

۱۸۶۱ ۴۸۶

مبانی آزمایشگاه کشت سلول بنیادی

فرناز مزینی

www.ketab.ir

سرشناسه: فرناز مزینی، ۱۳۶۴

عنوان و نام پدیدآور: مبانی آزمایشگاه کشت سلول بنیادی/فرناز مزینی

مشخصات نشر: تهران: فانوس دنیا، ۱۳۹۷

مشخصات ظاهری: ۱۹۴ ص

شابک: ۹۷۸-۶۰۰-۹۶۸۵۰-۷-۳-۳، ریا، ۱۸۰,۰۰۰

وضعیت فهرست نویسی: فیا

رده بندی دیویی: ۸۶/۵۷۴

شماره کتابشناسی ملی: ۵۱۴۰۰۶۳



www.fanous-donya.ir

Fanous.donya@yahoo.com

مبانی آزمایشگاه کشت سلول بنیادی

مؤلف: فرناز مزینی

انتشارات: فانوس دنیا

نوبت چاپ: اول ۱۳۹۷

شابک: ۹۷۸-۶۰۰-۹۶۸۵۰-۷-۳-۳

شمارگان: ۱۰۰۰

قیمت: ۳۰۰,۰۰۰ ریال

فهرست مطالب

شماره صفحه	عنوان
۷	مقدمه
۷	کلیات سلول‌های بنیادی
۷	سلول بنیادی چیست و اهمیت آن در چیست
۱۰	تاریخچه سلول‌های بنیادی
۱۳	فصل اول: زیست شناسی سلول‌های بنیادی
۱۳	ویژگی‌های سلول‌های بنیادی
۱۳	انواع تقسیمات سلول‌های بنیادی
۱۶	منابع تهیه رده‌های سلول‌های بنیادی
۳۳	فصل دوم: ایمنی و کنترل عوامل خطر در آزمایشگاه کشت سلولی
۳۳	خون و فرآورده‌های خونی انسان - مایعات و بافت‌ها
۳۴	احتیاط همگانی
۳۴	واکسیناسیون علیه هپاتیت
۳۴	محیط کار استریل
۳۵	جلوگیری از آلودگی سلول‌ها
۳۶	نکات ایمنی
۳۷	فصل سوم: نگاهی اجمالی به آزمایشگاه کشت سلول‌های بنیادی
۳۷	امکانات و تجهیزات اصلی در آزمایشگاه کشت سلول‌های بنیادی
۴۰	شستشو و استریلیزه کردن وسایل

۴۱	وسایل انکوباسیون
۵۲	نکاتی درباره بن ماری (حمام آب گرم)
۵۹	استریلیزاسیون فیلتری
۶۰	دستگاه اسپکتروفتومتر یا طیف سنج
۶۶	آب خالص و کنترل کیفی آن
۶۷	کنترل کیفی آب آزمایشگاه
۷۳	ویال‌های نگهداری سلول
۷۶	میکرو پت‌های دقیق یا سمپلر
۷۹	فصل چهارم: اصول کشت سلول‌های بنیادی
۱۰۳	فصل پنجم: روش کشت سلول‌های بنیادی
۱۴۵	فصل ششم: شناسایی سلول‌های بنیادی با آنالیز سلولی
۱۵۷	فصل هفتم: شناسایی سلول‌های بنیادی با آنالیز مولکولی
۱۶۳	فصل هشتم: کاربردهای رمانوسکوپ‌های بنیادی و موانع بر سر راه استفاده از آنها
۱۷۱	ضمیمه یک: تعاریف کاربردی
۱۹۳	فهرست منابع ذکر شده

