

المپیاد ملی سلول های بنیادی و پزشکی بازساختی



کتابچه آموزشی



مبارزه علمی برای جوانان، زنده کردن روح جست‌وجو
و کشف واقعیت‌ها و حقیقت‌هاست.
حضرت امام خمینی (ره)



گردآوری و تألیف:

دکتر پیمان کیهان ور

مینا لطفی، سید محمد امین حرمشاهی، نسا فانی، فرشته عاضدی

ویراستاری:

دکتر علیرضا رجبیان، سیده سمانه میراسماعیلی، دکتر علی مشیری

بتول احدی، بنفشه صادقی

بازتألیف و ویراستاری ثانویه:

اشکان آصفی، جواد انتظاری، پارسا بازدار، محمدامین بردپیشه، زهرا رهباندار، الهام

رمضان نژاد، امیرحسین زارع، علیا قضاوی، لیلا محمدی، پارسا میرزایی، سید علی

میرمحمدی، علی نیکخواه



مرکز علمی پژوهش استعدادهای درخشان
و دانش‌پژوهان جوان



سازمان علوم و فناوری های بنیادین

www.isro.isti.ir



هو العليم

پيشگفتار

علوم و فناوری‌های سلول‌های بنیادی و پزشکی بازساختی طی سال‌های اخیر جایگاه ویژه‌ای در پزشکی به ویژه درمان بیماری‌های صعب‌العلاج پیدا کرده است و بسیاری از جوانان نیز علاقمند به ادامه تحصیل در اینگونه حوزه‌ها شده‌اند.

بدون شک دانش‌آموزان به عنوان آینده‌سازان کشور همواره مشتاق هستند تا اطلاعات جامعی در زمینه علوم و فناوری‌های نوین و حیطه‌های علمی مورد نیاز جامعه دریافت نمایند تا بر اساس علایق و استعدادشان آینده علمی خود را ترسیم نمایند. از این رو طراحی و برگزاری المپیادهای علمی در رشته‌های مختلف می‌تواند استعدادهای کشور را در مسیرهای نوین و مورد نیاز رهنمون سازد.

المپیاد دانش‌آموزی سلول‌های بنیادی و پزشکی بازساختی نیز فرصت بسیار مطلوبی را برای سیاست‌گذاران حوزه علوم سلولی کشور فراهم می‌آورد تا سرمایه‌های جوان کشور را با آینده‌درخشان علوم و فناوری‌های سلول‌های بنیادی و پزشکی بازساختی آشنا نموده و استعدادهای علاقمند به این حوزه را شناسایی و راهبری نماید.

دکتر امیرعلی حمیدیه

دبیر ستاد توسعه علوم و فناوری‌های سلول‌های بنیادی

قال الله تعالى:

وَلَقَدْ خَلَقْنَا الْإِنْسَانَ مِنْ سُلَالَةٍ مِنْ طِينٍ* ثُمَّ جَعَلْنَاهُ نُطْفَةً فِي قَرَارٍ مَكِينٍ* ثُمَّ خَلَقْنَا النَّطْفَةَ عَلَقَةً فَخَلَقْنَا الْعَلَقَةَ مُضْغَةً فَخَلَقْنَا الْمُضْغَةَ عِظَامًا فَكَسَوْنَا الْعِظَامَ لَحْمًا* ثُمَّ أَنْشَأْنَاهُ خَلْقًا آخَرَ فَتَبَارَكَ اللَّهُ أَحْسَنُ الْخَالِقِينَ* {
المؤمنون: ۱۱-۱۳}

المیاد سلول های بنیادی و پزشکی بازساختی؛ المیادی از جنس آینده

در تبیین مفهوم المیاد، مفاهیم فراوانی پنهان است. یکی از اهداف بسیار مهم برگزاری این آزمون ها سنجش و اهمیت دادن به میزان عمق نگرش و خلاقیت آزمون دهندگان است. یعنی همان گمشده ای که متأسفانه بنا به اظهار بسیاری از متخصصین و کارآفرینان عصر حاضر، در روند فعلی آموزش مورد اغفال واقع شده است و روند رو به رشد آزمون های چهار گزینه ای متکی بر تفکر همگرا، خلل عمده ای بر تداوم ذهنیت نوآوری و مبتنی بر خلاقیت آزمون دهندگان وارد کرده است. از طرف دیگر به نظر می رسد معیار قرار دادن نمرات درسی و معدل به عنوان شاخصی در راستای انتخاب اولیه آزمون دهندگان نشانگر میزان رسوخ تفکر سنجش بر مبنای سطوح دانشی در سیستم آموزشی می باشد.

نکته بسیار مهم دیگری که در این میان وجود دارد، ظهور علوم و فناوری های نوینی است که بر خلاف تفکر نیوتنی و تجزیه گرا، میل وافر به همپوشانی و همکاری بین دانشمندان این عرصه ها را طلب می نماید که مصداق بارز آن حرکت به سمت فناوری های همگرا یا NBICS می باشد. اندیشه ای که پستوانه ظهور المیاد سلول های بنیادی و پزشکی بازساختی می باشد با مدنظر قرار دادن اصول متعدد زیر، هم در روش و هم در اجرا به نوآوری دست زده است:

• اصالت تفکر خلاقانه واگرا

• رشد روزافزون اهمیت فناوری های همگرا

• ارزش والای کار گروهی

با توجه به این موضوع و این نکته که آینده پروران کشورمان از بین دانش آموزان فرهیخته این مملکت رشد خواهند یافت. ستاد توسعه علوم و فناوری های سلول های بنیادی بر آن شده است تا نسبت به آشنایی، ترویج و آموزش آینده سازان کشورمان اقدام نماید و در این





راستا اقدام به برگزاری المپیاد سلول های بنیادی و پزشکی بازساختی کرده است. این المپیاد ویژگی‌های متمایزی نسبت به سایر المپیادها دارد و علیرغم این‌که در شروع آن حائز جوایز مشابه با سایر المپیادها نیست به نظر می‌رسد به دلیل اینکه نگاه چند رویکردی به علوم دارد می‌تواند برای دانش آموزان بسیار جذاب باشد. با توجه به برتری اصالت نگرش بر دانش بر آن شدیم تا نسبت به غربالگری اولیه دانش آموزان بر مبنای معدل چشم پوشی کنیم در همین راستا تمامی دانش آموزان چه در حیطه علوم تجربی و چه در ریاضی فیزیک در یک فرصت یکسان نسبت به عملکردها و توانایی های خود در نگرش به علوم سلول های بنیادی و پزشکی بازساختی که یک نگرش تلفیقی از زیست شناسی، فیزیک، ریاضی، شیمی، مواد و سایر علوم به شمار می‌رود بهره ببرند. در ضمن برای اولین بار برای برگزیدگان نهایی این المپیاد، دوره‌های آموزشی فناوری به صورت کامل برگزار شده و علاوه بر آن بعد از ورود به دانشگاه در رشته‌های مرتبط گزینت پژوهشی در اختیارشان قرار خواهد گرفت تا این راه را در ادامه در دانشگاه نیز طی نمایند تا بتوانند نسبت به خلق ثروت از ایده در حوزه علوم و فناوری‌های نوین بیشتر موفق باشند.

نگاه رو به آینده این المپیاد علاوه برداشتن جنبه ترویج علم و فناوری در بین آینده سازان میهن، چشم اندازهای زیر را به منظر نشسته است:

- برگزاری المپیاد دانشجویی برای دانشجویان تحصیلات تکمیلی علاوه بر دانشجویان دوره کارشناسی
- برگزاری المپیاد به صورت گروهی علاوه بر حالت انفرادی
- حرکت به سمت برگزاری بین المللی المپیاد و ثبت جمهوری اسلامی به عنوان بنیان گذار المپیاد در سطح بین المللی

در انتها طبق قاعده «من لم یشکرالمخلوق لم یشکر الخالق» وظیفه خویش می دانم که از زحمات تمامی سروران بزرگوارم در وزارت آموزش و پرورش و ستاد توسعه علوم و فناوری سلول های بنیادی – که این مقال جز به همت تک تک ایشان عرصه مجال نمی یافت – تشکر و قدردانی نمایم و به ویژه از معلم اخلاق جناب آقای دکتر حمیدیه، به خاطر تلاش شبانه روزیشان در اعتلای میهن عزیزمان سپاسگزاری نمایم و همین طور مراتب منت داری خویش را از استاد بزرگوار خویش جناب آقای دکتر جعفر آی، که پیشتر از این، با برپایی آزمون های متعدد سلول های بنیادی در مناطق آموزش و پرورش استان تهران، راه را در مسیر ایده پردازی و تحقق این مهم هموار نموده و طلایه داری این عرصه را نقش آفرینی نمودند اعلام دارم.

تاچه قبول افتد که در نظر آید

دکتر پیمان کیهان ور

مدیر روابط عمومی و امور بین الملل

ستاد توسعه علوم و فناوری های سلول های بنیادی



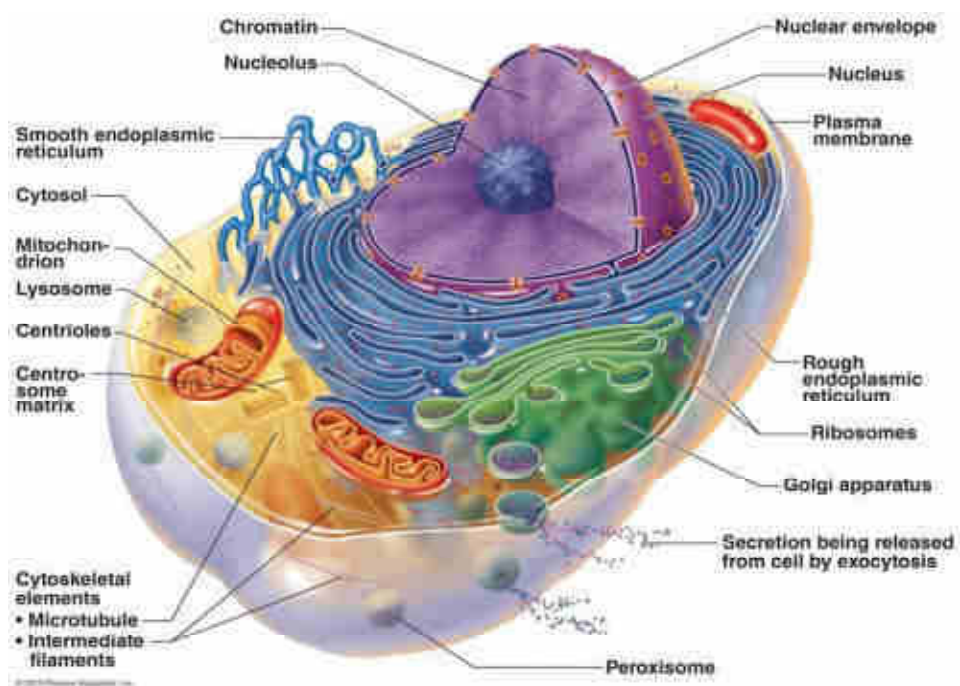
فهرست:

- فصل اول : کلیات سلولی.....۸
- فصل دوم : سلول های بنیادی.....۶۲
- فصل سوم : تجهیزات موجود در آزمایشگاه.....۷۷
- فصل چهارم : کشت سلول و روش های رنگ آمیزی سلولی.....۱۰۲



فصل اول

دنیای سلول



مفاهیم کلیدی :

۱.۱ غشای سلول

۱.۲ اندامک های سلول

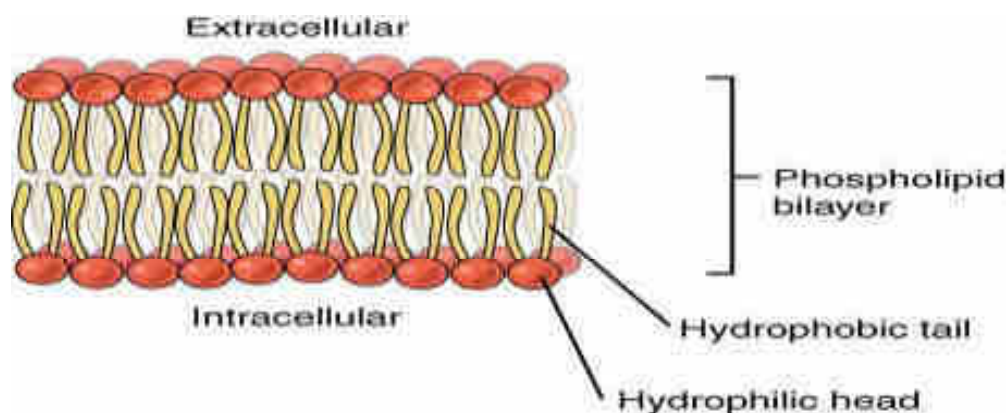
۱.۳ ساختار سلول

۱.۴ ارتباطات بین سلولی



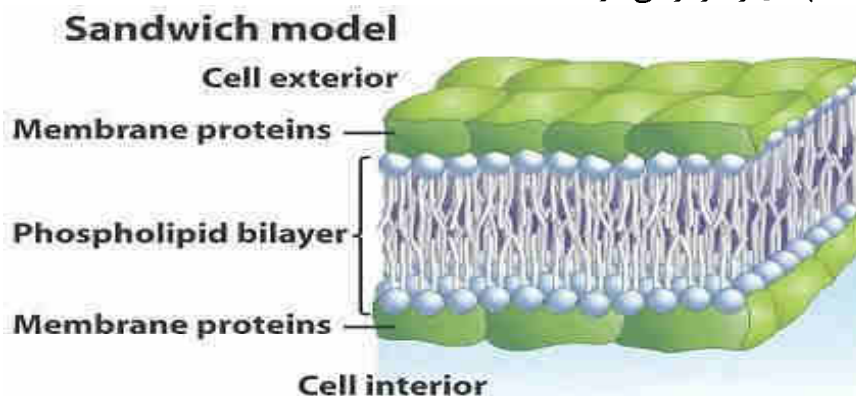
۱.۱ بررسی ساختار غشا

ابتدایی ترین تلاش ها برای پی بردن به ساختار غشا با جدا کردن آن از سلول های قرمز خون آغاز شد. سلول های قرمز خون دارای ویژگی مهمی هستند و آن این است که هیچ اندامک داخلی ندارند. در نتیجه بررسی غشای آنها فقط غشای اطراف سلول را در بر می گیرد و شبکه غشا داخلی در نتیجه آزمایش ها، اختلال ایجاد نمی کند. آنالیز های شیمیایی نشان داده که غشا از پروتئین و لیپید دو لایه ساخته شده اند. پی بردن به دو لایه بودن غشا به واسطه اندازه گیری سطح آبی که لیپید استخراج شده از غشا پوشانده بود میسر شد. زیرا فسفولیپید های غشا به صورت تک لایه روی آب شناور می مانند و علت این شناوری تک لایه وجود دو بخش متفاوت آبگریز (اسید های چرب فسفولیپید) و آبدوست (سر فسفات) فسفولیپید های غشا است.



شکل ۱- فسفولیپید های غشا دارای دو بخش آبگریز و آبدوست هستند

وجود پروتئین با بررسی کشش سطحی لیپید ها به تنهایی و مقایسه آن در حالتی که مقداری پروتئین به آن اضافه شده باشد روشن گردید. اضافه کردن پروتئین به لیپید، کشش سطحی آنرا کاهش می دهد. اولین نظریه ای که غشایی را با دو لایه لیپیدی و حضور پروتئین متصور کرده است طرح ساندویچی بود که توسط داوسون و دانیلی مطرح شد. در این مدل دو لایه پروتئینی، دو لایه لیپیدی را در بر می گرفتند.

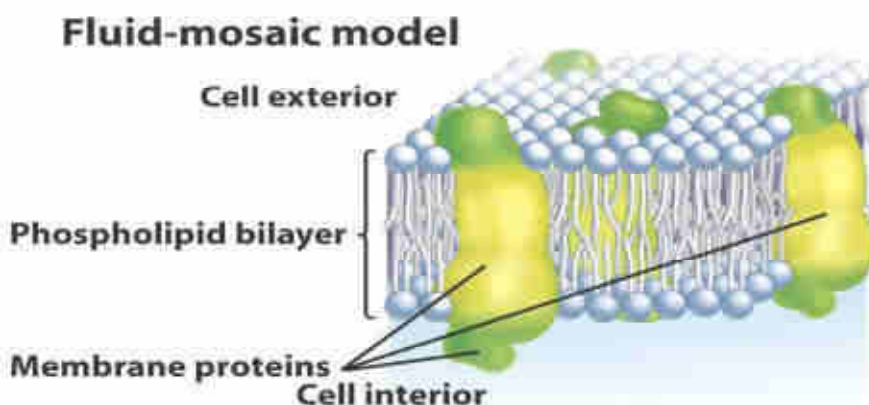




شکل ۲-مدل ساندویچی که در ابتدا به ساختار غشا نسبت داده شد.

اما این طرح دو اشکال بزرگ داشت:

- ۱- غشا سلول ها با عملکرد متفاوت، ساختار و ترکیب شیمیایی متفاوتی دارند و یک الگو برای همه ی آنها صادق نیست.
- ۲- پروتئین های غشایی هم بخش آبدوست و هم بخش آبگریز دارند. حضور دو لایه پروتئینی در اطراف لایه لیپیدی قسمت آبگریز پروتئین را در تماس با محلول قرار می دهد. پژوهش های سینگر و نیکلسون در ۱۹۷۲ نقطه عطف تمامی پژوهش ها در زمینه ساختار غشا بود. آنها وجود پروتئین ها را به گونه ای در دو لایه غشا تصور کردند که قسمت های آبدوست آنها از غشا بیرون زده و با محیط خارجی آبدوست در تماس هستند. همچنین قسمت های آبگریز پروتئین در بخش آبگریز غشا قرار می گیرند.



شکل ۳-مدل موزائیک سیال، مدلی که امروزه مورد تائید قرار گرفته است.

۱.۱.۱ پروتئین های غشا

پروتئین های غشا نقش های بسیار مهم و متفاوتی ایفا می کنند. حضور این پروتئین ها عامل فعالیت های زیستی است که غشا با انجام آنها توانایی حفظ سلول را به حالت پایدار دارد. این پروتئین ها هستند که باعث انتقال یون ها به دو طرف غشا می شوند. عملکرد آنزیمی، انتقال پیام های سیگنالینگ تنها با حضور پروتئین ها امکان پذیر می شود. و این پروتئین ها هستند که عاملی برای اتصال دو سلول به هم یا سلول با محیط خارجی خود و عاملی برای شناسایی هر سلول می شوند.



با این وجود حدود ۵۰٪ جرم غشا را پروتئین تشکیل داده است که البته این مقدار بسته به نوع سلول متغیر است. برای مثال سلول های محافظ آکسون سلول های عصبی که با ایجاد چندین لایه لیپید اطراف آکسون به انتقال سریع تر پیام عصبی کمک میکنند به پروتئین کمتری نیاز دارد و در آنها حدود ۲۵٪ جرم غشا را پروتئین تشکیل داده است. اما این عدد در غشا داخلی میتوکندری و کلروپلاست که عمده فعالیت خود را به محور حضور پروتئین انجام می دهند به ۷۵٪ رسیده است.

با توجه به جرم کمتر هر مولکول لیپید نسبت به یک مولکول پروتئین، حدوداً به ازای هر ۵۰ مولکول فسفولیپید یک مولکول پروتئین در غشا می توان یافت. باقی ساختار غشا شامل لیپید ها و بخش کمتری کربوهیدرات است.

پروتئین های غشا به دو بخش کلی تقسیم می شوند:

۱- پروتئین های سطحی (Peripheral)

۲- پروتئین های سراسری (integral)

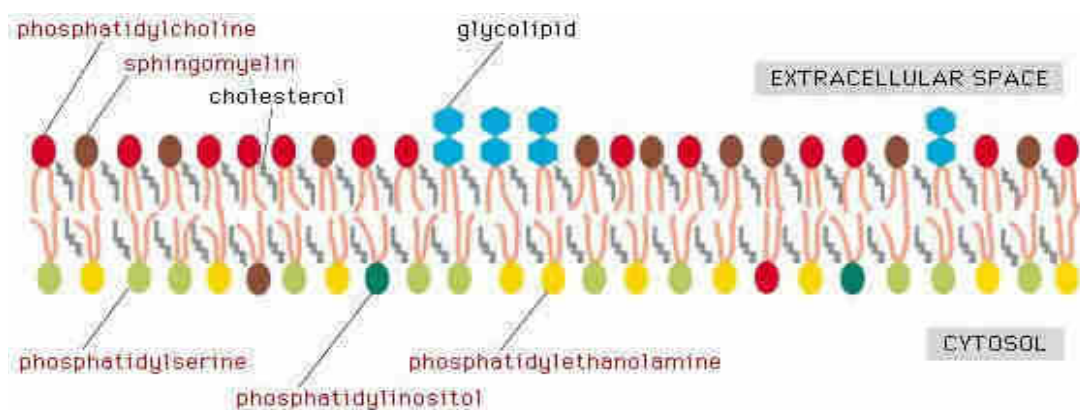
همانطور که از نام پروتئین های سطحی بر می آید این دسته از پروتئین ها راهی به داخل غشا ندارند و از طریق اتصال کووالان به لیپید های غشا متصل شده اند. این پروتئین ها می توانند به هر دو طرف خارجی و سیتوپلاسمی غشا متصل باشند.

اما پروتئین های سراسری متفاوت هستند. آنها مانند یک کانال از وسط غشا عبور کرده اند. بعضی از آنها از یک یا دو طرف غشا بیرون زده اند اما بعضی محدود به بخش ابگریز غشا لیپیدی می شوند.

