem cell