مقدمه

کلیات سلول‌های بنیادی

سلول بنیادی چیست و ماهیت آن در چیست ؟

سلول‌های بنیادی یا بُن‌یخت، ابتدایی‌ترین سلول‌های سازنده بدن هستند که در طول دوره رشد جنینی پرورش یافته و تبدیل به سلول‌های بالغ و خاصی می‌شوند که مسئولیت ساخت انواع بافت‌های بدن را به عهده دارند. در واقع منشأ کل اعضا و بافت‌های بدن سلول‌های بنیادی می‌باشند. بعد از کاسه شدن اعضا بدن، سلول‌های بنیادی مسئول ترمیم بافت‌های آسیب دیده هستند و مرتباً سلول‌های جدید را جایگزین سلول‌های پیر و مرده می‌کنند. در واقع خواص اساسی سلول بنیادی این است که تمایز نیافته‌اند و هیچ نوع ساختار خاص بافتی ندارند که به آنها اجازه انجام عملکردهای تخصصی را بدهد پس توانایی تبدیل و تمایز به انواع مختلف سلول‌های دیگر از جمله بافت عصبی، بافت ماهیچه‌ای، بافت پوششی و غیره را دارند که این توانایی محور اصلی تمایز به سلول‌های بنیادی است. همچنین آنها دارای قابلیت تقسیم به مدت‌های طولانی هستند و برخلاف سلول‌های عضلانی، سلول‌های خونی یا سلول‌های عصبی که معمولاً خودشان را بازسازی نمی‌کنند، سلول‌های بنیادی ممکن است چندین بار خود را بازسازی کنند که به این پدیده، خودتجدید شونده‌گی¹ می‌گویند. اگر جمعیت آغازگر سلول‌های بنیادی را چندین ماه در آزمایشگاه تکثیر دهند، می‌توان میلیون‌ها سلول از آنها را به دست آورد. اگر سلول‌های حاصله مانند سلول‌های بنیادی اولیه تخصص نیافته باقی بمانند، این سلول‌ها

می‌توانند یک رده سلولی خاص را به وجود آورند. بنابراین تمام انواع سلول‌های بنیادی، بدون توجه به منشأ آنها سه خاصیت کلی دارند: دارای قابلیت تقسیم، خودنوسازی به مدت طولانی و غیر تخصصی هستند و می‌توانند باعث پیدایش انواع سلول تخصص یافته شوند. فرایند ایجاد سلول‌های تخصص یافته از سلول‌های غیرتخصصی^۲ را تمایز^۱ می‌نامند. اساساً یک سلول بنیادی به صورت تعهد نیافته باقی می‌ماند تا اینکه سیگنالی را برای حرکت به سمت سلول اختصاصی دریافت کند. این سلول‌ها از طریق تقسیم بدون محدودیت و توانایی قابل ملاحظه در تبدیل به انواعی از سلول‌های بدن به عنوان یک سیستم تنظیم در بدن عمل می‌کنند. دانشمندان در حال حاضر، در ابتدای درک علائم داخلی و خارجی این سلول‌ها هستند که موجب غیرتخصصی باقی ماندن سلول‌های بنیادی می‌شوند. علام داخلی^۳ به وسیله ژن‌های سلول کنترل می‌شوند که در طی رشته‌های DNA پراکنده هستند در دتورات رمز شده برای تمام ساختارها و عملکردهای یک سلول را در خود دارد. علائم خاص^۴ نمای سلولی شامل مواد شیمیائی ترشح شده به وسیله سلول‌های دیگر، تماس فیزیکی با سلول‌های اطراف و برخی سلول‌ها در محیط و مولکول‌های مخصوص در محیط میکرو، یکی از اطراف سلول می‌باشد. زمانی که سیگنال خارجی^۵ به سلول بنیادی می‌رسد باعث می‌شود که بعضی از ژن‌هایش را روشن کند و پروتئین‌های جدیدی را بسازد که این پروتئین‌ها کمک می‌کند که سلول بنیادی شبیه به نوع سلولی که قرار است به آن تبدیل بشود باشد و به سمت تمایز پیش برود. بنابراین تحت شرایط فیزیولوژیکی یا آزمایشی، می‌توان آنها را تحریک کرد تا به سلول‌هایی با عملکردهایی ویژه نظیر سلول‌های تپنده ماده چاق یا سلول انسولین ساز لوزالمعده تبدیل شوند. عملکرد این سلول‌ها در بدن به این شکل است که به هنگام اختلال و بیماری، تکثیر پیدا کرده و سلول‌های جدیدی به بافت ارائه می‌کنند که اساس سلول‌های درمانی را تشکیل می‌دهد.

1Cell Line

2Unspecialized

3Difference

4Uncommitted

5Internal signals

6microenvironment

7external signals

دانشمندان در بیش از ۲۰ سال قبل روش‌هایی را برای به دست آوردن یا جدا کردن سلول‌های بنیادی از جنین ابتدایی موش کشف کردند. چندین سال مطالعه بر روی سلول‌های بنیادی موش منجر به کشف نحوه جداسازی سلول‌های بنیادی از جنین انسانی و رشد این سلول‌ها در آزمایشگاه در سال ۱۹۹۸ شد. منابع اصلی سلول‌های بنیادی شامل: مغز استخوان، بند ناف و جفت می‌باشد. امروزه استفاده از این سلول‌ها جهت ترمیم بافت‌های آسیب دیده در حال گسترش است. دانشمندان به‌طور عمده با دو نوع سلول بنیادی کار می‌کنند: سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی بالغ که عملکرد و خصوصیات متفاوتی دارند و در ادامه تفاوت‌های آنها توضیح داده خواهند شد.