پروتئین های غشا می توانند با فسفولیپید های قند دار در ارتباط باشند یا خود دارای قند باشند. این پروتئین های قند دار اصطلاحاً گلیکوزیله و فرآیند قند دار شدن را گلیکوزیلاسیون می نامند. حضور این قند ها برای عملکرد غشا ضروری است و یکی از راه های افتراق سلول ها از یکدیگر است.

۱.۱.۲ غشا پلاسمایی نامتقارن است

دو لایه غشایی به لحاظ ترکیب پروتئینی و فسفولیپیدی یکسان نیستند. حضور پروتئین های مختلف در دو لایه برای انجام عملکرد مناسب سلول مورد نیاز است. هر پروتئین با توجه به نقش خود می تواند در یک طرف غشا بیشتر ظاهر شود. جالب توجه است که تقریباً تمامی گلیکوپروتئین ها در سطح غشا پلاسمایی و سطح داخلی اندامک ها وجود دارند. (یعنی جایی که با سیتوزول در تماس نیست).



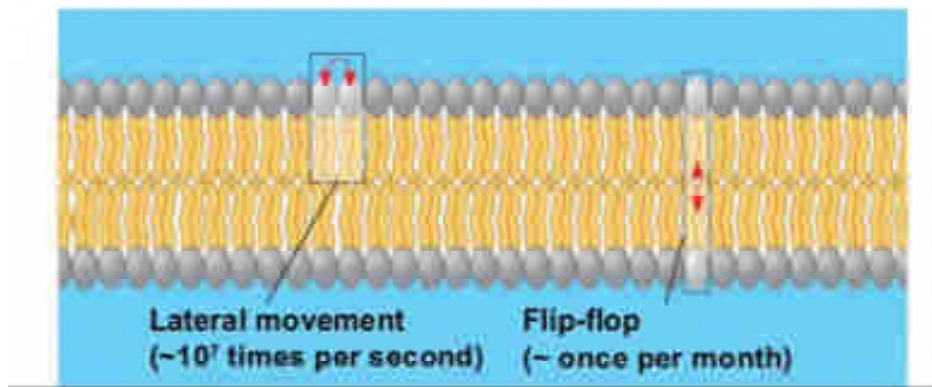
شکل ۵- غشا سلولی به لحاظ قرارگیری فسفولیپیدها و اجزای غشا در وضعیت نامتقارن قرار دارند.

۱.۱.۳ سیالیت غشا

غشا سلول های جانوران ثابت نیست و تحرک اجزای آن به عوامل مختلفی از جمله دما، میزان اشباع بودن دم های اسید چرب، نوع اسید چرب و میزان کلسترول وابسته است.

برای بررسی حرکت مولکول های غشا می توان قسمت قطبی اجزای غشا را نشاندار نمود و حرکت آنها را زیر نظر گرفت. طبق آزمایشات انجام شده سرعت حرکت مولکول های لیپیدی از 1nm/s در سلول های جانوری تا $1\mu\text{m/s}$ در باکتری ها مشاهده شده است.

حرکت لیپیدها به جابجایی در سطح غشا محدود نمی شود. حرکات مولکول های لیپیدی شامل حرکات جانبی (Lateral movement) و وارونه شدن (Flip Flap) و چرخش در محور دم های اسید چرب (Rotation) می باشد.

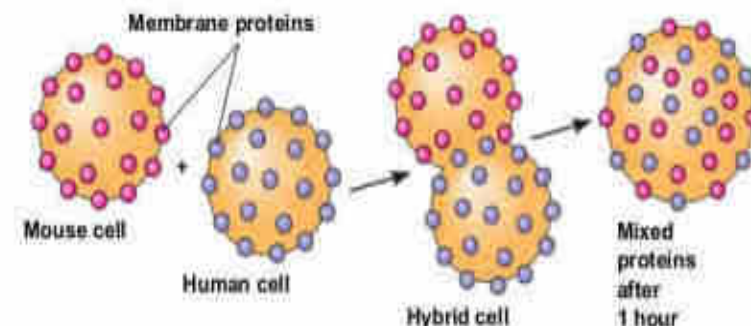


شکل ۶- حرکات مولکول های فسفولیپیدی انواع مختلفی دارد.

اگر در این حرکات دقت کنید متوجه یک تفاوت مهم در حرکت وارونه شدن می شوید. در این حرکت یک مولکول فسفولیپید باید کاملاً چرخیده و در تک لایه دیگر قرار گیرد. این حرکت مستلزم عبور سر قطبی فسفات از درون بخش آبگریزی اسید چربی است. این حرکت به لحاظ انرژی هزیننه بر است و در صورت نبود پروتئین های انتقال دهنده که با استفاده از انرژی حاصل از هیدرولیز ATP انرژی مورد نیاز این حرکت را فراهم می کنند؛ حدود یک بار در ماه خود به خود انجام می شود!

حرکت پروتئین های غشایی منطقی با سرعت کمتری انجام می شود و این به دلیل اندازه بزرگتر پروتئین ها نسبت فسفولیپیدهاست.

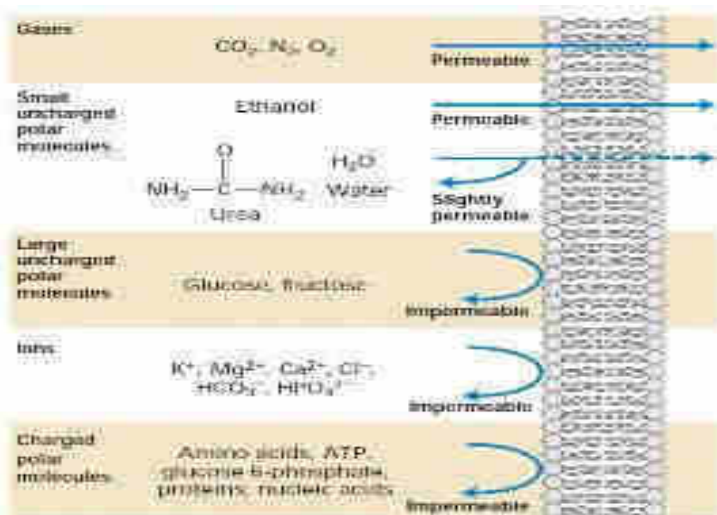
به عنوان مثال، حرکت یک پروتئین سطحی از یک قطب به قطب دیگر یک سلول ۲۰ میکرومتری، ۱۰ تا ۶۰ دقیقه طول می کشد. روش هم جوشی یا ادغام سلول، روشی دیگر برای نشان دادن سیالیت در غشا است. در این روش، سلول های مختلف در شرایط مناسب آزمایشگاهی با یکدیگر ادغام می شوند. فرای در سال ۱۹۷۰ با آزمایش معروفی توانست دو سلول موش و انسان را با هم ادغام کند. قبل از ادغام، غشای هر یک از این دو نوع سلول با رنگ های مختلف فلورسانت رنگ آمیزی شدند. مشاهده ی سلول ها بلافاصله پس از ادغام با میکروسکوپ فلورسانت نشان داد که هر سلول به شکل نیم کره قابل تشخیص بود. با گذشت زمان دو رنگ در سطح سلول پخش و به تدریج درهم ادغام شدند. فرای نتیجه گرفت که پخش رنگ ها به علت حرکت مولکول های غشا بود. بررسی های بعدی نشان داد که سیالیت، ویژه ی سلول های ادغام شده نیست و شاخص عمومی غشاها می باشد.



شکل ۷- حرکت پروتئین های سطح غشایی طی ادغام سلول موش و سلول انسانی

۱.۱.۴ ترابری مولکول های کوچک از غشا

ورود مواد به سلول یکی از چالش هایی است که غشا با آن رو به رو است. مواد در مبارزه برای عبور از این سد ۸ نانومتری محدودیت هایی دارند که به بررسی آنها می پردازیم. اورتون با استفاده از غشاهای مصنوعی فاقد پروتئین نشان داد که قابلیت نفوذ یک مولکول به درون دو لایه ی لیپیدی غشا، به اندازه مولکول و درجه حلالیت آن در لیپید بستگی دارد. هر مولکول برای عبور از غشا مجبور است از یک سد لیپیدی بگذرد پس هرچه حلالیت آن در چربی بیشتر باشد و اندازه ی آن کوچکتر باشد با سرعت بیشتری عبور می کند. نکته قابل توجه این است که بین یک مولکول قطبی و یک مولکول باردار با اندازه های یکسان، مولکول قطبی برای عبور سرعت بیشتری دارد.



شکل ۸-قابلیت نفوذ نسبی دو لایه ی لیپیدی مصنوعی نسبت به مولکول های مختلف. هر چه مولکول کوچکتر باشد و یا کمتر در آب حل شود. سرعت عبور آن از غشا بیشتر است. مولکول های بزرگ و یون ها از چنین غشایی عبور نمی کنند.

البته باید توجه کرد که مولکول ها از جایی به بعد دیگر توانایی برای عبور از غشا به خودی خود را ندارند. مثلاً مولکولی به بزرگی گلوکز با جرم مولی ۱۸۰ دالتون و یا یون هایی نظیر Cu با بار الکتریکی خالص توانایی عبور از سد لیپیدی غشا را ندارند. پس راه حل غشا برای عبور از غشا چیست؟ پروتئین های غشایی در این کار به کمک ما می آیند.

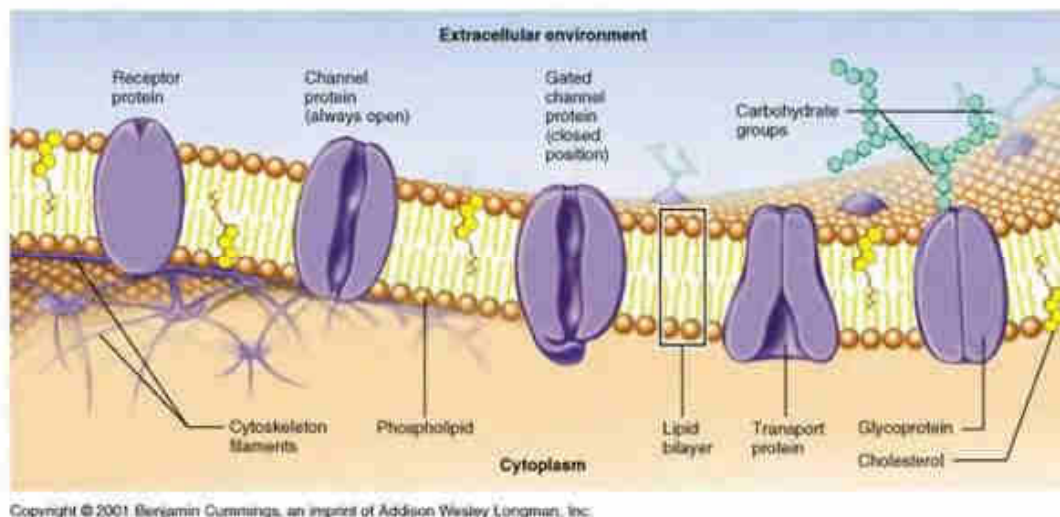
با کمک لیپوزوم ها می توان به بررسی پروتئین های خالص سازی شده در انتقال مواد پی برد. برای خالص سازی یک پروتئین خاص غشای گلبول قرمز را به وسیله مواد شوینده حل می کنیم و پروتئین انتقال دهنده گلوکز را خالص سازی می کنیم. (برای دانستن جزئیات بیشتر در رابطه با خالص سازی پروتئین به کتاب های مرجع مراجعه نمایید). این پروتئین ها بسیار اختصاصی عمل می کنند به شکلی که پروتئین انتقال دهنده گلوکز فقط شکل D آنرا انتقال می دهد و از انتقال شکل L آن جلوگیری می کنند. سایر قند های شش کربنی نظیر مانوز و گالاکتوز در صورت غلظت بالا شانس استفاده از این پروتئین ها را برای عبور دارند. چنین پروتئین های انتقال دهنده ای را که مواد را بدون نیاز به

برخورد آنها به غشا دو لایه از عرض غشا عبور می دهند پروتئین انتقال دهنده یا پرومناز می گویند. برای انتقال ماکرومولکول ها مکانیسمی متفاوت وجود دارد که بعدا آنرا شرح می دهیم.

۱.۵ پروتئین های انتقال دهنده ی غشا

پرومناز های غشایی به دو گروه پروتئین های حامل و پروتئین های کانالی تقسیم می شوند.

پروتئین های حامل برای عبور کردن یک مولکول از عرض غشا نیازمند تغییر شکل هستند به این صورت که با قرار گرفتن مولکول مورد نظر در جایگاه اتصال و تغییر شکل فضایی پروتئین حامل، مولکول منتقل شده رو به جهت دیگر آزاد می شود. اما پروتئین های کانالی چنین نیستند. آنها مانند یک مسیر انتقال دهنده در غشا حضور دارند و تغییر شکل پیدا نمی کنند. هر مولکولی که بار و اندازه مناسب داشته باشد می تواند از یک کانال عبور کند. البته کانال های اختصاصی مخصوص به یک یون هم وجود دارد. می توان نحوه اتصال هر مولکول انتقالی به حامل را می توان به اتصال سوبسترا به جایگاه فعال آن تشبیه کرد. که نسبت به عبور مولکول از کانال بسیار اختصاصی تر عمل می کند. آکوآپورین ها که برای انتقال آب استفاده می شوند مثالی مهم درباره کانال ها هستند. همچنین حامل گلوکز که در غشای سلول ها کاربرد فراوان دارد را به عنوان مثالی برای پروتئین حامل می توانید در نظر داشته باشد.



Copyright © 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

شکل ۹-انواع پروتئین های انتقال دهنده غشا

بررسی انتقال مواد از عرض غشا به لحاظ سطح انرژی زایی

تمامی انتقال های انجام شده را در عرض غشا می توان به دو دسته کلی تقسیم کرد:

۱-انتقال فعال

۲-انتقال غیرفعال

همانطور که از نام این دو دسته بر می آید انتقال فعال نیازمند مصرف انرژی است. در حالی که انتقال غیر فعال به انرژی نیاز ندارد.

انتقال غیر فعال

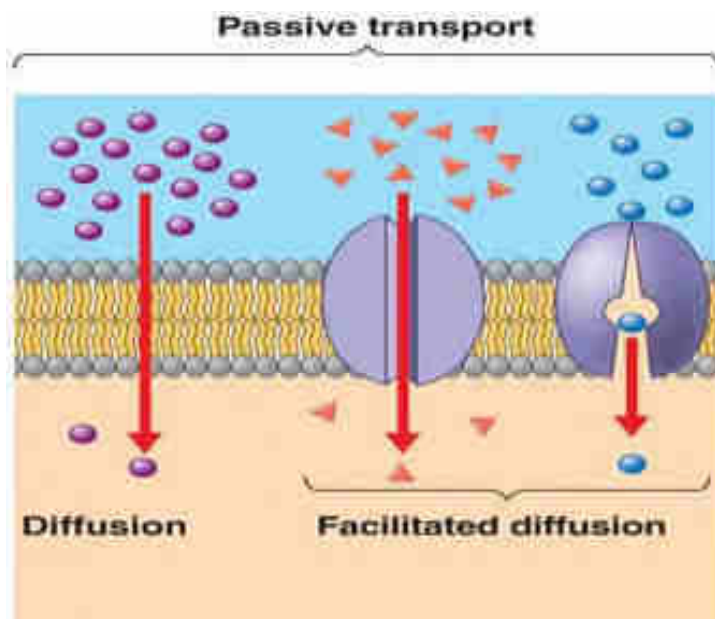
به دو طریق مولکول ها امکان حرکت غیر فعال از عرض غشا را دارند.

۱-عبور به وسیله انتشار ساده از خلال غشای لیپیدی

۲-عبور با کمک پروتئین های انتقال دهنده

نکته قابل توجه این است که این انتقال همواره در جهت شیب غلظت انجام می شود و در حقیقت همین موضوع باعث عدم نیاز به انرژی است. برای مولکول های باردار یک عامل پتانسیل الکتریکی هم علاوه بر شیب غلظت در حرکت از عرض غشا تاثیر گذار است. پتانسیل غشا از اختلاف بار الکتریکی در دو طرف غشا ایجاد می شود. جالب است که این بار الکتریکی خود حاصل غلظت یون های مختلف با بار های مختلف در دو سمت غشاست. یعنی یک یون منفی برای ورود به طرف مثبت غشا کار ساده تری پیش رو دارد تا اینکه بخواهد به طرفی با بار منفی وارد شود.

اگر این انتقال به کمک پروتئین های انتقال دهنده انجام شود به آن انتشار تسهیل شده می گویند و اگر از عرض غشا بدون کمک پروتئین باشد، آنرا انتشار ساده می نامند. توجه به شیب الکتروشیمیایی و عدم توانایی غشا برای انتقال مولکول ها خلاف این شیب، مهمترین نکته در انتقال غیر فعال است.

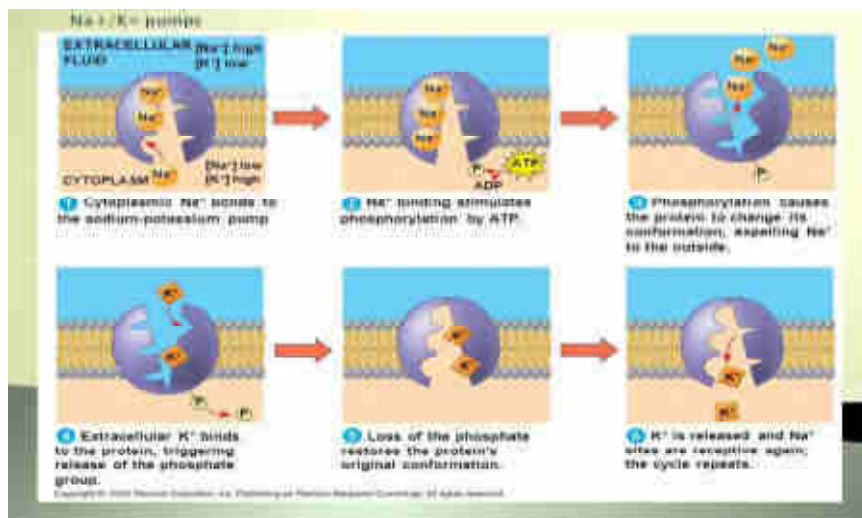


شکل ۱۰-انتقال غیر فعال تنها در جهت شیب الکتروشیمیایی انجام می شود.

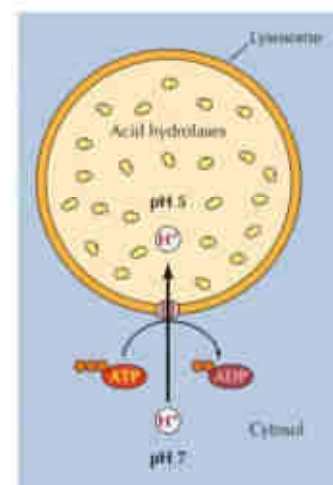
انتقال فعال

در انتقال فعال پروتئین های این توانایی را دارند که با مصرف انرژی، مواد را بر خلاف شیب غلظتشان از عرض غشا عبور دهند. این انرژی لازم از توام شدن واکنش انتقال مولکول با واکنش های انرژی زای درون سلول تامین می شود. یکی از واکنش های مرسوم انرژی که با انتقال فعال جفت می شود، هیدرولیز ATP توسط آنزیم ATP-آز است. برخی مولکول-های ATP-آز در غشای سلول جای گرفته اند. پمپ سدیم - پتاسیم-ATP-آز یکی از مهمترین مثال های پمپ هاست که در آن پروتئین های حامل، از انرژی موجود در ATP استفاده می کنند تا یون های سدیم و پتاسیم را از غشا عبور دهند.

گفتیم پتانسیل غشا حاصل اختلاف غلظت یون های مختلف در دو طرف غشا است. غلظت پتاسیم در داخل سلول حیوانی ۱۰ تا ۲۰ برابر بیش از محیط خارج از آن و بر عکس غلظت سدیم داخل سلول کمتر از محیط خارج می باشد. در نتیجه یون های پتاسیم و سدیم باید بر خلاف شیب الکتروشیمیایی خود به ترتیب وارد سلول شده و یا از آن خارج شوند. این فرآیند نیاز به مصرف انرژی دارد. این انرژی توسط هیدرولیز ATP توسط پمپ سدیم-پتاسیم ATP-آز تامین می شود که در آن ۳ یون Na^+ از سلول به محیط خارجی منتقل شده و ۲ یون K^+ به سلول وارد می گردد. آزمایشات انجام شده نشان می دهد که با از کار انداختن پمپ سدیم-پتاسیم ATP-آز این اختلاف غلظت سدیم و پتاسیم حفظ نمی شود. برهم خوردن این غلظت ها بر پتانسیل اسمزی سلول هم تاثیرگذار است و ممکن است باعث ورود آب به سلول، تورم و در نهایت ترکیدن آن شود. از پمپ های مهم دیگر می توان پمپ کلسیم را نام برد که در انقباض و انبساط ماهیچه ها نقش مهمی دارد. همچنین وجود پمپ پروتونی (H^+) در غشای اندامک هایی نظیر لیزوزوم و واکوئول در سلول های گیاهی برای پایین نگاه داشتن PH درون این اندامک ها ضروری است.



شکل ۱۲- عملکرد پمپ سدیم-پتاسیم ATP-آز برای خارج کردن یون سدیم از سلول و وارد کردن پتاسیم از محیط خارجی به داخل سلول



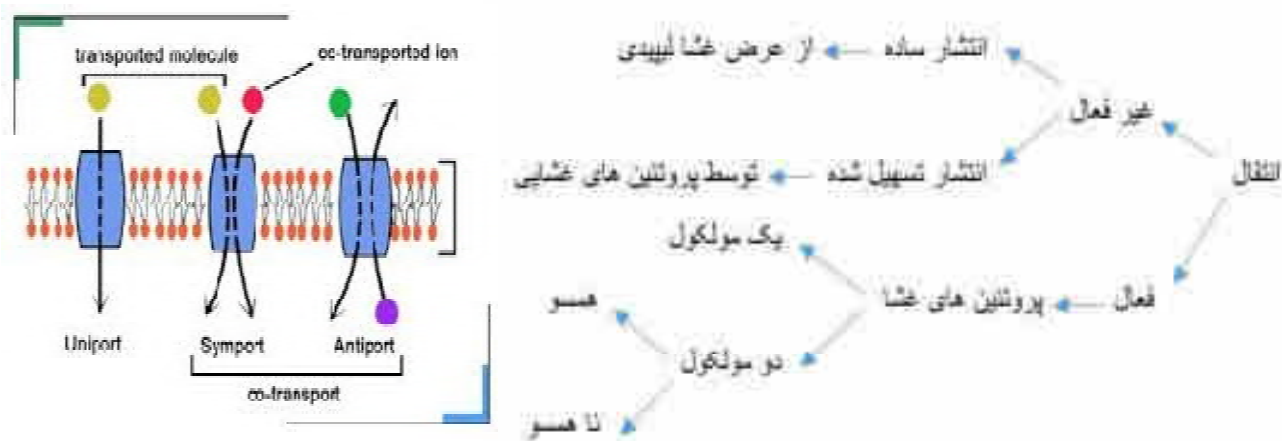
شکل ۱۱- افزایش غلظت داخلی یون هیدروژن در لیزوزوم



پروتئین های حامل در انتقال فعال می توانند به دو نوع عمل کنند. نوع اول آن است که عملکرد آن ها باعث جابجایی تنها یک مولکول از عرض غشا شود. نوع دوم آن است که نتیجه انتقال جابه جایی دو نوع یون مختلف باشد و این خود به دو روش امکان پذیر است. روش اول آن است که هر دو مولکول از یک سمت به سمت دیگر بروند و با هم هم جهت باشند. این انتقال را انتقال همسو می نامند. روش دوم آن است که دو مولکول در دو جهت مخالف منتقل شوند و به این معناست که ورود یکی به سلول همزمان با خروج یون دوم از سلول باشد. این نوع را انتقال نا همسو می نامند. جذب قند گلوکز در اکثر سلول های حیوانی مثالی از انتقال یک مولکول به تنهایی است. غلظت گلوکز در محیط بیرون این سلول ها بیشتر از داخل آنهاست و گلوکز به وسیله ی پروتئین های حامل آن با روش انتشار تسهیل شده از خارج به داخل سلول ها وارد می شود. نحوه ی انتقال گلوکز به داخل سلول های روده و کلیه با نحوه ی انتقال آن به اغلب سلول های حیوانی متفاوت است. غلظت گلوکز در محیط روده و لوله چه های کلیه کمتر از درون سلول ها است. این سلول ها گلوکز را به همراه یون سدیم که غلظت آن در خارج سلول بیشتر است، همزمان وارد می نمایند. بنابراین انتقال گلوکز و سدیم در سلول روده و کلیه موردی از انتقال همزمان دو مولکول در یک جهت است.

اهمیت این پمپ ها وقتی مشخص می شود که ما متوجه شدیم شرایط محیطی برای یک باکتری مانند یک موجود عالی تنظیم شده و ثابت نیست و مواد غذایی، اسیدهای آمینه ویتامین ها و غیره متغیر هستند.

شکل زیر جمع بندی خوبی برای پروتئین های غشایی است:



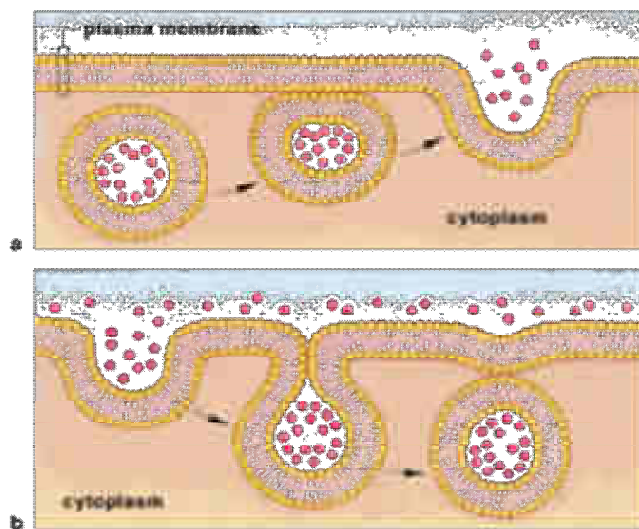
شکل ۱۳- تقسیم بندی انواع انتقال های غشایی

انتقال ماکرومولکول ها

قبلاً به این موضوع اشاره کردیم که تمامی مکانیسم های انتقالی مواد توسط پروتئین های غشایی تنها مختص به مولکول های کوچک می باشد و برای ورود و خروج ماکرومولکول ها مکانیسم های متفاوتی وجود دارد. راه حل سلول برای ورود و خروج ماکرومولکول ها که امکان عبور آنها از عرض غشا ممکن نیست استفاده از کیسه های کوچکی از جنس غشا به نام وزیکول است. این وزیکول ها مولکول های موردنظر برای انتقال را مانند یک کیسه درون خود جای می دهند و به درون سلول می برند یا از آن خارج می سازند. مولکول ها توسط حامل لیبیدی خود به مقصد برده میشوند و در طول مسیر یا محیط خارجی (سیتوپلاسم) تماس ندارند.

مارکر های سطحی وزیکول ها به انتخاب درست مقصد هر محموله کمک می کنند. در واقع با کمک این پروتئین های سطحی وزیکول هاست که هر وزیکول تنها با غشا هدف خود ادغام می شود و مولکول های انتقالی به جای اشتباهی برده نمی شوند.

به داخل بردن مواد را که با جدا شدن بخشی از غشا همراه است اندوسیتوز و خارج کردن آنها را که با ادغام وزیکول با غشا همراه است اگزوسیتوز می گوئیم. با کمی دقت در می یابید که فرآیند اندوسیتوز باعث کاهش مساحت غشا و اگزوسیتوز سبب افزایش مساحت غشا می شود. اما باید توجه داشت این فرآیند های ادغامی وزیکولی به نحوی در حال رخ دادن است که سلول مساحت غشا را با انجام اندوسیتوز و اگزوسیتوز در جواب یکدیگر در تعادل نگه میدارد و افزایش یا کاهش بیش از حد آن جلوگیری میکند. ادغام غشا وزیکولی نیازمند انرژی است زیرا مولکول های باردار سطح غشایی شرایط ویژه ای را برای ادغام ایجاد می کنند.



شکل ۱۴- فرآیند اگزوسیتوز (a) و اندوسیتوز (b) برای انتقال ماکرومولکول ها استفاده می شود.

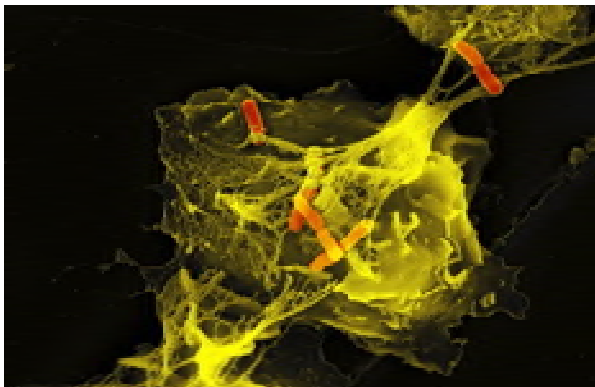
اگزوسیتوز

فرآیند اگزوسیتوز اولین بار در سال ۱۹۵۷ شناسایی شد. در این فرآیند ماکرومولکول‌هایی که باید از سلول خارج شوند در وزیکول قرار می‌گیرند، به غشای پلاسمایی منتقل می‌شوند، و پس از ادغام با آن محتوای خود را به خارج رها می‌سازند. دو نوع اگزوسیتوز در سلول دیده می‌شود. نوع اول اگزوسیتوز دائمی است و برای انتقال ماکرومولکول‌هایی که باید دائماً به خارج ترشح شوند استفاده می‌شود. ترشح کلاژن، پروتئینی که در اکثر بافت‌های بدن یافت می‌شود از این طریق صورت می‌گیرد. در نوع دوم یا اگزوسیتوز تنظیم شده، انتقال ماکرومولکول‌ها به خارج سلول تنها در پاسخ به پیام‌هایی از بیرون سلول صورت می‌گیرد. مثلاً سلول‌های ترشح‌کننده هیستامین پس از دریافت پیام‌های شیمیایی، هیستامین را از سلول به خارج ترشح می‌کنند. ترشح هیستامین باعث بروز واکنش‌های حساسیت یا آلرژی نظیر خارش و عطسه می‌شود. سلول از مکانیسم اگزوسیتوز در دفع مواد اضافی به فضای خارج سلولی، ترشح انتقال‌دهنده‌های عصبی توسط نورون‌ها به فضای سیناپسی برای انتقال پیام و ... استفاده می‌کنند.

اندوسیتوز

عکس فرآیند اگزوسیتوز را اندوسیتوز می‌دانیم. اندوسیتوز به سه روش انجام می‌شود:

۱- فاگوسیتوز که از مکانیسم‌های اصلی سیستم ایمنی برای مقابله با پاتوژن‌هاست و بخش مهمی از عملکرد سیستم ایمنی وابسته به فاگوسیت‌های عامل بیماری‌زا است. سلول‌های سفید خونی در این فرآیند، عامل بیماری‌زا را با ایجاد پاهای کاذب احاطه می‌کنند و سپس عامل بیماری‌زا را به لیزوزوم انتقال می‌دهند تا مراحل هضم در آنجا انجام شود. ایجاد پاهای کاذب به کمک تغییرات ریز رشته‌ها (microfilament) درون سلولی انجام می‌شود. درباره اندامک لیزوزوم در ادامه مطالب بیشتری خواهید خواند. سلول‌هایی که عملاً فاگوسیتوز را انجام می‌دهند، عبارت‌اند از تک‌یاخته‌های یوکاریوتی مثل آمیب‌ها و برخی گلبول‌های سفید خونی مانند نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها در پستانداران. در تک‌یاخته‌ها، فاگوسیتوز همچون اندوسیتوز به منظور تغذیه ارگانیزم به کار می‌رود. در موجودات عالی، فاگوسیتوز یکی از مهمترین راه‌های دفاع بدن در مقابل باکتری‌ها و جلوگیری از عفونت است. علاوه بر این، هضم سلول‌های صدمه‌دیده، مثل گلبول‌های قرمز که عمر کوتاهی دارند، از وظایف مهم سلول‌های ریزه‌خوار در این جانداران است.



شکل ۱۵- تصویر میکروسکوپ الکترونی از یک

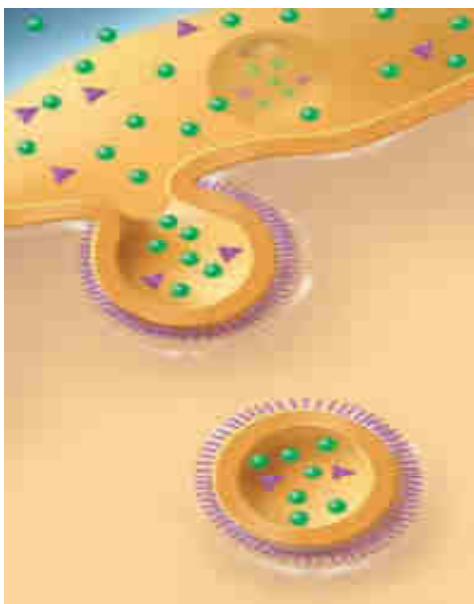
نوتروفیل که در حال فاگوسیتوز یک باکتری در حال تقسیم است.

۲- اندوسیتوز اختصاصی: توسط گیرنده های سطح غشایی انجام می گیرد و معمولاً به منظور وارد کردن ماکرومولکول هایی با غلظت کم است. ماکرو مولکول ها با اتصال به گیرنده های سطح غشایی و جدا شدن بخشی از غشا وارد سلول می شوند.

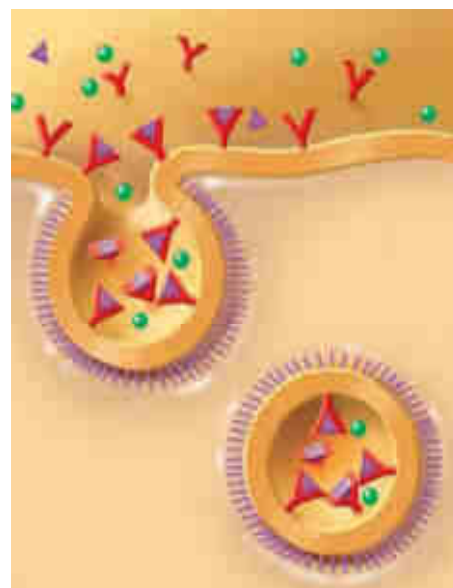
لیگاند اصطلاحی کلی است برای هر نوع مولکولی که به گیرنده خاص خود متصل می شود. گیرنده های عمدتاً پروتئینی مختص این نوع اندوسیتوز برای لیگاند خود تمایل بالایی دارند تا حتی کمترین غلظت آنها در محیط را هم جذب کنند. یک مثال معروف برای چنین گیرنده هایی جذب کلسترول به داخل سلول های حیوانی است. پروتئین های گیرنده در ناحیه ای از غشا به نام فرورفتگی های پوشش دار گرد هم می آیند. تجمع این پروتئین های پوششی محل انجام اندوسیتوز است. بعد از رساندن وزیکول حاوی کلسترول یا هر ماده ی انتقالی دیگر، مجدداً گیرنده های سطح سلولی و پروتئین های پوششی به غشا باز می گردند تا در اندوسیتوز های بعدی مورد استفاده قرار گیرند. از پروتئین های پوششی مهم می توان به کلاترین اشاره کرد. کلسترول برای ساخت غشا جدید به سیتوپلاسم منتقل می شود.

۳- اندوسیتوز غیر اختصاصی: در این نوع اندوسیتوز خبری از گیرنده های سطح سلولی نیست. سلول بخشی از مایع اطراف خود را درون وزیکول هایی به داخل می آورد. هدف اصلی مولکول های محلول درون مایع هستند. این نوع اندوسیتوز را اصطلاحاً پینوسیتوز نامیده می شود که عملکرد آن به طور واضح نشان می دهد اختصاصیت ندارد.

سلول عملکرد بی نظیر خود را تا حد بسیار زیادی مدیون زحمات غشای سلولی است!



شکل ۱۶- اندوسیتوز غیر اختصاصی

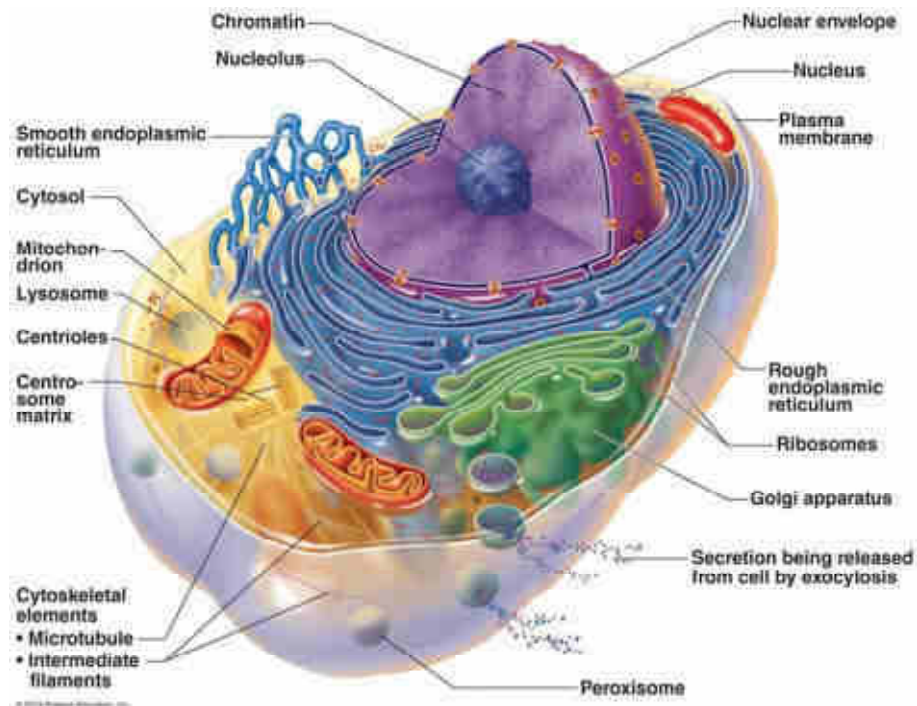


شکل ۱۵- اندوسیتوز اختصاصی

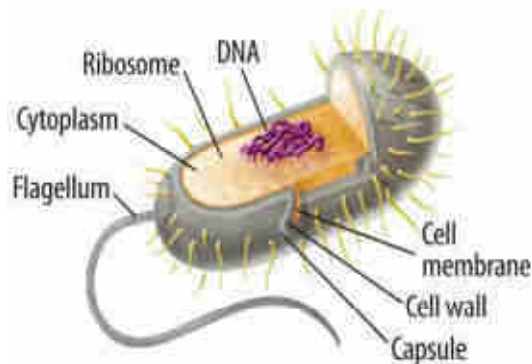
۱.۲ اندامک های سلولی

همانند سلول های مختلف بدن که هر یک مارکر خاصی در سطح خود دارند و با آن شناخته می شوند، اندامک ها و ساختار های درون سلولی هم می توانند توسط مواد مختلف نظیر رنگ ها نشاندار شده و از هم افتراق یابند و این به دلیل خواص متفاوتی است که در هر یک از آنها وجود دارد که آنها را نسبت به ماده ای نشانگر واکنش پذیر می کند.

با پیشرفت روش های آزمایشگاهی امکان تخلیص جداگانه هر یک از اندامک ها میسر شد و مشخص گردید سلول های یوکاریوتی نسبت به پروکاریوتی پیچیدگی بیشتری دارند. حضور هسته در سلول های یوکاریوتی پرچمدار این پیچیدگی است.



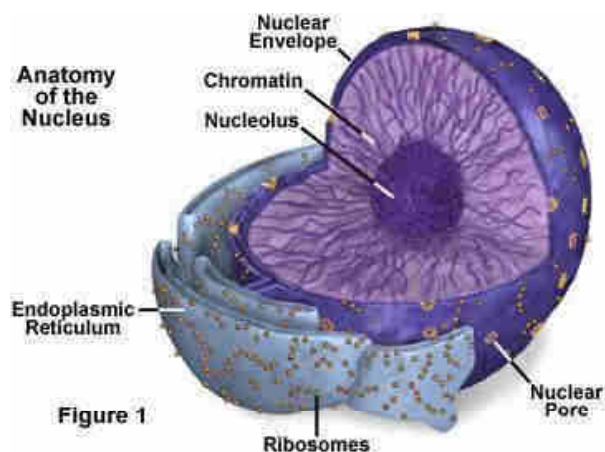
شکل ۱۷- سلول یوکاریوتی (نوع جانوری)



شکل ۱۸- سلول پروکاریوتی

۱.۲.۱ هسته

هسته در یک دید کلی مرکز فرماندهی سلول است. مکان ذخیره ی ژنوم هر سلول درون هسته آن است و رونویسی و همانندسازی از روی آن درون هسته انجام می شود. حدود ۱۰ درصد از حجم سلول را هسته اشغال می کند. هسته دارای دو لایه غشاست. (توجه کنید که هر لایه خود شامل دو لایه فسفولیپیدی است). غشای خارجی هسته در ادامه به شبکه آندوپلاسمی متصل می شود و بخشی از ریبوزوم های سلول روی این بخش سوارند. غشای داخلی هسته دارای پروتئین های اختصاصی است که جایگاه اتصال پروتئین هایی به نام لامین می باشد. از آموخته های فیزیک خود به خاطر دارید که بار های همانم یکدیگر را دفع می کنند. هنگام تقسیم سلولی وقتی زمان از بین رفتن پوشش هسته فرا میرسد (پرومتافاز)، پروتئین های لامین متصل به غشای داخلی فسفریله می شوند. این فسفریلاسیون به پروتئین های لامین بار منفی می دهد که باعث دفع یکدیگر شده و از هم گسیختگی پوشش غشا را سبب می شود. پروتئین های لامین با کروموزومها و RNA های هسته ای در تماس اند. بین غشای خارجی و غشای داخلی هسته فضای بین غشایی وجود دارد. در حقیقت این فضا در امتداد فضای داخلی شبکه اندوپلاسمی است. غشای خارجی و غشای داخلی در فواصل معین به هم پیوسته و سوراخها یا منافذی را به نام منافذ هسته ای بوجود می آورند. این منافذ ساختارهای پیچیده ای هستند که محل تردد مولکول ها بین سیتوزول و هسته می باشند. مایع درون هسته را نوکلئوپلاسم می نامند. نوکلئوپلاسم دارای پروتئین های متعددی است که در انجام اعمال منحصر به فرد هسته نقش ایفا می کنند. پروتئین های نظیر هیستون ها و آنزیم های تنظیم کننده رونویسی و همانندسازی.