دانشمندان به این باور دارند که سلول‌های بنیادی در آینده، اساس معالجه بیماری‌هایی نظیر پارکینسون، دیابت و بیماری قلبی خواهد شد. انواع خاصی از سلول‌های بنیادی همواره برای بازسازی خرد ساری و سیستم ایمنی بدن، بعد از یک دوره شیمی درمانی با دوز بالا، در مورد برخی از سرطان‌ها، مورد استفاده قرار می‌گیرند و همچنین استفاده از این سلول‌ها جهت دیگر بازبافت‌های سلول‌ها اثبات رسیده است. دانشمندان می‌خواهند سلول بنیادی را در آزمایشگاه مطالعه کنند، تا بتوانند از خواص بسیار مهم آنها آگاه شوند و درک کنند چه چیزی آنها را از انواع سلول‌ها خصوصاً بافته متفاوت می‌سازد. همزمان با آگاه شدن بیشتر دانشمندان در مورد سلول‌های بنیادی، این امر ممکن است میسر شود که سلول‌های بنیادی را نه تنها در سلول درمانی بلکه جهت افزایش ترکیبات داروهایی و توکسین جدید و مواد بالقوه آلوده کننده محیط را می‌توان از طریق بررسی روی وضعیت ظاهری مجموعه یاخته‌ای مشخص و اندازه‌گیری نمود و همچنین در واقع مادرزادی هم مورد استفاده قرار داد.

در سال‌های اخیر، دانشمندان بسیاری سلول‌های بنیادی را کانون پژوهش‌های خود ساخته‌اند. توجه کم نظیر به سلول‌های بنیادی، سه علت اصلی دارد: ارزش آنها برای پژوهش‌های پایه، دورنمای استفاده از آنها برای درمان بیماری و آسیب‌دیدگی و امکان به کارگیری آنها در تولید داروهای جدید. دانشمندان بسیاری عقیده دارند که سلول‌های

بنیادی به نیاز موجود برای دارو و درمان‌های جدیدی که ممکن است رنج آدمی را کم کنند، پاسخ خواهند داد.

تاریخچه سلول‌های بنیادی

نخستین باری که دانشمندان به وجود سلول‌های بنیادی گمان بردند، در اوایل قرن ۲۰ و هنگامی بود که نمو رویان‌های ابتدایی را مورد بررسی قرار می‌دادند. در سال ۱۸۶۷ برای اولین بار، موقعیت سلول‌های بنیادی خونساز در مغز استخوان معرفی شدند. قبل از آن اعتقاد بر این بود که این سلول‌ها در قلب مستقر شده‌اند. نخستین تأیید وجود سلول‌های بنیادی در اویل دهه ۱۹۶۰ حاصل آمد. در سال ۱۹۶۰ محققان کشف کردند که مغز استخوان حداقل دو نوع سلول بنیادی را دربردارد که شامل سلول‌های بنیادی خون‌ساز که انواع، نورهای خونی را در بدن می‌سازند و سلول‌های استرومال هستند که می‌توانند بافت‌های استروفا، استخوان، چربی، بافت‌های همبندی را در بدن بسازند. جیمز تیل و ارنست مک کایخ در بنیاد سرطان اونتاریو، در تورنتو کانادا، چگونگی تخریب سلول‌های خون، و شش‌های آزمایشگاهی را به وسیله تابش، بررسی کردند. آنان دریافته‌اند که می‌توانند با تزریق سلول‌های مغز استخوان موش‌های دیگر دارای ژنتیک مشابه به موش‌های مورد آزمایش، مقدار لازم سلول‌های خون این موش‌ها را تأمین کنند و مانع مرگ آن‌ها شوند.