شکل ۱۹- ساختار هسته سلول

این سوال مطرح است که آیا درون هسته، اسکلت یا ماده ی زمینه ای مشابه با اسکلت سلولی موجود در سیتوپلاسم وجود دارد یا خیر. پس از استخراج مواد گوناگون از هسته، ماده ای نامحلول باقی می ماند. این ماده دارای پروتئین هایی است که توانایی اتصال به توالی های خاصی از DNA را دارند. دانشمندان باور دارند که ماده ی نامحلول، ماده زمینه ای یا داربست هسته ای است. جزئیات ساختاری این ماده مشخص نشده است و ممکن است محصولی جنبی از روش های استخراج باشد. گاهی در فرایند استخراج یک ماده از سلول یا بافت و یا جداسازی یک سلول یا بافت از بدن، مواد شیمیایی که برای این منظور به کار می روند با مولکول های طبیعی بدن واکنش داده و ساختارها و ترکیبات بدن را تغییر می دهند. دانشمندان باید دقت کنند که این ترکیبات یا ساختارهای جدید را با آنچه بصورت طبیعی در بدن وجود

دارد اشتباه نگیرند. لذا دانشمندان مطمئن نیستند که این ماده به صورتی که استخراج می‌شود در سلول سالم هم موجود باشد.

تاریخچه کشف

تقریباً یک قرن پیش مایشر، پزشک سویسی، توانست با در معرض هیدروکلریک اسید قرار دادن لکوسیت‌های موجود در چرک، هسته‌ی آنها را جدا کند. او دریافت که اضافه کردن محلول بازی به هسته‌های جدا شده باعث تشکیل رسوب می‌شود. تجزیه‌ی شیمیایی رسوب نشان داد که شامل کربن، نیتروژن، هیدروژن و درصد قابل ملاحظه‌ای فسفر است. او این ماده را نوکلئین نامید که بعداً با تشخیص اسیدی بودن آن به نوکلئیک اسید تغییر یافت.

همزمان با مطالعات مایشر، فلمینگ با استفاده از میکروسکوپ نوری و رنگ آمیزی سلول‌ها، اجسام رشته‌ای شکلی را در هسته مشاهده نمود و آنها را کروماتین^۱ نامید. کمی بعد زاکاریاس دریافت که واکنش کروماتین نسبت به محلول‌های اسیدی و قلیایی مشابه نوکلئین است و نتیجه گرفت که نوکلئین و کروماتین از مواد مشابه درست شده‌اند. وی تا حدودی درست فکر می‌کرد زیرا کروماتین متشکل از DNA متصل به پروتئین است.

امروزه کروماتین به ساختاری متشکل از DNA و پروتئین که در دوره‌ی اینترفاز چرخه سلولی موجود است، گفته می‌شود. کروماتین شکل فعال ماده‌ی ژنتیک است، به این معنی که فرآیندهای همانند سازی و رونویسی در دوره‌ی اینترفاز بر روی کروماتین انجام می‌گیرند.

بسته بندی DNA:

جدول ۱ اندازه‌ی ژنوم‌هاپلوئید چند گونه‌ی مختلف را نشان می‌دهد. مشخصاً طول ژنوم همه‌ی این جانداران از قطر سلول‌های آن‌ها بسیار بیشتر است. اما DNA چگونه این قدر فشرده می‌شود؟ DNA برای اینکه در هسته قرار بگیرد و در مرحله‌ی متافاز تقسیم سلولی به حداکثر فشردگی برسد، باید در چندین مرحله فشرده شود (شکل ۲۰):

۱. نوکلئوزوم‌ها (دانه‌های تسبیح): فیبر ۱۰ نانومتری تنها با میکروسکوپ الکترونی دیده می‌شود
۲. فیبر ۳۰ نانومتری
۳. حلقه‌ها شعاعی (دمین‌های حلقوی)
۴. سطوح بالاتر پیچ خوردگی
۵. کروماتید: ۷۰۰ نانومتر

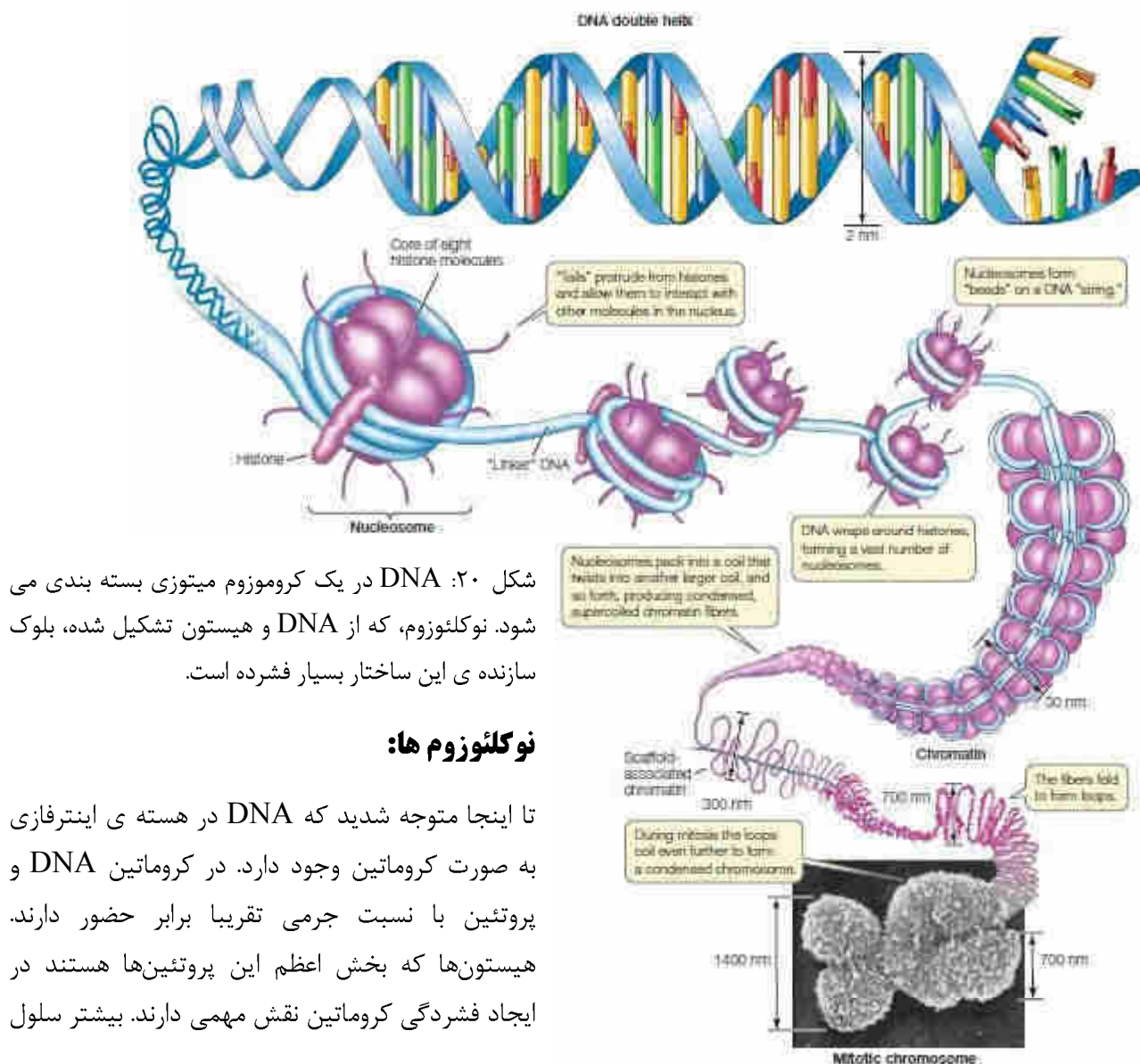
برای فشرده شدن کروماتین تا تبدیل شدن آن به کروموزوم متافازی مراحل بسیاری لازم است که تعداد کمی از آن‌ها شناخته شده، در نتیجه به توضیح مختصر بعضی از آن‌ها بسنده می‌کنیم.

^۱ Chroma: ریشه‌ی یونانی: به معنی رنگ است



Source	Molecular Weight	Base Pairs (bp)	Length
<i>Escherichia coli</i>	3.1×10^9	4.64×10^6	1.6 mm
<i>Homo sapiens</i> (human)	$\approx 2.3 \times 10^{12}$	$\approx 3.2 \times 10^9$	≈ 1.1 m
<i>Lilium longiflorum</i> (lily)	$\approx 2 \times 10^{14}$	$\approx 3 \times 10^{11}$	≈ 100 m

جدول ۱: اندازه ی ژنوم هاپلوئید چند گونه ی مختلف



شکل ۲۰: DNA در یک کروموزوم میتوزی بسته بندی می شود. نوکلئوزوم، که از DNA و هیستون تشکیل شده، بلوک سازنده ی این ساختار بسیار فشرده است.

نوکلئوزوم ها:

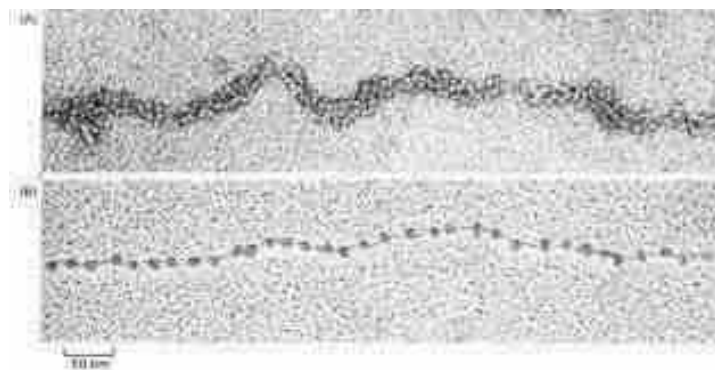
تا اینجا متوجه شدید که DNA در هسته ی اینترفازی به صورت کروماتین وجود دارد. در کروماتین DNA و پروتئین با نسبت جرمی تقریباً برابر حضور دارند. هیستون ها که بخش اعظم این پروتئین ها هستند در ایجاد فشرده گی کروماتین نقش مهمی دارند. بیشتر سلول



های یوکاریوتی دارای پنج نوع مختلف از هیستون ها شامل: H1، H2A، H2B، H3 و H4 هستند. این پروتئین ها دارای جرم مولکولی کمی هستند و به نحو غیر معمولی بازی هستند^۲ و در pH خنثی دارای بار مثبت می باشند. بر این اساس می توان آن ها را با اسید قوی مانند HCl 1.5M از سلول استخراج کرد، شرایطی که می تواند بیشتر پروتئین ها را دنا توره کند. توالی آمینواسیدی هیستون ها در طی تکامل بسیار حفظ شده است. برای مثال توالی ۱۰۲ آمینواسیدی هیستون H4 گاو و نخود فرنگی تنها در ۲ آمینو اسید تفاوت دارد، که البته این تغییرات هم بسیار حفاظت شده هستند- Lys (امینو اسید بازی) جایگزین یک آمینواسید بازی دیگر (Arg) شده و Val (آمینو اسید آبگریز) جایگزین یک آمینو اسید آبگریز دیگر شده است. این سطح از حفظ شدگی در طی تکامل نشاندهنده ی اهمیت این پروتئین ها برای بقای سلول است. آنزیم RNA پلی مراز و پروتئین های تنظیم کننده ی بیان ژن ها از دیگر پروتئین های موجود در کروماتین هستند.

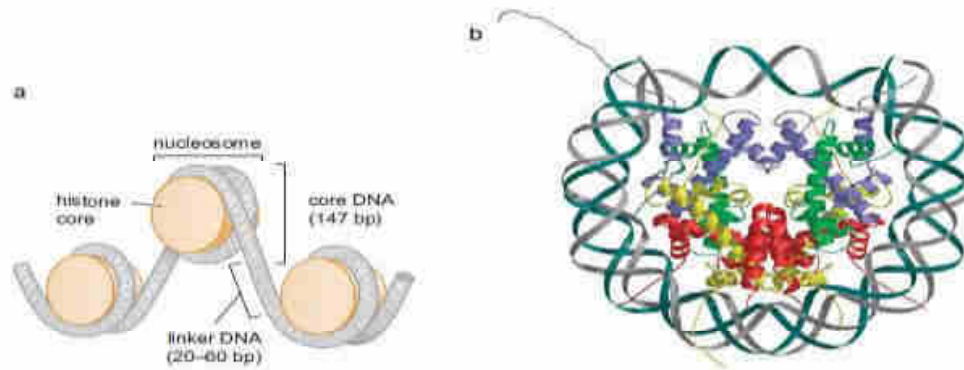
بیشتر DNA در سلول های یوکاریوتی به صورت نوکلئوزوم بسته بندی شده. هر نوکلئوزوم از پیچیدن DNA به دور یک هسته ی هیستونی به وجود می آید و در حقیقت این اولین مرحله از مراحل فشردگی DNA در هسته ی سلول است. DNA بین نوکلئوزوم ها (بند تسبیح در تصویر "دانه های تسبیح" شکل ۲۱) DNA رابط^۳ نامیده می شود. DNA ای که به صورت محکم به هسته ی هیستونی متصل شده (Core DNA) حدود ۱.۶۵ دور به دور اوکتامر هیستون می پیچد. نتایج آزمایش هضم کروماتین با نوکلئاز (آزمایش ۱) نشان می داد که طول DNA که ترکیب پروتئینی را احاطه می کند ۱۴۶ جفت نوکلئوتید است. طول DNA رابط نیز، بسته به نوع گونه، از 20-60 bp متغیر است. ضخامت نوکلئوزوم ها 55 Å و قطر آنها 110 Å است.

شکل ۲۱: میکروگراف الکترونی از فرم ها مختلف کروماتین اینترفازی. (A) فیبر ۳۰ نانومتری. (B) فیبر ۱۰ نانومتری (دانه ها نوکلئوزوم ها هستند و رشته ی باریک بین آنها DNA است. نوکلئوزوم ها به شکل دانه های تسبیح مشاهده می شوند).



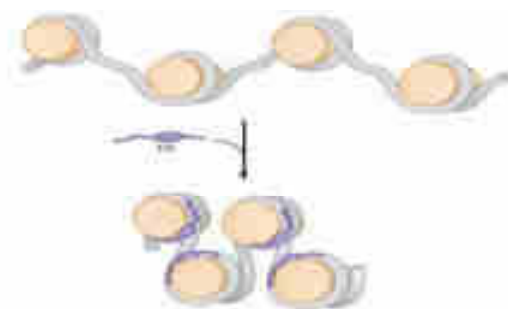
^۲ . بیشتر پروتئین ها اسیدی هستند.

^۳ Linker DNA



شکل ۲۲: (a) شکل شماتیک بسته بندی DNA در نوکلئوزوم ها. (b) ساختار کریستالی نوکلئوزوم (DNA دور هسته هیستونی پیچیده شده است)، ۸ عدد مولکول هیستون این هسته را می سازند. به دم های هیستونی دقت کنید.

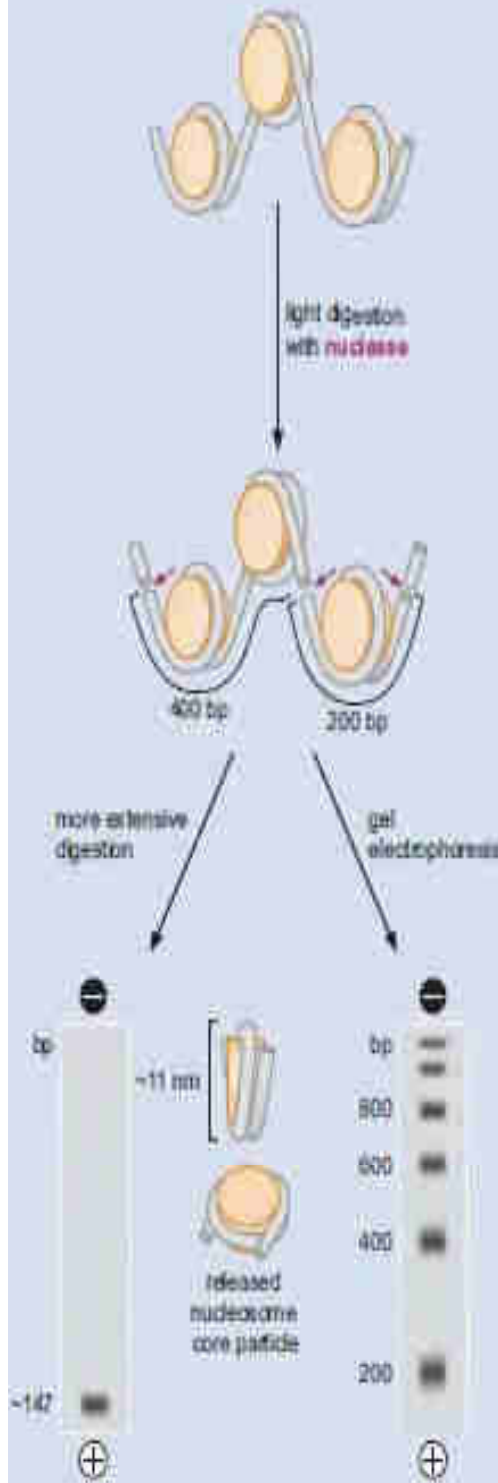
هسته ی هیستونی نوکلئوزوم از ۴ نوع هیستون مختلف تشکیل شده است : H2A، H2B، H3 و H4. دو عدد از هر کدام از این هیستون ها هسته ی اوکتامری پروتئینی نوکلئوزوم را تشکیل می دهند. هیستون H1 که به عنوان هیستون رابط نیز شناخته می شود، به DNA رابط متصل می شود (شکل ۲۳) و باعث پایداری تا خوردگی کروماتین می شوند. پیچش DNA به دور ترکیب هیستونی باعث فشردگی DNA به میزان ۶ برابر می شود، یعنی ۶ میکرون از مارپیچ DNA به طول یک میکرون رشته ی نوکلئوزومی در می آید.



شکل ۲۳: هیستون H1 پیچ خوردن محکم تر DNA اطراف نوکلئوزوم ها را القا می کند.

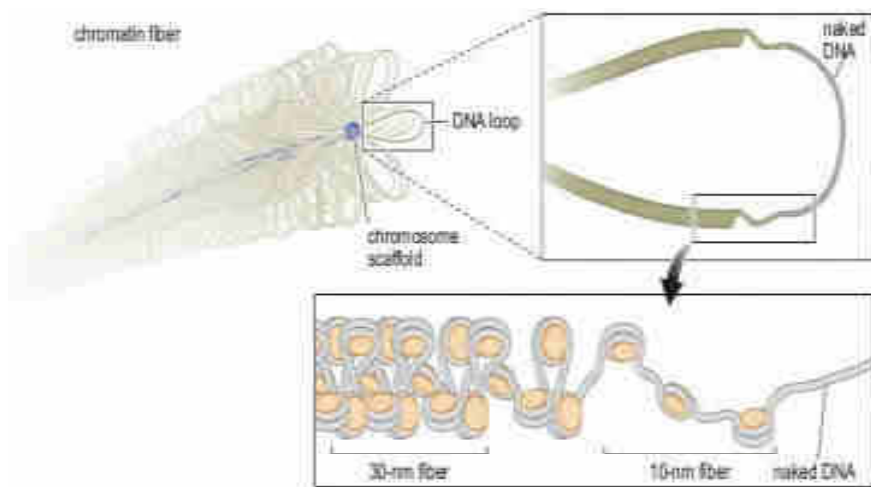
فیبر ۳۰ نانومتری

این سطح از فشرده سازی کروماتین حاصل برهم کنش های دم های هیستونی، DNA رابط و نوکلئوزوم های مجاور است. هیستون H1 در این سطح از بسته بندی کروماتین نقش دارد. این برهم کنش ها باعث تا خوردن، پیچ خوردن فیبر ۱۰ نانومتری و ایجاد یک فیبر ۳۰ نانومتری می شوند. وجود این ساختار در شرایط آزمایشگاهی به خوبی مسجل شده است، ولی هرگز در هسته ی سالم و دست نخورده مشاهده نشده است. به چند صورت می توان این پدیده را توضیح داد: اول اینکه، هرچند نامحتمل به نظر می رسد اما ممکن است این ساختار اصلا در شرایط *in vivo* وجود نداشته باشد. اما احتمالات دیگر نیز وجود دارد: ممکن است این ساختار وجود داشته باشد اما به دلیل پوشیده شدن توسط تا خوردگی های سطوح بالا تر کروماتین، قابل مشاهده نیست یا حتی ممکن است که ابزار های ما برای شناسایی این ساختار درون هسته ی سالم به اندازه ی کافی دقیق نباشند.



در ابتدا نوکلئوزوم ها با استفاده از یک نوکلئاز غیر اختصاصی به نام نوکلئاز مایکروکوکال خالص سازی شدند. این نوکلئاز تنها قادر است توالی های غیر متصل به پروتئین را هضم کند و توانایی کمی برای هضم توالی های متصل به پروتئین دارد. هضم ملایم کروموزوم ها با این آنزیم باعث ایجاد شدن جمعیت هایی از توالی های مقاوم به نوکلئاز می شود که به میزان زیادی به هیستون ها متصلند. هضم بیشتر کروموزوم با نوکلئاز باعث تجزیه ی کامل توالی های رابط می شود و تنها چیزی که باقی می ماند توالی ۱۴۷ جفت بازی است که به هسته ی نوکلئوزوم متصل بوده است.

طول متوسط توالی متصل به هسته ی هیستونی هر نوکلئوزوم می تواند با یک آزمایش ساده محاسبه شود. اینبار کروماتین تحت هضم ملایم نوکلئاز قرار می گیرد، که این باعث به وجود آمدن تک برش هایی در توالی های رابط می شود - اما نه همه ی آن ها. با افزایش غلظت نمک محلول می توان "دی ان ای" را از پروتئین های متصل به آن جدا کرد - از جمله هیستون ها. پس از آن الکتروفورز "دی ان ای" جدا شده، باند های متعددی را نمایان می سازد (سمت راست) زیرا که کروماتین تنها به صورت جزئی هضم شده و بعضی نوکلئوزوم ها از هم جدا نشده اند. هضم بیشتر با نوکلئاز باعث بریده شدن کامل توالی های رابط و به وجود آمدن "نوکلئوزوم کر پارتیکل" و یک قطعه ی ۱۴۷ جفت بازی می شود (سمت چپ).



دمین های حلقوی:

فیبر ۳۰ نانومتری نیز، حلقه هایی به نام دمین های حلقوی تشکیل که به یک داربست کروموزومی متشکل از پروتئین ها، متصل می شود و بدین گونه فیبر ۳۰۰ نانومتری را به وجود می آورد. این داربست غنی از یک نوع توپوایزومراز است و ظاهراً هیستون های H1 نیز در آن وجود دارند.

شکل ۲۴: مدل ساختار کروموزوم های یوکاریوتی نشان می دهد که بیشتر DNA به صورت حلقه های بزرگ فیبر های ۳۰ نانومتری که از ابتدا به داربست کروموزومی متصل هستند بسته بندی شده است. قسمت های فعال به حالت فیبر ۱۰ نانومتری یا حتی بعضاً بدون نوکلئوزوم هستند.

در هر سلولی قسمت هایی از DNA وجود دارد که با هیستون بسته بندی نشده اند، این قسمت ها در بیان ژن، همانندسازی و نوترکیبی دخیلند. پروتئین های غیر هیستونی زیادی که در تنظیم و انجام این اعمال دخیلند به این قسمت ها متصل می شوند.

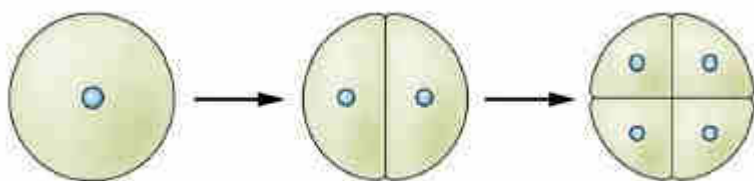
هسته زایی

بدن انسان تقریباً از 3.72×10^{12} سلول تشکیل شده است. تعداد زیادی از این سلول ها پیوسته در حال تقسیمند، برخی در صورت ایجاد آسیب، برای ترمیم بافت آسیب دیده تقسیم می شوند و بعضی دیگر نیز ممکن است در طول زندگی فرد هرگز تقسیم نشوند. در این میان شکل های مختلفی از تقسیم سلولی در بافت ها و مراحل مختلف تکوینی دیده می شود (شکل ۲۵). واضح است که اگر هر سلول در بدن به صورت اتفاقی و در یک زمان تصادفی تقسیم شود هومئوستازی جاندار به خطر می افتد. حالا سوال اصلی این است که چگونه تقسیم سلولی در یوکاریوت ها کنترل می شود.

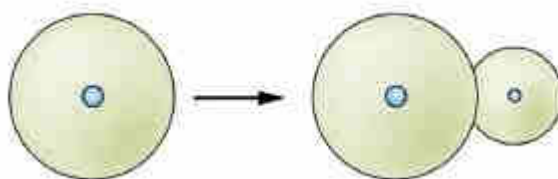
چرخه ی سلولی:

یک سلول یوکاریوتی عمر خود را بین دو تقسیم سلولی طی می کند، یعنی یک سلول که سلول مادر نامیده می شود تقسیم شده و دو سلول دختری را بوجود می آورد. هرکدام از دو سلول دختری تقسیم شده و دو سلول دیگر را بوجود می آورند. سلول در فاصله ی بین دو تقسیم فرآیندی را طی میکند که چرخه ی سلولی نام دارد.

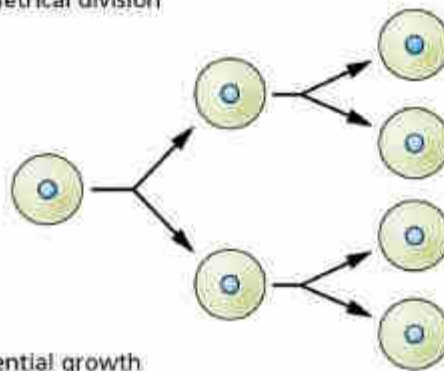
چرخه ی سلولی یک سلول پیکری انسان حدوداً ۲۴ ساعت طول می کشد، که از این مقدار تنها ۱ ساعت به تقسیم سلولی اختصاص دارد (فاز M). در باقی زمان چرخه سلول در اینترفاز به سر می برد. در اینترفاز سلول رشد می کند، پروتئین ها و اندامک هایش را ۲ برابر و کروموزوم هایش را مضاعف می کند تا برای تقسیم سلولی آماده شود.



(a) Cleavage division



(b) Asymmetrical division



(c) Exponential growth

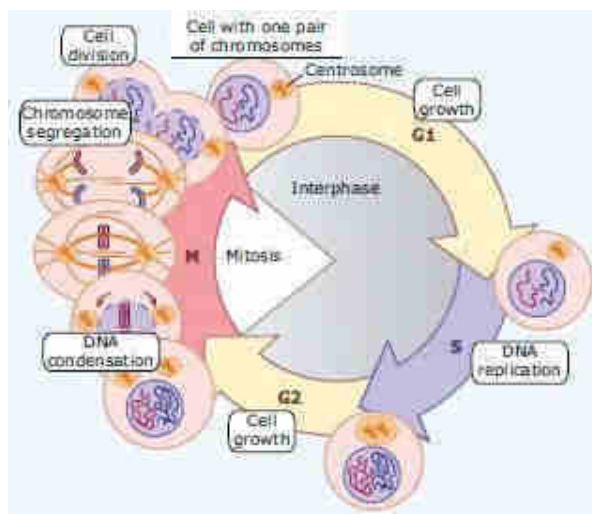


(d) Stem cell



اینترفاز را می توان به مراحل G_1 (First Gap)، S (Synthesis) و G_2 (Second Gap) تقسیم کرد. در هر ۳ بخش، سلول با ساخت پروتئین ها و اندامک های سیتوپلاسمی مانند میتوکندری و شبکه ی آندوپلاسمی رشد می کند. با این حال، DNA فقط در فاز S همانندسازی می شود. پس از گذراندن این ۳ مرحله سلول وارد فاز تقسیم (M) شده و تقسیم می شود. سلول های دختر ممکن است دوباره چرخه را طی کنند (شکل ۲۶).

بعضی سلول ها در یک جاندار پرسلولی بسیار به ندرت تقسیم می شوند یا حتی اصلاً تقسیم نمی شوند- مانند نرون ها. این سلول ها در G_1 باقی مانده و کارشان را انجام می دهند. اصطلاحاً گفته می شود که سلول وارد فاز G_0 شده است.



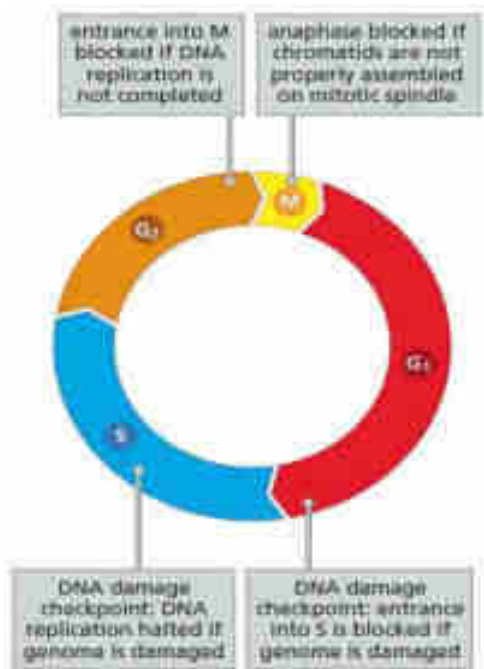
شکل ۲۶: این چرخه حدود ۲۴ ساعت به طول می انجامد. فاز همانند سازی DNA (S) و میتوز (M) توسط دو فاز وقفه (G_1 و G_2) از هم جدا شده اند. کروموزوم ها، که با خطوط آبی و قرمز نشان داده شده اند، تا میتوز درون پوشش هسته محصور شده اند. سانتروزوم ها در طی G_2 مضاعف می شوند

و به عنوان مراکز سازماندهی، یا قطب های، دوک میتوزی در فاز M عمل می کنند.

نقاط واریسی

مانند تمام ماشین ها، ماشین سلولی که مرحله مختلف چرخه را مرحله به مرحله به انجام می رساند ممکن است در عملکرد خود دچار خطا شود، که این موضوع با نیاز شدید سلول به بدون نقص انجام شدن تمامی مراحل چرخه سلولی مغایرت دارد. به همین دلیل سلول مکانیسم هایی را به کار می گیرد که پیشرفت در هر مرحله از چرخه ی سلولی را پایش می کنند و تنها در صورتی به سلول اجازه که وارد مرحله ی بعد شود که تمامی مراحل قبل را با موفقیت به پایان رسانده باشد. درضمن، اگر در پیشرفت مرحله ای در چرخه ی سلولی اشکالی به وجود بیاید، این مکانیسم ها تا زمان برطرف

شکل ۲۵: بعضی از انواع تقسیم سلولی



شکل ۲۷: چند مثال از نقاط واریسی در چرخه ی سلولی

(a) تسهیم که در رویان های اولیه دیده می شود. (b) تقسیم نامتقارن نیز در بعضی رویان های ابتدایی مشاهده می شود. (c) رشد نمایی در کشت بافت دیده می شود. (d) تقسیم سلول بنیادی نیز در renewal tissues در



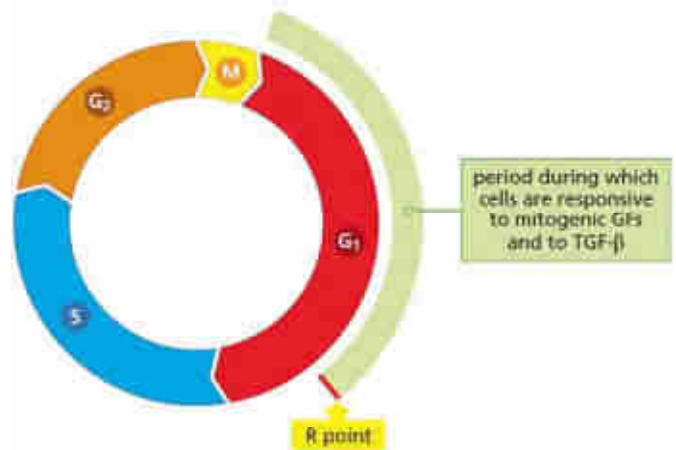
شدن این مشکلات، پیشرفت بیشتر در چرخه را متوقف می کنند. مکانیسم های دیگری هم برای اطمینان از اینکه در طی یک چرخه، یک مرحله پس از یک بار انجام شدن، تا زمان شروع چرخه ی بعدی، دوباره تکرار نشود به کار گرفته شده اند. به این مکانیسم ها نقاط واریسی گفته می شود (شکل ۲۷).

سلول ها در بازه ی خاصی از G_1 در مورد رشد کردن و تقسیم شدن تصمیم می گیرند :

عملا تمام سلول های طبیعی در بدن برای رشد و تقسیم نیازمند دریافت سیگنال های خارجی، مانند فاکتور های رشد میتوژنیک، هستند. تنها استثنای این موضوع سلول های بسیار ابتدایی رویانی هستند، که به نظر می رسد برای تکثیر شدن نیازی به سیگنال محرک رشد خارجی ندارند. توجه این رفتار سلول های طبیعی درون بافت های ما ساده است: از آن جایی که سلول ها درون بافت هایی با ساختار و سازمانبندی دقیق و مشخص قرار گرفته اند، تکثیر و رشد آن ها باید با سلول های مجاورشان هماهنگ باشد. به بیان دیگر، بدن نمی تواند به تمام سلول های سازنده اش این اجازه را بدهد که مستقل از بقیه ی سلول ها تقسیم شوند. زیرا این باعث آشوب می شود.

نتایج آزمایش های انجام شده از ربع قرن تا حالا، نشان داد که سلول ها تنها در بازه ی زمانی مشخصی از چرخه سلولی از محیط خارج سلولی و سیگنال های تنظیم کننده ی رشد آن تاثیر می پذیرند. این بازه از نقطه ی آغاز فاز G_1 تا حدود ۱-۲ ساعت قبل از انتقال G_1 به S را در بر می گیرد (شکل ۲۸). در واقع، اگر سرم حاوی فاکتور های رشد را قبل از اینکه سلول ها ۹۰%-۸۰٪ طول G_1 را گذرانده باشند از محیط کشت سلول ها خارج کنیم، آن ها موفق به ادامه دادن چرخه نخواهند شد و با احتمال زیاد، وارد فاز G_0 می شوند. درحالی که، اگر سلول ها این بازه ی تصمیم گیری را پشت سر گذاشته باشند و وارد ۲۰%-۱۰٪ پایانی G_1 شده باشند، حذف کردن سرم حاوی فاکتور های رشد تاثیری بر گذراندن چرخه ی سلولی در آن ها نخواهد گذاشت و به احتمال زیاد باقی مانده ی G_1 و فاز های S، G_2 و M را نیز تکمیل خواهند کرد. همین اتفاق در مورد فاکتور های آنتی-میتوژنیک، مثل $TGF-\beta$ هم صادق است. در واقع، در یک نقطه ی زمانی در اواخر فاز G_1 ، سلول باید تصمیم بگیرد که از چرخه ی سلولی فعال خارج شود و وارد فاز G_0 شود، یا بقیه ی فاز های باقی مانده ی چرخه را پشت سر بگذارد. این تصمیم بسیار مهم در انتقالی به اسم نقطه ی محدود کننده^۴ یا نقطه ی R گرفته می شود (شکل ۴). اگر سلولی در این نقطه تصمیم بگیرد که چرخه را ادامه دهد، در واقع، خودش را متعهد به انجام اینکار و در نهایت انجام تقسیم می کند. اما، مانند آن چه در شکل ۳ نشان داده شد، می نوانند مانع این کار شوند و را از ادامه ی چرخه بازدارند.

شکل ۲۸: نقطه ی R: در بیشتر سلول پستانداران که تا به حال مطالعه شده اند، نقطه ی R چند ساعت قبل از انتقال G_1 به S رخ می دهد.



⁴ Restriction point

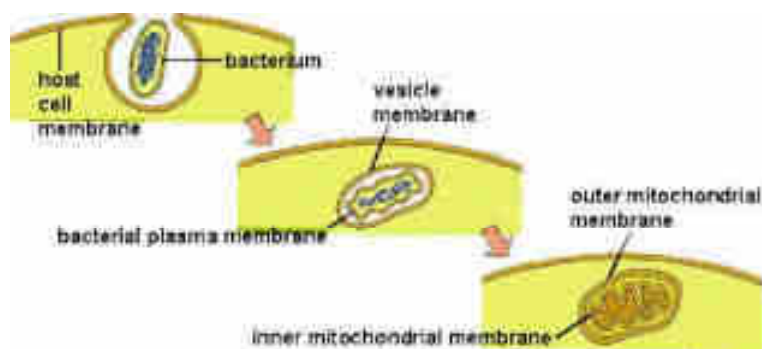
تقسیم سلولی

هنگام تقسیم هسته در اکثر جانداران، غشای هسته ناپدید شده و پس از تقسیم هسته مجدداً ظاهر می‌شود. بررسی‌های انجام شده با میکروسکوپ الکترونی نشان داده‌اند که همزمان با به وجود آمدن کروموزوم‌ها، غشای هسته به وزیکول‌های کوچکی که از شبکه‌ی اندوپلاسمی قابل تمیز دادن نمی‌باشند تجزیه می‌شود. فسفریله شدن پروتئین‌های لامین در این امر نقش ایفا می‌کند. در واقع، در اوایل میتوز لامین‌ها فسفریله می‌شوند و غشای هسته به وزیکول‌های کوچک تبدیل می‌شود. در اواخر میتوز، مجدداً غشای کروموزوم‌ها را در بر می‌گیرد - زمان و چگونگی تشکیل منافذ در غشای هسته مشخص نیست. پس از رسیدن کروموزوم‌ها به دو قطب سلول در اواخر میتوز یا میوز، به تدریج ریز کیسه‌های کوچک غشایی در هر قطب دوک تقسیم اطراف، یک یا تعداد بیشتری کروموزوم را احاطه می‌کنند. این ریز کیسه‌ها سپس با یکدیگر ادغام می‌شوند و در آخر یک هسته‌ی منفرد در هر قطب به وجود می‌آید. در همین مقطع زمانی پروتئین‌های لامین دفسفریله می‌شوند. نحوه‌ی اثر پروتئین‌های لامین بر تجزیه و تشکیل مجدد غشای هسته مشخص نیست. پس از تقسیم هسته، سیتوپلاسم و محتویات آن نیز تقسیم می‌شوند و به این ترتیب دو سلول دختر حاصل می‌شوند.

۱.۲.۲ میتوکندری

حدود ۱.۵ میلیارد سال پیش، اتفاق مهمی در تاریخ تکامل حیات رخ داد. یک باکتری هوازی خود را وارد سیتوپلاسم سلول جد یوکاریوتی کرد. این باکتری که توانایی استفاده از اکسیژن را برای بهره برداری بهتر از مواد غذایی داشت، یک موهبت بسیار بزرگ برای سلول یوکاریوتی به حساب می‌آمد. چرا که در آن زمان با افزایش غلظت O_2 تحت فعالیت موجودات فوتوسنتز کننده، اکسیژن یک ماده سمی خطرناک محسوب می‌شد و به عنوان رادیکال آزاد توانایی اکسیداسیون پروتئین‌ها و DNA و از بین بردن سلول‌ها را داشت. اما باکتری هوازی با ورود خود به سلول یوکاریوتی و همزیست شدن با آن اکسیژن را نه تنها از حالت سمی برای سلول خارج ساخت بلکه از آن به عنوان یک ماده الکترون‌گاتیو در زنجیره‌ی انتقال الکترون به عنوان پذیرنده نهایی استفاده کرد و بازده کاتابولیسم مواد غذایی را چندین برابر افزایش داد.

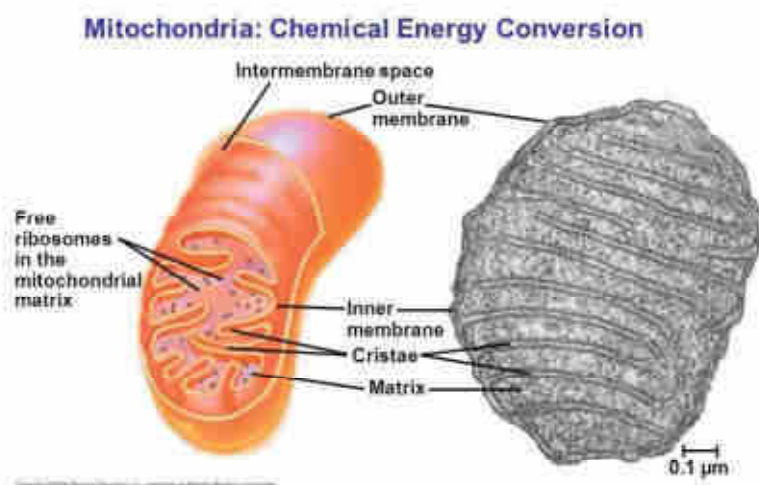
این نظریه که با نام درون همزیستی معروف است، تقریباً توسط دانشمندان مورد قبول واقع شده است.



شکل ۲۹- ورود باکتری هوازی به سلول میزبان جد یوکاریوتی و تبدیل شدن آن به میتوکندری

میتوکندری اولین بار در قرن نوزدهم مشاهده شد، ولی پیشرفت واقعی در فهم عمل آن پس از ابداع روش‌های جداسازی بخش‌های مختلف سلول‌ها صورت گرفت. بیشتر بررسی‌های بیوشیمیایی بر روی میتوکندری‌های سالم خالص شده از سلول‌های کبدی انجام گرفت. هر سلول کبدی دارای ۱۰۰۰ تا ۲۰۰۰ میتوکندری است.

میتوکندری‌ها تقریباً ۲۵ درصد از حجم سیتوپلاسم اغلب سلول‌های یوکاریوتی را اشغال می‌کنند و جایگاه تنفس سلولی هستند. این اندامک‌ها با میکروسکوپ نوری به خوبی دیده می‌شوند ولی جزئیات ساختاری آنها فقط با میکروسکوپ الکترونی تشخیص داده می‌شوند.