تیل و مک کلوخ، کمتر از دو هفته پس از تزریق سلول‌های مغز استخوان، به موش‌های پذیرنده، مغز استخوان و طحال این موش‌ها را آزمایش کردند. این دو پژوهشگر چند مجموعه کلون‌زا سلول‌های خون پیدا کردند. آن‌ها انتظار داشتند که هر مجموعه فقط یک نوع سلول خون پیدا کنند اما مشاهده کردند که هر مجموعه کلون محتوی همه انواع سلول‌های خون است و همه آن‌ها فقط از یک سلول مغز استخوان پدید آمده‌اند. بنابراین، به گفته مک کلوخ برای نخستین بار ثابت می‌شد که چیزی از قبیل سلول بنیادی وجود دارد. در سال ۱۹۶۰ دانشمندانی که موش‌ها را مطالعه می‌کردند دو منطقه از مغز موش را که شامل سلول‌های تقسیم‌شونده که تبدیل به سلول‌های عصبی می‌شوند،

کشف کردند. برخلاف این گزارش‌ها بیشتر دانشمندان معتقد بودند که سلول‌های عصبی جدید در مغز بالغین نمی‌تواند تولید شود تا اینکه در سال ۱۹۹۰ دانشمندان توافق کردند که مغز بالغین شامل سلول‌های بنیادی است که توانایی تولید سه نوع اصلی سلول‌های مغزی را که شامل آستروسیت‌ها و الیگودندروسیت‌ها (سلول‌های غیرعصبی) و نورون‌ها (سلول‌های عصبی) دارا هستند. در سال ۱۹۶۸ با علم به استقرار سلول‌های بنیادی خون‌ساز در مغز استخوان اولین پیوند مغز استخوان انجام گرفت. در همین زمان بود که محققان اروپایی متوجه شدند که انواع سلول‌های خونی نظیر گلبول‌های سفید، گلبول‌های قرمز و پلاکت‌ها همگی از یک نوع سلول بنیادی خاص حاصل می‌شوند.

فریدنشتین و پتراکووا در سال ۱۹۷۰ موفق شدند که نوعی از سلول‌های بنیادی را از مغز استخوان جدا کرده و در محیط آزمایشگاه کنند. در سال ۱۹۷۸ سلول‌های بنیادی در خون بند ناف انسان شناسایی شدند. مطالعات به صورت پراکنده در زمینه‌های مختلف روی سلول‌های بنیادی انجام می‌شود و هنوز نیز اطلاعات جدیدتری به گنجینه اطلاعات اضافه می‌شود اما واقعیت این بود که در آن زمان سلول‌های بنیادی صرفاً به عنوان یک مفهوم در عالم علم مطرح بودند. محققان نامی مانند استنلی کوش و رابرت وینسنت در محیط آزمایشگاه کنند برای مدت طولانی کشت و درخت و رفتار این سلول‌ها را به صورت کنترل شده مورد مطالعه قرار دهند.

در سال ۱۹۸۱ جیل مارتین^۱ و همکارانش برای اولین بار دریافت کردند که سلول‌های بنیادی جنینی موش را وارد آزمایشگاه کنند و برای مدت طولانی کشت دهند و هنوز هم این سلول‌ها به صورت یک رده سلولی در آزمایشگاه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. این مطالعه روی گونه حیوانی انجام شد. محققان در رویای دستیابی به این سلول‌ها در انسان بودند. در سال ۱۹۹۸ جیمز تامسون^۲ و همکارانش در دانشگاه ویسکونزین^۳ آمریکا موفق شدند که از جنین‌های بلااستفاده حاصل از IVF^۴ (لقاح اسپرم و تخمک در شرایط آزمایشگاهی)، سلول‌های بنیادی جنینی انسانی را جدا کنند که این سلول‌ها نیز

1Friedenstein and Petrakova

2Gail Martin

3James Thomson

4Wisconsin

5 In Vitro Fertilization (IVF)

به صورت یک رده سلولی هنوز هم در آزمایشگاه‌های سراسر دنیا وجود دارند و مطالعات مختلف روی آنها در حال انجام است.

جان گرهارت^۱ و همکارانش نیز در همان سال در دانشگاه جانز هاپکینز^۲ موفق به جداسازی سلول‌های رده زایای^۳ از جنین شدند.

دهه‌های ۱۹۸۰ و ۱۹۹۰، با پیشرفت‌هایی در زمینه بیوتکنولوژی همراه شد. محققان به تکنیک‌هایی دست یافتند که دنیای علم را متحول کردند و از آن جمله تکنیک‌هایی بودند که برای کشت، نگهداری و دستکاری سلول‌های بنیادی در محیط‌های آزمایشگاهی معرفی شدند. این مسئله افق جدیدی را در مطالعات سلول‌های بنیادی به ارمغان آورد.

1John Gearhart

2Johns Hopkins

3Germ Cells