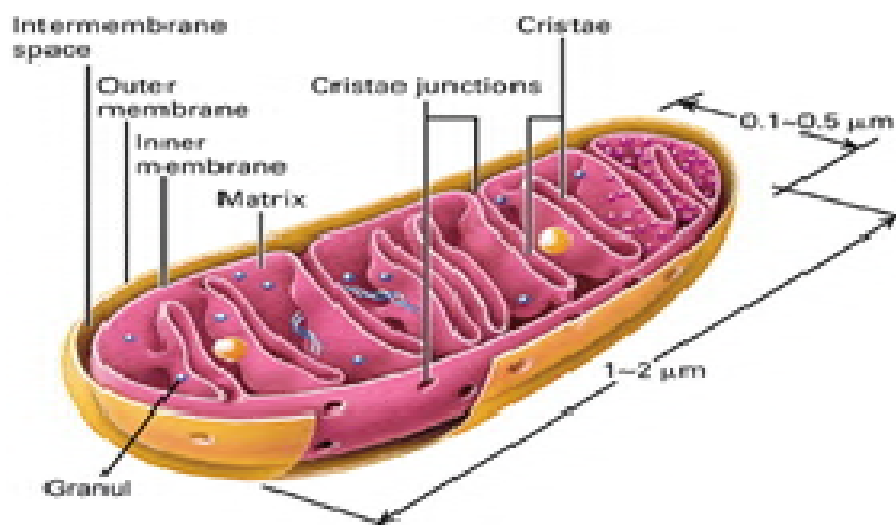


شکل ۳۰- ساختار درونی میتوکندری

میتوکندری‌ها شبیه به باکتری‌های میله‌ای شکل هستند، قطری بین ۰/۵ تا یک میکرومتر و طولی حدود ۱ تا ۲ میکرومتر دارند. این اندامک پس از هسته، واکوئل و کلروپلاست بزرگترین ساختار داخلی سلول است. میتوکندری دارای دو غشای داخلی و خارجی، فضای بین‌غشایی و ماده‌ی زمینه‌ای است. تخلیص قسمت‌های مختلف میتوکندری امکان بررسی پروتئین‌ها و سایر ماکرومولکول‌های آنها را میسر ساخت. ضمناً این امکان به وجود آمد که اعمال و واکنش‌های گوناگون میتوکندری به قسمت‌های خاصی از آن نسبت داده شوند. مشخص‌ترین ویژگی‌های ساختاری غشای داخلی میتوکندری، تاخوردگی متعددی به نام تیغه است. این تیغه‌ها باعث افزایش قابل توجهی در سطح غشای داخلی می‌شوند، که اهمیت زیادی در واکنش‌های تنفسی دارد. ضمناً این تیغه‌ها در سلول‌های مختلف اشکال متفاوتی دارند که اثر این اختلاف شکل بر عملکرد میتوکندری‌ها شناخته نشده است.

طول غشای داخلی میتوکندری کبدی ۱۵ برابر طول غشای پلاسمایی در آن سلول است. تعداد تیغه‌های موجود در میتوکندری سلول‌های ماهیچه‌ای قلب و اسکلتی سه برابر تیغه‌های میتوکندری‌های سلول‌های کبدی می‌باشد. این به علت آن است که سلول‌های ماهیچه‌ای قلب و اسکلت نیاز بیشتری به ATP دارند. در ضمن با گرفتن تصویرهای پشت

سر هم از سلول های زنده، مشخص شده است که میتوکندری ها در مکان هایی که مصرف ATP در آنجا زیاد است متراکم اند. به عنوان مثال، آنها در اطراف تاژک اسپرم با تراکم بالا دیده می شوند. غشای داخلی پروتئین هایی با سه نوع عملکرد دارد. این پروتئین ها عبارتند از پروتئین هایی که واکنش های اکسایشی زنجیره ی تنفسی را انجام می دهند، مجموعه ی آنزیمی که در تشکیل ATP در ماده زمینه نقش دارد و پروتئین های ناقل که عبور متابولیت ها را به داخل ماده ی زمینه و از ماده زمینه به خارج تنظیم می کنند. فضای بین غشای خارجی و داخلی فضای بین غشایی نام دارد. در فضای بین غشایی آنزیم های متعددی وجود دارند که پیش سازهای لازم برای همانندسازی ژنوم میتوکندری را تأمین می کنند. ماتریکس یا ماده ی زمینه ی میتوکندری حاوی مخلوط بسیار غلیظی از صدها آنزیم است که برخی از آنها در تبادلات انرژی در سلول نقش دارند. ماده ی زمینه همچنین دارای چندین نسخه مشابه از ژنوم میتوکندری، ریبوزوم های میتوکندری، tRNAها و مولکول های دیگر که در بیان ژن های میتوکندری نقش دارند، می باشد.



شکل ۳۱- کریستا های میتوکندری در این شکل قابل تشخیص اند.

ژنوم میتوکندری

بررسی میتوکندری‌های تخلیص شده در لوله آزمایش نشان داد که DNA سازی در میتوکندری انجام می‌گیرد. این مشاهده در نهایت دانشمندان را از وجود DNA در میتوکندری آگاه ساخت. بررسی‌های بعدی نشان داد که علاوه بر همانند سازی DNA، RNA سازی و پروتئین‌سازی هم در میتوکندری صورت می‌گیرند. این فرآیندها توسط ترکیبات، آنزیم‌ها و مولکول‌های خاص خود اندامک صورت می‌گیرند. به عنوان مثال ریبوزوم، DNA پلی‌مراز، RNA پلی‌مراز و tRNAهای خاص میتوکندری وجود دارند. DNA میتوکندری در اغلب موجودات حلقوی است، در حالی که در پارامسیوم و جلبک سبز DNA میتوکندری خطی می‌باشد. میتوکندری‌ها معمولاً نسخه‌های متعددی از مولکول‌های DNA یکسان دارند. جایگاه DNA در ماده‌ی زمینه میتوکندری و بعضی مواقع چسبیده به غشای داخلی میتوکندری است. ژنوم میتوکندری سلول‌های اغلب جانوران از ۱۵-۲۰ هزار جفت نوکلئوتید تشکیل شده است و در پستانداران حدود 10^{-5} برابر کوچکتر از ژنوم هسته‌ای است. ژنوم میتوکندری سلول‌های گیاهی ۱۰-۱۵۰ بار بزرگتر از ژنوم میتوکندری در سلول‌های جانوری است. از جمله محصولات می‌باشد که توسط DNA میتوکندری رمز می‌شوند، RNAهای ریبوزومی میتوکندری، tRNAها و برخی از پروتئین‌های مسیر تنفس می‌باشند. ضمناً بسیاری از پروتئین‌هایی که در میتوکندری فعالیت دارند در هسته رمز می‌شوند و پس از ساخته شدن بر روی ریبوزوم‌های سیتوزول وارد اندامک می‌شوند. جالب است که بدانیم وجود DNA در میتوکندری به مطالعه‌ی سال‌ها قبل در زمینه وراثت سیتوپلاسمی برمی‌گردد. در دهه‌ی ۱۹۳۰ مشخص شد که وراثت برخی صفات در گیاهان و جانوران از قوانین مندلی پیروی نمی‌کند و نحوه‌ی انتقال آنها به صورت توارث مادری یا توارث سیتوپلاسمی است. این نوع وراثت تنها از طریق سیتوپلاسم فراوان سلول‌های تخمک صورت می‌گیرد، زیرا در پستانداران و اغلب جانوران مشارکت اسپرم در تشکیل سیتوپلاسم سلول تخم بسیار اندک است. در حقیقت این صفات توسط ژنوم میتوکندری که همراه میتوکندری‌های موجود در سیتوپلاسم وارد سلول تخم می‌شوند، انتقال می‌یابند. به عنوان مثال، اگر آمیزش بین دو نژاد مختلف گاو انجام گیرد که میتوکندری‌های آنها از یکدیگر قابل تمیز باشند، میتوکندری‌ها در فرزندان آنها از نوع مادری خواهد بود. مثال معروفی از صفتی که توسط ژنوم میتوکندری تعیین می‌شود، جهش پیش‌صدف در حلزون است. در گیاهان عالی نیز DNA میتوکندری منحصراً به طریق تک‌والدی و از تخمک به ارث می‌رسد نه از گرده.

جالب است بدانید که...

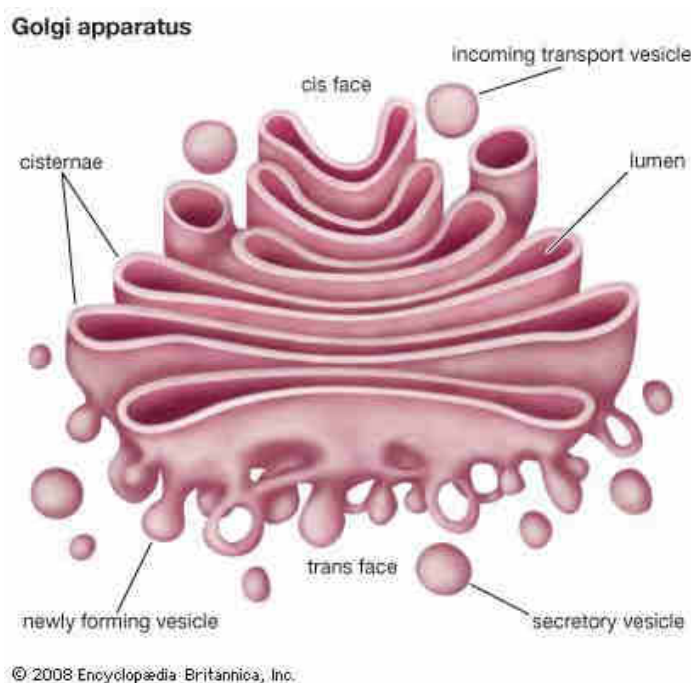


نوروپاتی بینایی ارثی لبر (LHON)

در این بیماری، در ژن رمزکننده‌ی کمپلکس یک زنجیره تنفسی، جهش رخ داده و در نتیجه میتوکندری در ساخت ATP ناتوان می‌شود. جالب است بدانید که این ژن در ژنوم میتوکندری موجود است و از آنجایی که سلول‌های چشم برای فعالیت خود نیاز شدیدی به ATP دارند،

۱.۲.۳ دستگاه گلژی

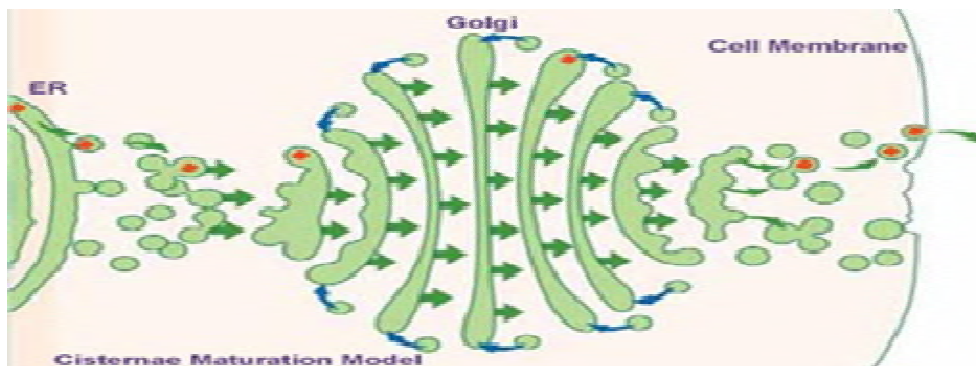
دستگاه گلژی برای اولین بار توسط گلژی در سال ۱۸۹۸ پس از رنگ آمیزی سلول عصبی با نمک نقره در سیتوپلاسم سلول مشاهده و کشف شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان دادند که دستگاه گلژی مجموعه‌ای از کیسه‌هایی پهن هستند که غشای دو لایه‌ی لیپیدی دارند و روی یکدیگر قرار می‌گیرند. هر یک از کیسه‌ها را سیسترن گلژی نامند. مجموعه‌ای از ۴ تا ۶ کیسه یک دسته‌ی گلژی را تشکیل می‌دهد. تعداد و اندازه‌ی دسته‌های گلژی به نوع سلول بستگی دارد. هر دسته‌ی گلژی سه قسمت مجزا و مشخص دارد. سطح سیس، سطحی است که به هسته‌ی سلول نزدیکتر می‌باشد و محل ورود ماکرومولکول‌ها از شبکه پلاسمی است و ماکرومولکول‌ها از این سطح خارج می‌شوند. بخش بین سطوح سیس و ترانس را بخش میانی گلژی نامند. مولکول‌ها پس از ورود به دستگاه گلژی و هنگام عبور از سطوح آن تغییر می‌یابند و بسیاری از آنها مجدداً گلیکوزیله می‌شوند. تغییر مولکول‌ها در نتیجه‌ی فعالیت آنزیم‌های موجود در سطوح مختلف دستگاه گلژی صورت می‌گیرد.



شکل ۳۲-جسم گلژی و قسمت‌های مختلف آن



گروه قند در برخی از ماکرومولکول‌ها نشانه‌ی هدایت آنها به مقصدهای ویژه است. پروتئین‌هایی که مقصد آنها لیزوزوم است از جمله این ماکرومولکول هستند. سایر ماکرومولکول‌ها که از گلژی عبور می‌کنند به غشای پلاسمایی می‌روند و در آن جای می‌گیرند یا به بیرون سلول ترشح می‌شوند. دستگاه گلژی را مأمور راهنمایی یا پلیس سلول نام نهاده‌اند. زیرا پس از ایجاد تغییر در ماکرومولکول‌ها، آنها را به مقصد نهایی هدایت می‌کند. حرکت ماکرومولکول‌ها بین سطوح مختلف دستگاه گلژی به کمک وزیکول‌های انتقال دهنده صورت می‌گیرد که از غشای یک سطح جوانه می‌زند و با غشای آن ادغام می‌شوند.



شکل ۳۳- انتقال بین سطوح مختلف گلژی و از گلژی به غشای سلول و لیزوزوم نشان داده شده است. انتقال در همه‌ی سطوح از طریق کیسه‌ها یا وزیکول‌های ترشحی صورت می‌گیرد.

جالب است بدانید که...

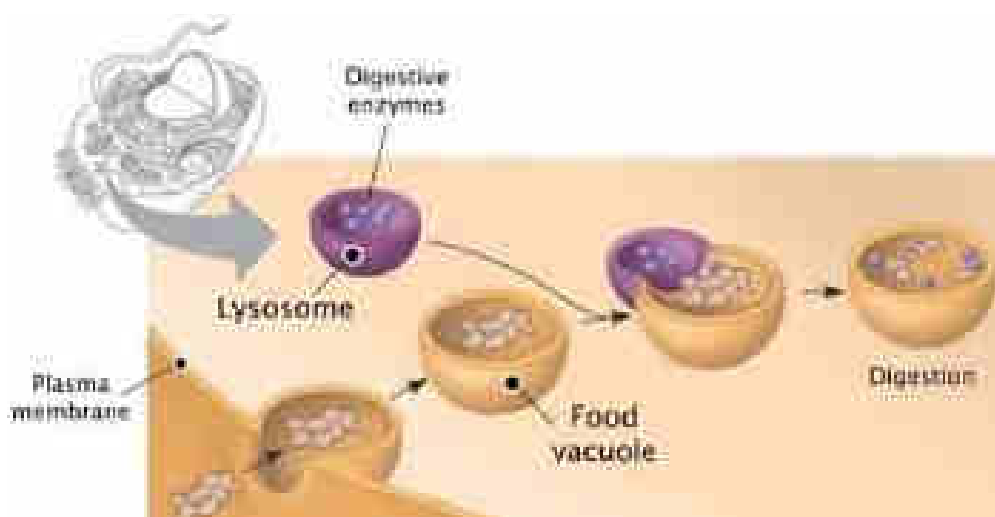


بیماری آکندروژنسیس (Achondrogenesis disease)

در نوعی از این بیماری، به دلیل نقصی که در میکروتوبول‌های جسم گلژی رخ می‌دهد، توانایی انتقال پروتئین از شبکه آندوپلاسمی به جسم گلژی را از دست می‌دهند و در نتیجه پروتئین‌های ساخته شده در شبکه آندوپلاسمی تجمع پیدا می‌کنند و باعث تورم این اندامک می‌شوند. عدم عملکرد جسم گلژی در بعضی سلول‌ها نمود پیدا کرده اما در سلول‌های که مسئول تشکیل استخوان و غضروف هستند اثر شدیدی دارند. نوزادانی با این بیماری یا قبل از تولد سقط می‌شوند و یا به فاصله کمی بعد از تولد فوت می‌کنند. این بیماری با کوتاهی شدید دست یا پا، تنگی قفسه سینه، دنده‌های کوتاه شکننده و عدم تشکیل استخوان به نحو صحیح در جمجمه، ستون فقرات و لگن همراه است.

۲.۴. الیزوزومها

لیزوزومها که در سال ۱۹۴۵ شناسایی شدند، اندامک‌های کوچک حاوی آنزیم‌های تجزیه‌کننده‌ی ماکرومولکول‌ها می‌باشند. لیزوزومها به وسیله‌ی روش‌های رنگ‌آمیزی اختصاصی برای آنزیم‌هایشان از سایر بخش‌های سلول متمایز می‌شوند و در اکثر سلول‌های یوکاریوتی یافت می‌شوند. مطالعات بیوشیمیایی نشان داده‌اند که حدود ۴۰ آنزیم تجزیه‌کننده در لیزوزومها وجود دارند که پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها و کربوهیدرات‌ها را تجزیه می‌کنند. تمام این آنزیم‌ها در محیط اسیدی فعال هستند و به همین دلیل PH اسیدی به وسیله پمپ پروتونی (H^+) که در غشای لیزوزوم وجود دارد حفظ می‌شود. این پمپ فعالانه و با استفاده از انرژی ذخیره شده در ATP، یون هیدروژن را به درون اندامک پمپ می‌کند و مانع خروج مجدد آن می‌شود.



شکل ۳۴- عملکرد لیزوزوم در هضم مواد غذایی با کمک آنزیم‌های مخصوص

جالب است بدانید که...



بیماری تای-ساکس (Tay-Sachs disease)

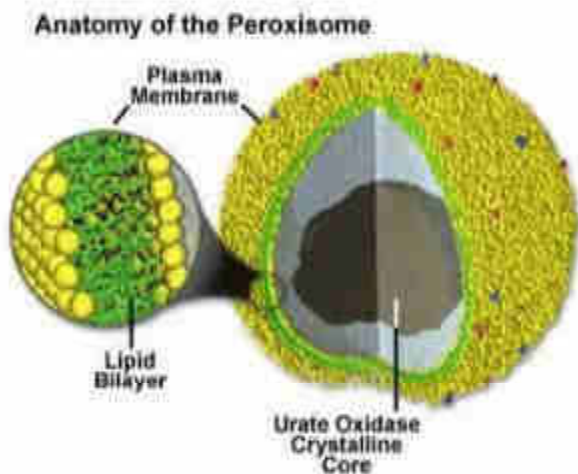
این بیماری در اثر جهش در ژن و در نتیجه نقص در یکی از آنزیم‌های تجزیه‌کننده نوعی لیپید در لیزوزوم رخ می‌دهد. به این صورت که عدم تجزیه این لیپید باعث تجمع آن تا مقدار سمی در سلول‌ها و به خصوص سلول‌های مغز، نخاع و نورون‌ها می‌شود. بین ۳ تا ماهگی در نتیجه این تجمع چربی، علائمی نظیر از دست دادن آگاهی و تأخیر تکامل ذهنی، از دست دادن قدرت عضلات مانند مشکل در نشستن یا چرخیدن، تشنج، کر و کور شدن نمایان می‌شود.

۲.۵. پراکسی زومها

پراکسی زومها اندامک‌های کوچکی هستند که در سال ۱۹۶۵ شناسایی شدند. روش‌های بیوشیمیایی و میکروسکوپ الکترونی نشان دادند که پراکسی‌زومها قطری حدود نیم میکرومتر دارند و به لیزوزومها شبیه هستند و به همین دلیل جدا کردن این دو اندامک از یکدیگر مشکل بوده است. پراکسی‌زومها دارای آنزیم‌های اکسیدکننده هستند و بسیاری از اسیدهای چرب و اسیدهای آمینه را تجزیه می‌کنند. در نتیجه واکنش‌های اکسایشی، آب اکسیژنه ایجاد می‌شود که خود قادر به اکسید کردن بسیاری از مواد دیگر است. پراکسی‌زومها حاوی آنزیم کاتالاز نیز هستند که آب اکسیژنه را به آب و اکسیژن تبدیل می‌کند. عمل این آنزیم حیاتی است، زیرا آب اکسیژنه در غلظت بالا برای سلول خطرناک است.

واکنش‌های اکسایش مواد در سلول‌های کبد و کلیه که مرکز سم‌زدایی بدن هستند، اهمیت خاصی دارند. اکثر مواد سمی نظیر الکل و داروهای مختلف از جریان خون وارد این دو عضو شده و توسط آنزیم‌های موجود در سلول‌های آنها اکسیده و خنثی می‌شوند. در گیاهان پراکسی‌زومها به دو صورت دیده می‌شوند. یک نوع که در برگها وجود دارد، عمل اکسیده کردن یکی از محصولات فرعی واکنش تنفس نوری را به عهده دارد. نوع دوم که گلی اکسی زوم نامیده می‌شود نقش اکسایش چربی‌ها و تبدیل آنها به قند که برای رشد گیاه جوان لازم است، به عهده دارد. تبدیل لیپید به قند فقط در گلی اکسی زومهای دانه‌های گیاهی صورت می‌گیرد و چنین فرآیندی در سلول‌های حیوانی دیده نمی‌شود.

پژوهشگران معتقدند که نقش پراکسی‌زومها در متابولیسم سلول هنوز به طور کامل شناخته نشده است. به عنوان مثال ممکن است یکی از نقش‌های آن ایجاد حرارت (بجای ATP) در نتیجه سوختن مولکول‌های انرژی‌زا نظیر اسیدهای چرب باشد. تمام پروتئین‌ها و آنزیم‌های موجود در پراکسی‌زوم ابتدا در سیتوزول ساخته می‌شوند و سپس به این اندامک منتقل می‌شوند. جزئیات نحوه انتقال این پروتئین‌ها به اندامک شناسایی نشده‌اند. به نظر می‌رسد که پروتئین‌هایی وارد پراکسی‌زوم می‌شوند نیز دارای توالی ویژه‌ای هستند که توسط گیرنده‌ای در سطح غشای آن شناسایی می‌شود.



شکل ۳۵- آناتومی پراکسی زوم



جالب است بدانید که...



بیماری Adrenoleukodystrophy

اسید های چرب طویل برای تجزیه خود نیاز به پراکسی زوم دارند. در این بیماری وابسته به عدم عملکرد صحیح پراکسی زوم ها باعث تجمع اسید های چرب شده و تخریب میلین را سبب می شود. این بیماری با علائم تشنج و کاهش فعالیت فرد و همچنین اختلال در صحبت کردن، شنیدن و فهم آموزش شفاهی همراه می شود.

۲.۶. شبکه آندوپلاسمی

این اندامک به دو نوع مختلف در سلول های موجودات زنده یافت می شود. صاف و زبر. این اندامک عضو سیستم بزرگی به نام دستگاه غشایی درونی است که شامل دیگر اندامک های سلول نیز می شود (به جز میتوکندری و کاروبلاست). این دستگاه در تنظیم و ساخت پروتئین ها، تنظیم متابولیک سلول و ساخت و متابولیسم لیپیدها نقش دارد.

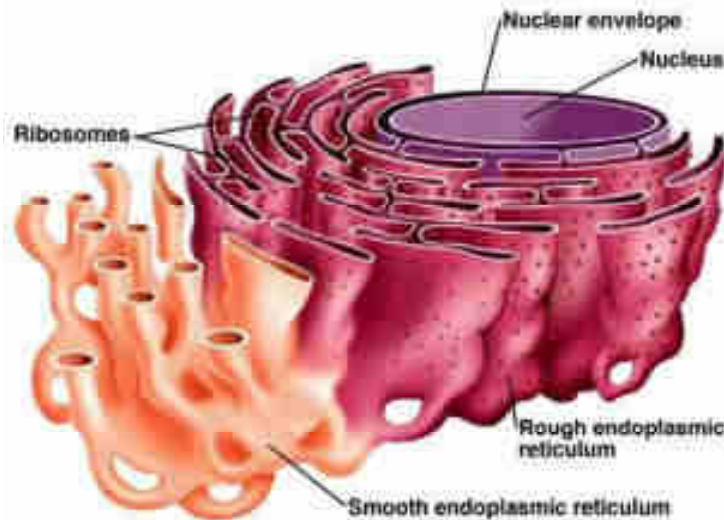
شبکه آندوپلاسمی زبر

حضور بخشی از ریبوزوم های سلول روی شبکه آندوپلاسمی زبر به آن منظره ای دانه دانه می دهد و به همین دلیل نام زبر را برای آن برگزیده اند. این اندامک دو کار اصلی دارد:

- ۱- پروتئین سازی: این فرآیند توسط ریبوزوم های روی سطح شبکه ی آندوپلاسمی انجام می شود. ریبوزوم ها این کار را در سیتوپلاسم آغاز و در غشای شبکه آندوپلاسمی آن را ادامه می دهند. پس از اتمام فرآیند ترجمه، پلی پپتید ترجمه شده وارد شبکه آندوپلاسمی شده تا به شکل اصلی خود تا بخورد و در بعضی مواقع تحت فرآیند گلیکوزیلاسیون قند دار شود. پروتئین های این چنین ساخته شده در غشای شبکه آندوپلاسمی یا ترشحی هستند و به بیرون از سلول فرستاده می شوند یا شامل کانال ها و پمپ ها هستند و در غشای سلول جا می گیرند. شبکه آندوپلاسمی توسط وزیکول ها این پروتئین ها را از پروتئین های درون سلولی که توسط ریبوزوم های آزاد سیتوپلاسم ترجمه شده اند، جدا می کند.
- ۲- غشا سازی: توانایی افزودن لیپید به غشاء، شبکه آندوپلاسمی زبر را به یک کارخانه ی غشاسازی تبدیل کرده است.

شبکه آندوپلاسمی صاف

شبکه آندوپلاسمی صاف عملکردهای بسیار متفاوتی دارد. متابولیسم کربوهیدرات‌ها، لیپیدها و سم‌زدایی دارو‌ها و سم‌ها همگی توسط این اندامک به انجام می‌رسد. سلول‌هایی که هورمون‌های استروئیدی نظیر هورمون‌های جنسی تولید می‌کنند، غنی از شبکه آندوپلاسمی صاف هستند. سم‌زدایی شامل افزودن گروه (OH) هیدروکسیل به دارو‌ها و محلول کردن آنها به منظور خارج نمودن راحت‌تر آنها از بدن است. شبکه آندوپلاسمی صاف توانایی ذخیره کلسیم در سلول‌های ماهیچه را نیز دارد.



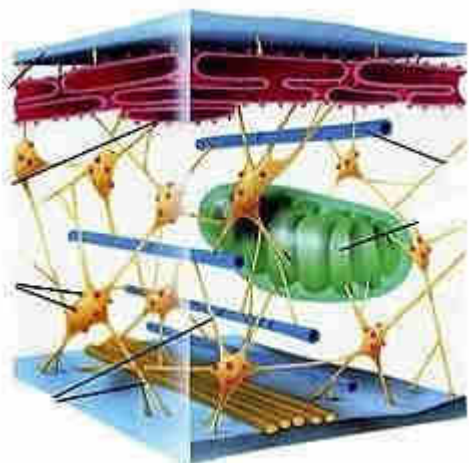
شکل ۳۶- شبکه آندوپلاسمی زبر و صاف در کنار یکدیگر. همانطور که ملاحظه می‌کنید شبکه آندوپلاسمی زبر در امتداد غشای هسته قرار دارد.

جالب است بدانید که...



بیماری فن گیر که یا ذخیره گلیکوژن نوع ۱

آنزیم گلوکز ۶-فسفاتاز در غشای شبکه آندوپلاسمی صاف کبد و کلیه وجود دارد. در این دو اندام گلوکز پس از شکستن از حالت گلیکوژن به حالت گلوکز فسفات در می‌آید. اما در این حالت نمی‌تواند از غشا خارج شود. زیرا بار منفی فسفات مانع می‌شود و برای سوخت‌رسانی به سایر اندام‌هایی که نیازمند هستند آنزیم گلوکز ۶-فسفاتاز گروه فسفات آنها را جدا می‌کند تا بتوانند از سلول خارج شوند. در این بیماری در ژن آنزیم گلوکز ۶-فسفاتاز جهش رخ داده در نتیجه عملکرد آن از بین می‌رود. در این شرایط کبد به شدت بزرگ شده و کمبود قند خون که ناشی از عدم آزادسازی گلوکز توسط کبد به خون است سبب هایپوگلیسمی بین وعده‌های غذایی می‌شود.

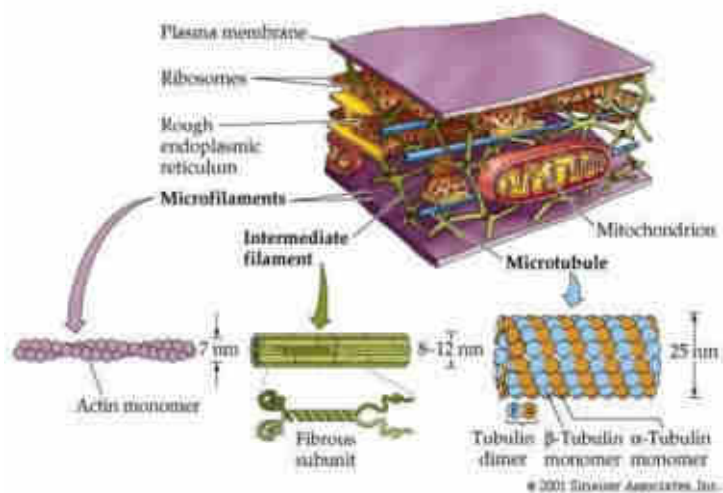


۱.۳ اسکلت سلولی :

توانایی سلول های یوکاریوتی در حفظ شکل، ارتباطات بین اندامکی، حرکت و اتصال به سایر سلول ها و ECM، به اسکلت سلولی وابسته است. این اسکلت از لوله چه ها و رشته هایی تشکیل می شود که با بهره گیری از روش های پیشرفته در به کارگیری میکروسکوپ نوری و الکترونی قابل مشاهده است. این مشاهدات حاکی از وجود سه نوع رشته ی پروتئینی است :

نام رشته یا لوله	واحد سازنده	عملکرد	محل قرارگیری	قطر (داخلی)
ریز رشته (میکروفیلament)	اکتین	-کمر بند انقباضی -خزیدن سلول(حرکات آمیبی شکل)	سراسر سیتوپلاسم بیشتر در قشر سلول (زیر غشا)	۷nm
لوله چه(میکروتوبول)	توبولین*	-دوک تقسیم -ترابری درون سلولی	آزاد در سیتوپلاسم یا متصل به سانتروزوم	۲۵nm
رشته های حد واسط	اکتین	-اتصالات سلول ،به سلول یا ECM -تقویت مکانیکی سلول	-زیر غشای داخلی هسته(لامینای هسته) -عرض سیتوپلاسم -اتصالات بین سلولی	۱۰nm

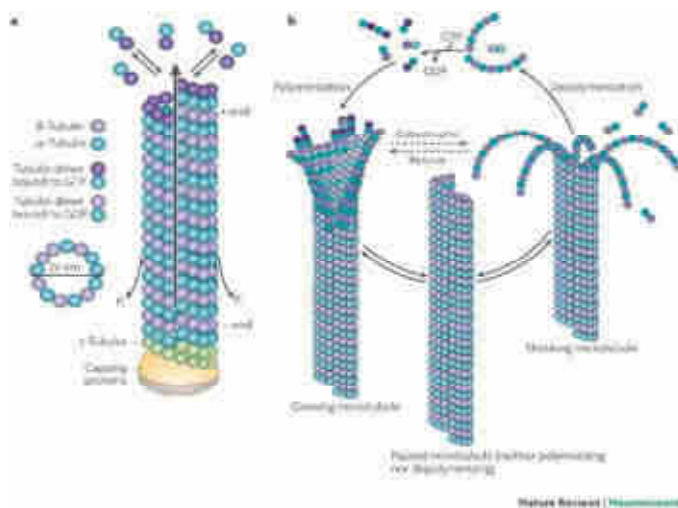
*توبولین های α و β (پروتئین های کروی که ۵۰٪ تشابه توالی آمینواسیدی دارند) به شکل دایمر هایی کنار یکدیگر قرار گرفته و پیش رشته ها را می سازند. هر لوله چه از ۱۳ پیش رشته ساخته شده است که در کنار یکدیگر قرار گرفته اند.



شکل ۳۷- تصویر شماتیک از اجزای اسکلت سلولی

گردهمایی میکروتوبول ها

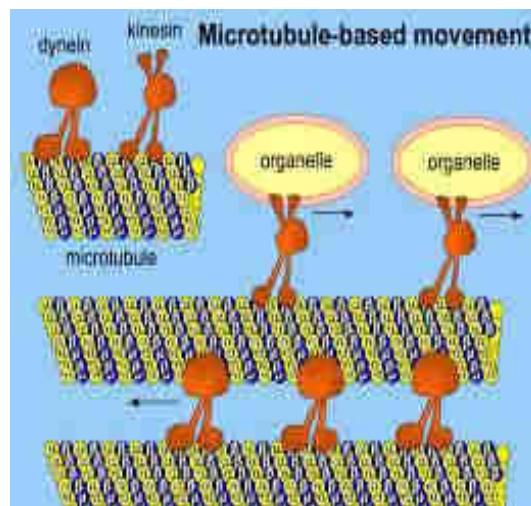
میکروتوبول ها قطبیت دارند. اضافه شدن توبولین ها (پلیمریزاسیون) از هر دو قطب صورت میگیرد اما سرعت این فرایند در سر + تقریباً دو برابر سر - است. همیشه در سیتوپلاسم توبولین آزاد وجود دارد، در هنگام نیاز سانتروزوم که مرکز سازماندهی میکروتوبول ها نیز هست شروع به اضافه کردن توبولین ها به هم می کند. (این کار با مصرف GTP صورت میگیرد) از برخی از دارو ها هم چون کلشی سین و تاکسول برای دخالت در فرایند پلیمریزاسیون و دپلیمریزاسیون استفاده می شود.



شکل ۳۸- تصویر شماتیک گردهمایی میکروتوبول ها

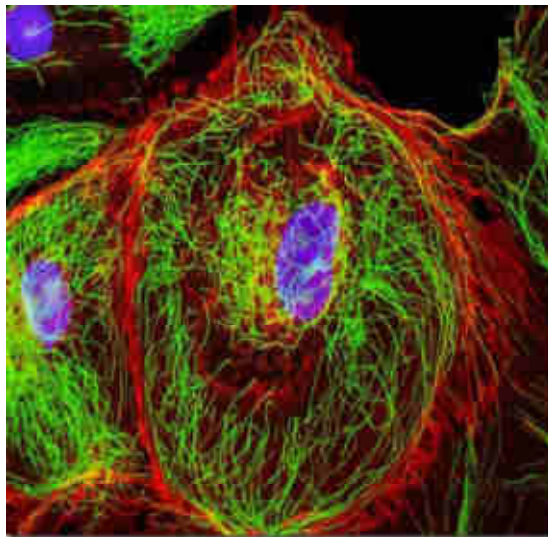
۱.۳.۱ ترابری درون سلولی

گروهی از پروتئین ها که motor protein (پروتئین حرکتی) خوانده می شوند به کمک میکروتوبول در حرکت اندامک ها و وزیکول ها (به ویژه در آکسون نورون ها) نقش دارند. این نتیجه از آن جا حاصل شد که سرعت حرکت مارکرهای فرستاده شده به درون نورون ها بیش از حدی بود که با انتشار قابل توجه باشد. پروتئین های حرکتی از یک طرف به اندامک ها و وزیکول ها و از طرف دیگر به میکروتوبول متصل شده و با مصرف ATP حرکتی مانند قدم زدن روی آن ها انجام می دهند و امکان حرکت درون سلولی را فراهم می کنند.



شکل ۳۹- تصویر حرکت اندامک ها به کمک پروتئین های حرکتی

۱.۳.۲ دوک میتوز

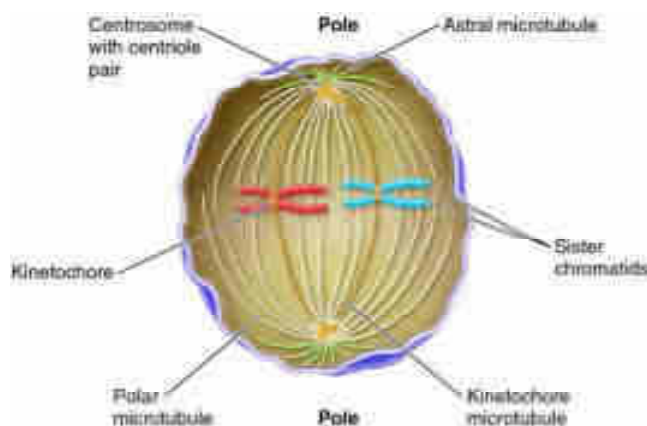


اولین رخداد قابل مشاهده در شروع میتوز مضاعف شدن سانتروزوم است. سانتروزوم محل آغاز به هم پیوستن میکروتوبول های دوک است. دو سانتروزوم از یکدیگر دور شده و در دو انتهای مخالف سلول جای می گیرند و به تشکیل دو قطب دوک های میتوزی کمک می کنند. این دوک ها کروموزوم های مضاعف شده را از هم جدا کرده و بین دو سلول دختری توزیع می کنند. در سلول های جانوری سانتروزوم ها حاوی یک جفت سانتریول هستند که هیچ نقشی در شروع شکل گیری میکروتوبول ها ندارند؛ خصوصا اینکه بیشتر سلول های گیاهی فاقد آن هستند و با این وجود، ریزلوله چه ها در آن ها تشکیل می شوند. در واقع تشکیل ریزلوله چه ها در ناحیه ای بی شکل در نزدیکی سانتریول ها صورت می گیرد.

شکل ۴۰- تصویر میکروسکوپ الکترونی از اسکلت سلولی



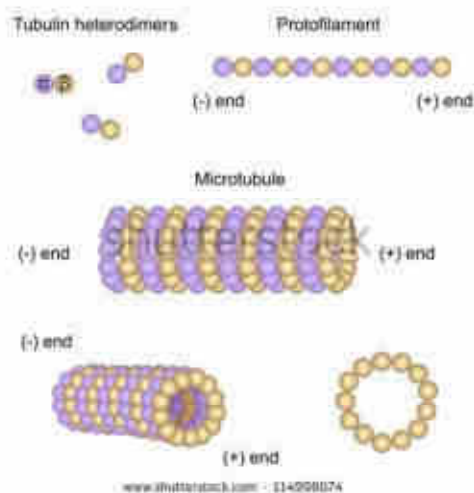
مطالعات میکروسکوپی الکترونی عبوری نشان داده است که دوک میتوز از سه نوع میکروتوبول تشکیل شده است. میکروتوبول های کینتوکوری، میکروتوبول های بین قطبی و میکروتوبول های آستری (ستاره‌ای). میکروتوبول های کینتوکوری میکروتوبول هایی هستند که از قطب منشأ می‌گیرند و هر کدام از طریق مجموعه های پروتئینی خاصی به نام کینه توکور به یکی از کروموزومها متصل می‌شوند. می‌دانید که در شروع میتوز کروماتیدهای حاصل از همانند سازی، جفت و در محل سانترومر متصل‌اند.



شکل ۴۱- دوک میتوز

میکروتوبول های بین قطبی رشته‌هایی هستند که از قطب‌ها به طرف صفحه‌ی میانی دوک کشیده می‌شوند و در ناحیه‌ی صفحه‌ی میانی در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند. میکروتوبول های ستاره‌ای، میکروتوبول های کوتاه تری هستند که از هر قطب به صورت شعاعی خارج می‌شوند. رشته‌های قطبی و ستاره‌ای در جدا شدن نیم دوک‌ها نقش دارند.

چگونه دوک میتوز به‌وجود می‌آید؟ زمانی که یک سلول شروع به تقسیم می‌کند، سانتربول‌های تکثیر شده تفکیک می‌شوند و به دو قطب سلول می‌روند و اسکلت سلولی دستخوش تغییراتی می‌شود. تعدادی از ریزلوله چه (میکروتوبول) های بلند مرحله‌ی اینترفاز تخریب می‌شوند و به ریزلوله‌چه‌های کوتاه دوک میتوز تبدیل می‌شوند. انتهای مثبت (+) بعضی از ریزلوله‌چه‌ها به طور تصادفی به کینتوکورها می‌چسبند و کروموزوم های متصل به ریزلوله‌چه‌ها در صفحه‌ی استوایی به صورت منظم قرار می‌گیرند. در اوایل متافاز کروموزوم‌های متراکم شده را می‌توان مشاهده نمود که بدون داشتن جهت خاصی بین دو قطب دوک در حرکت هستند؛ اتصال ریزلوله‌چه آنها را از این حالت خارج می‌کند. یکی از کینتوکورها به ریزلوله‌چه‌ای که از یک قطب می‌آید متصل می‌شود و کینتوکور دیگر به ریزلوله‌چه‌ای که از قطب مقابل می‌آید می‌چسبند. در نظر داشته باشید، ریزلوله‌چه‌هایی که از قطب‌ها به طرف کینتوکورها کشیده شده‌اند مانند تمام ریزلوله‌چه‌های ساختار دوک قرار گرفته‌اند که انتهای (-) آنها به طرف قطب می‌باشد. از طرفی دیگر تحقیقات نشان داده است که تشکیل و تخریب ریزلوله‌چه‌های کینتوکوری در انتهای (+) آنها سریعتر صورت می‌گیرد. رشته‌های کینتوکوری با تخریب شدن در انتهای (+) کروموزوم‌ها را به قطب می‌برند.

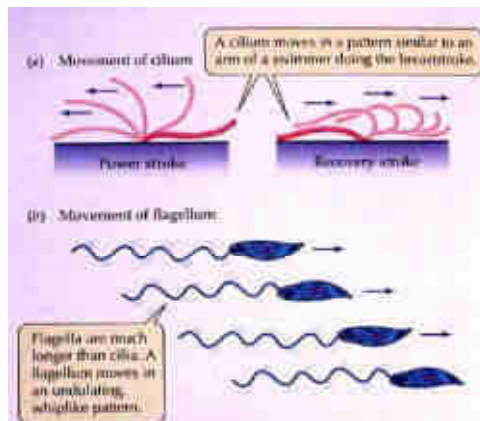


دور شدن دو قطب دوک از یکدیگر مستلزم طویل شدن ریزلوله-
 چه‌های قطبی در انتهای (+) آنهاست. بخش‌های طویل شده‌ی
 ریزلوله‌چه‌های قطبی متقابل، در ناحیه‌ی استوایی دوک در کنار
 یکدیگر قرار می‌گیرند. تحقیقات نشان داده که سر خوردن این
 ریزلوله‌چه‌ها از کنار هم نیرویی به وجود می‌آورد که باعث طویل
 شدن دوک و دور شدن قطب‌ها از یکدیگر و در نتیجه تقسیم
 کروموزوم‌ها میان دو سلول دختر می‌گردد. از طرف دیگر نیروهایی
 که توسط رشته‌های ستاره‌ای در هر قطب دوک تولید می‌شوند نیز
 دو قطب را از یکدیگر دور می‌کنند و آنها را به طرف سطح سلول
 می‌کشند. در این مرحله از میتوز انرژی لازم برای حرکت ریزلوله-
 چه‌ها از طریق هیدرولیز ATP تأمین می‌شود.

کلشی سین یک آلکالوئید گیاهی است که مانع از پلیمریزه شدن توبولین‌ها می‌شود. در حضور این ماده دوک میتوز تشکیل نمی‌شود، کروموزوم‌ها به طرف قطب‌های سلول حرکت نمی‌کنند و تقسیم سلولی انجام نمی‌گیرد. در حقیقت این ماده باعث توقف سلول‌ها در مرحله‌ی میتوز چرخه‌ی سلول می‌شود. از این خاصیت کلشی‌سین برای مطالعه‌ی ساختار کروموزوم‌ها استفاده می‌شود. وین بلاستین و وین کریستین نیز اثر مشابه دارند و مانند کلشی‌سین به عنوان داروی ضدسرطان استفاده می‌شوند.

۱.۳.۳ مژک‌ها و تاژک‌ها

مژک‌ها و تاژک‌ها زواید حرکتی بر روی سطح بسیار از سلول‌های یوکاریوتی هستند. ساختار مژک‌ها و تاژک‌ها بسیار شبیه است، هر دو از ریزلوله‌چه‌ها تشکیل شده‌اند؛ قطرشان حدود ۰/۲۵ میکرومتر است و توسط غشای پلاسمایی پوشیده شده‌اند. تاژک‌ها معمولاً خیلی بلندترند و تعداد آن یک یا چند عدد در هر سلول است. مژک‌ها به تعداد زیاد در سطح وسیعی از سطح سلول وجود دارند. حرکت تازه موجی است و نیرویی در جهت محور تاژک ایجاد می‌کند؛ اما مژک مانند پارو عمل کرده و نیرویی در جهت عمود بر محور مژک ایجاد می‌کند.



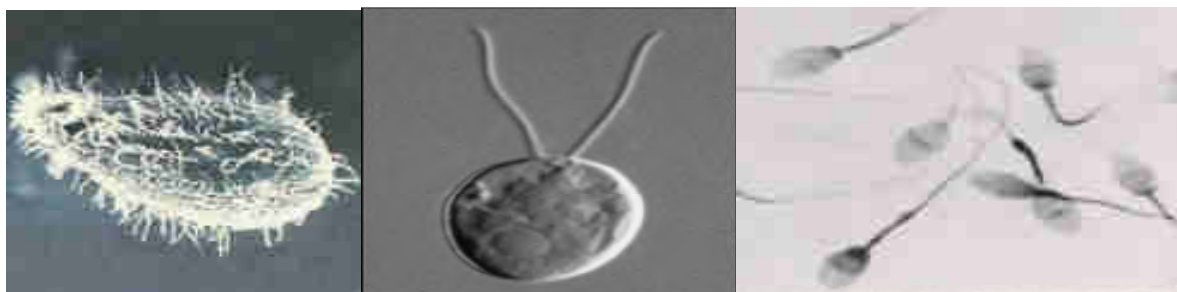
شکل ۴۲- حرکت تازه و مژه. الف) حرکت تازه در اسپرم از جسم سلول شروع می‌شود و به نوک آن پیش می‌رود. به این ترتیب سلول به جلو رانده می‌شود. ب) حرکت تاژک‌های مژه در دو جهت رفت و برگشت صورت می‌گیرد.



تاژک ها در اسپرم سبب حرکت می شوند اما در تک یاخته های گیاهی تازه دار مثل کلامیدوموناس، علاوه بر حرکت در به دام انداختن ذرات غذایی نیز نقش دارند.

وظیفه اصلی مژک ها، حرکت آب در سطح سلول یا به پیش راندن سلول ها در محیط آبی است. در تک یاخته های جانوری مژه دار مثل پارامسی، حرکت و به دام انداختن مواد غذایی به عهده مژه ها است.

تعداد بسیار زیادی مژک سطح سلول های پوششی مجاری تنفسی پستانداران را پوشانده است (بیش از ۱۰۷ مژه). ذرات گرد و غباری که در ترشحات مخاطی این بافت ها گرفتار می شوند، توسط این مژه ها به سمت گلو رانده می شوند. حرکات جارو مانند مژه های سلول های مجرای تخمدان و رحم نیز باعث حرکت تخمک ها و مواد مخاطی می شود.



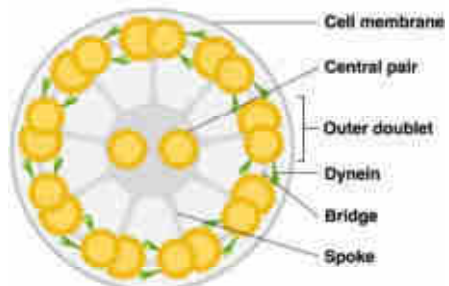
شکل ۴۳- مژه و تاژه در سلول های مختلف. الف- اسپرم دارای یک تاژه است. ب- کلامیدوموناس دارای دو تاژه است. ج- پارامسی دارای تعداد بی شماری مژه است.

همان طور که گفته شد تاژه و مژه هر دو از ریزلوله چه ها تشکیل شده اند. به مجموعه ی ریزلوله چه ها در این دو ساختار اکسونیم گفته می شود. اکسونیم به وسیله ی امتداد غشای پلاسمایی پوشیده می شود و توسط بخشی تحت عنوان جسم پایه در سطح سلول قرار می گیرد. ساختمان جسم پایه مشابه سانتریول است و از میکروتوبول تشکیل شده است. به نظر می رسد که جسم پایه ای در تشکیل ریزلوله چه های تاژه و مژه نقش داشته باشد.

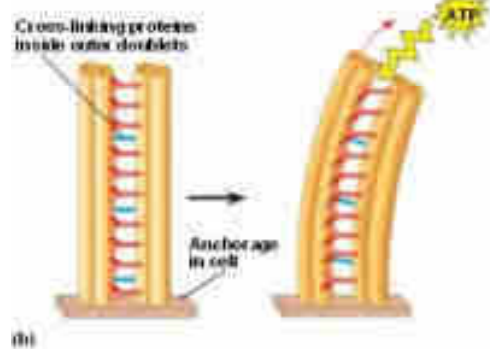
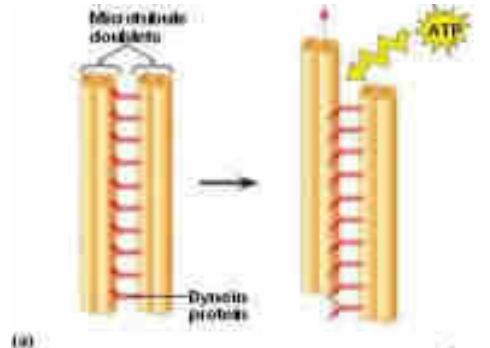
نحوه ی قرار گرفتن ریزلوله چه ها در تاژه و مژه با نحوه ی قرار گرفتن آنها در جسم پایه ای یکسان نیست. در مرکز هر اکسونیم دو ریزلوله چه واحد قرار دارند و نه جفت ریزلوله چه ی پیرامونی دور تا دور این دو را احاطه می کنند. به ریزلوله چه های پیرامونی پروتئین های ضمیمه ی مختلفی به شکل زائده متصل شده اند. نقش عمده ی این زواید پروتئینی برقراری ارتباط بین ریزلوله چه هاست. یک از زواید پروتئینی داینئین نام دارد که ریزلوله چه های پیرامونی مجاور را به یکدیگر متصل می کند و در حرکت مژه ها و تاژه ها دخالت دارد.



Diagram of axoneme



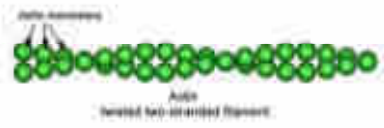
به نظر می‌رسد که حرکت مژه و تازه‌ها نتیجه‌ی سرخوردن ریزلوله‌چه‌های پیرامونی مجاور بر روی یکدیگر است. این سرخوردن در اثر اندرکنش بین داینئین و توبولین در ریزلوله‌چه‌ها صورت می‌گیرد. انرژی لازم برای این عمل از هیدرولیز ATP توسط داینئین که فعالیت ATP آزی دارد تأمین می‌گردد. اگر پس از جدا ساختن اکسونیم‌ها از سلول، به آنها ATP اضافه کنیم حرکات پیچ و خم‌دار اکسونیم‌ها مشاهده می‌شود. این آزمایش‌ها نشان می‌دهد مولکول‌هایی که حرکت مژه و تازه را تحت کنترل دارند در ساختار خود اکسونیم‌ها مستقر هستند. اطلاعات بدست آمده از بررسی جهش یافته‌های کلامیدوموناس نقش اجزای تشکیل دهنده‌ی اکسونیم را در حرکت تازه تأیید می‌کند. به عنوان مثال در بعضی از این جهش یافته‌ها که فاقد داینئین بودند، با وجود تازه، تحرک مشاهده نمی‌شد. عقیمی ارثی در مردان نیز می‌تواند به دلیل نقص در تازه‌ی اسپرم باشد که نتیجه‌ی آن عدم تحرک یا کاهش تحرک اسپرم است. این افراد مژه‌های تنفسی ناقص نیز دارند و به این دلیل اغلب به عفونت‌های مزمن دستگاه تنفسی از قبیل برونشیت و سینوزیت مبتلا هستند.



مژه‌ها در تمام سطوح تکاملی از ابتدایی‌ترین حیوانات تا گیاهان تا انواع سلول‌های حیوانات عالی وجود دارند. مژه‌ها از نظر اندازه و جزئیات ساختاری به طور شگفت‌انگیزی در انواع سلول‌ها یکسان هستند. علاوه بر این، به نظر می‌رسد که عملکرد مژه از زمان پیدایش آن در جلبک سبز یعنی میلیاردها سال پیش تا کنون بدون تغییر باقی مانده است.

ریز رشته‌ها

ریزرشته‌ها که رشته‌های اکتین نیز خوانده می‌شوند زنجیره‌هایی به قطر هفت نانومتر هستند که در تمام سلول‌های یوکاریوتی به وفور یافت می‌شوند. رشته‌های اکتین از واحدهای پروتئینی کروی به نام اکتین تشکیل شده‌اند. یک رشته‌ی اکتین به صورت زنجیره‌ی دوتایی از این زیرواحدهاست که به دور هم پیچیده شده‌اند. رشته‌های اکتین نیز مانند ریزلوله‌ها قطبی هستند و سرعت اضافه و حذف شدن زیرواحدها در انتهای (+) بیشتر از انتهای (-) است

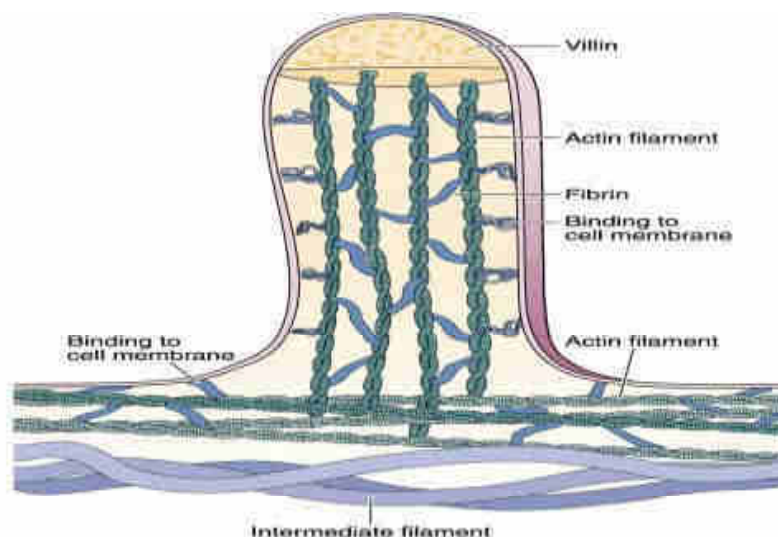


نقش ساختمانی ریزرشته‌ها تحمل نمودن نیروهای کششی می‌باشد. این رشته‌ها مانند ریزلوله‌چه‌ها در سلول‌های مختلف ساختار مشابه دارند و تنوع آنها به دلیل وجود پروتئین‌های ضمیمه‌ی آنهاست. یکی از مهمترین پروتئین‌های

ضمیمه میوزین است. در اینجا اهمیت اکتین و نقش آن را در انجام وظایف متنوع سلولی، با ذکر مثال‌های زیر بیان می‌کنیم.

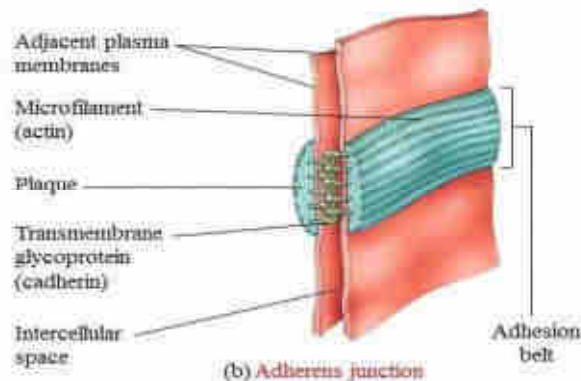
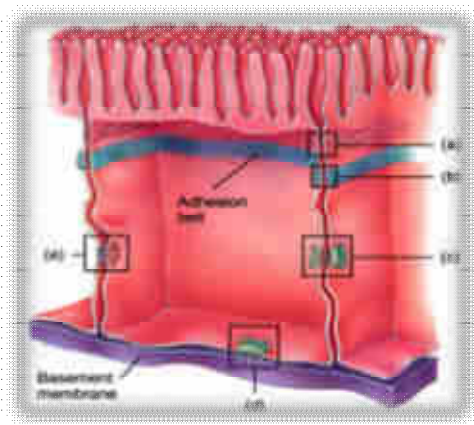
۱.۳.۴ ریزپرزهای سلول‌های پوششی روده

ریزپرزهای سلول‌های روده نمونه‌ای مناسب برای مطالعه رشته‌های اکتین و سایر پروتئین‌های اسکلت سلولی هستند، زیرا به راحتی می‌توان آنها را از سلول‌ها جدا کرد. رشته‌های اکتین در ریزپرزهای سلول‌های پوششی روده آرایش بسیار منظمی دارند و به صورت دستجات اکتینی قرار گرفته‌اند؛ همچنین تجمع این رشته‌ها زیر غشای پلاسمایی، سطح بیرونی را پشتیبانی کرده و باعث تقویت مکانیکی آن می‌شود. اتصال پروتئین‌های ضمیمه به این دستجات از یکسو و غشای پلاسمایی از سوی دیگر باعث می‌شود که غشای پلاسمایی در ریزپرزها به شکل کشیده و مستحکم در آید.



شکل ۴۴- اتصال رشته‌های اکتین به یکدیگر و به غشای پلاسمایی به وسیله پروتئین‌های ضمیمه‌ی مختلف در ریزپرزهای روده-ای

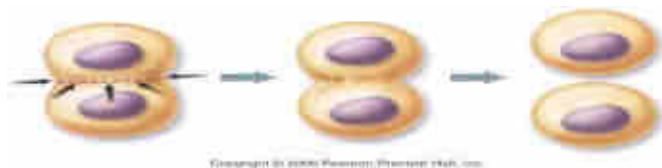
در سلول‌های پوششی روده، رشته‌های اکتین به دو صورت در زیر ریزپرزها قرار گرفته‌اند، یکی شبکه‌ی انتهایی و دیگری کمربند اتصال. در شبکه‌ی انتهایی، تعداد زیادی پروتئین‌های ضمیمه دستجات اکتینی خارج شده از ریزپرزهای مجاور را به یکدیگر متصل می‌کنند. در حقیقت این شبکه به صورت شطرنجی سیتوزول را قطع می‌کند. وجود شبکه‌ی انتهایی در ریزپرزها باعث استحکام غشای پلاسمایی در این نواحی می‌شود. در کمربند اتصال، دسته‌ای از رشته‌های اکتین دور تا دور غشای پلاسمایی هر سلول را به موازات شبکه‌ی انتهایی احاطه می‌کند. این رشته‌های اکتین در دو سلول مجاور، از طریق پروتئین‌هایی که از عرض غشا عبور نموده‌اند به یکدیگر مرتبط می‌شوند و بدین ترتیب سلول‌های مجاور را به یکدیگر متصل می‌کنند.



شکل ۴۵-کمر بند اتصال

۱.۳.۵ تقسیم سیتوپلاسم

هنگام تقسیم سلول های حیوانی اولین نشانه در تفکیک سیتوپلاسم سلول های دختر، ایجاد شکاف در غشای پلاسمایی در امتداد صفحه ی استوایی دوک (عمود بر محور طولی آن) است. این شکاف در اثر انقباض حلقه ی انقباضی ایجاد می گردد که عمدتاً از رشته های اکتین و میوزین تشکیل شده است. رشته های اکتین و میوزین توسط پروتئین هایی به سطح داخل غشای پلاسمایی متصل شده اند. نیروی این حلقه در اثر سُر خوردن رشته های اکتین و میوزین در کنار هم، شبیه آنچه در ماهیچه اتفاق می افتد، ایجاد میشود. این نیرو سبب بهم فشردن قسمت میانه ی سلول در امتداد خط میانی دوک می شود. از آنجایی که هنگام تقسیم سلول و عمیق تر شدن شکاف حلقه ی انقباضی ضخیم تر نمی شود، گفته می شود که در این رشته های اکتین مرتباً تجزیه می شوند. دپلمیریزه شدن رشته های اکتین باعث تنگ شدن حلقه ی انقباضی، عمیق شدن شکاف و در نهایت تفکیک سلول های دختر می شود.



شکل ۴۶- تقسیم سیتوپلاسم. طرحی از حلقه انقباضی.

۱.۴ ارتباطات بین سلولی

۱.۴.۱ ماتریکس خارج سلولی



در موجودات پر سلولی اغلب بافت هایی تشکیل شده اند که به یکدیگر چسبیده اند و با هم ارتباط برقرار می نمایند. سلول های هم نوع یا مشابه به طور اختصاصی و محکم به یکدیگر متصل می شوند و این اتصالات را دستجاتی از مولکول های موجود در سطح سلول ها امکان پذیر می سازند. بعضی از سلول ها می توانند به سلول های غیر هم نوع نیز بچسبند که این نوع ارتباط، در تمایز بافت ها اهمیت بالایی دارد. بافت های جانوری تنها از



سلول‌ها ساخته نشده‌اند، بلکه دارای حجم زیادی از اجزای خارج سلولی هستند که در ایجاد و حفظ شکل و ساختار بافت و نیز عملکرد آن (مانند تنظیم رفتار، پیام‌رسانی، بقا، نمو و مهاجرت) نقش حیاتی دارند. سلول‌ها به شبکه‌ای مرکب از پروتئین‌ها و قندهای مترشح به نام زمینه‌ی خارج سلولی که فضاهای بین سلولی را پر می‌کند متصل می‌شوند. زمینه‌ی خارج سلولی تنها یک شبکه نیست که سلول‌ها را احاطه می‌کند و آنها را در جای خود نگاه می‌دارد. در بسیاری از موارد وجود زمینه‌ی سلولی برای انجام عملکردهای خاص سلول ضروری است. بسیاری از فاکتورهای رشد و هورمون‌ها به زمینه‌ی سلولی متصل می‌شوند. فاکتورهای رشد و سایتوکاین‌ها هم گاهی به ECM متصل می‌شوند، که اولاً باعث حفاظت آنها از تخریب آنزیمی می‌شود و دوماً ممکن است در برخی موارد سبب مطلوب‌سازی برهمکنش گیرنده-لیگاند شود. بنابراین چنین ساختاری می‌تواند به عنوان مخزن دائمی پیام‌هایی باشد که سلول‌های چسبیده به آن دریافت می‌نمایند. اتصال فاکتورهای رشد به ماکرومولکول‌ها از فرآیندهای طبیعی است که در مهندسی بافتی از آن تقلید می‌شود. سلول‌ها برای اینکه تمایز یابند احتیاج به زمینه‌ی سلولی دارند. ریخت‌زایی بافت‌ها که مرحله‌ی نهایی شکل‌گیری یک موجود زنده است در اثر حرکت و تغییر آرایش سلول‌ها صورت می‌گیرد و به مولکول‌های زمینه‌ی سلولی وابسته است. طی رشد و تکامل موجودات، در هر ناحیه از بدن مولکول‌های زمینه حتی در افراد بالغ در مواردی مثل ترمیم زخم صورت می‌گیرد.

یافته‌های اخیر پیشنهاد می‌کنند که شکل هندسی ماتریکس حتی در غیاب خصوصیات شیمیایی می‌تواند عملکرد و فنوتیپ سلولی را تحت تاثیر قرار دهد. اجزای اصلی این ماتریکس خارج سلولی (ECM) بیشتر پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها هستند که یا ترشح شده‌اند، یا به غشای سلول متصلند. ماکرومولکول‌های تشکیل‌دهنده ECM را می‌توان در دو دسته کلی بررسی کرد: پروتئوگلیکان‌ها، که یک پروتئین مرکزی به همراه زنجیره‌های پلی‌ساکاریدی متصل به آن هستند، و گلیکوپروتئین‌ها، که نسبت وزنی قند به پروتئین در آنها کمتر از پروتئوگلیکان‌ها است. فراوان‌ترین گلیکو پروتئین موجود در ECM سلول‌های انسان، کلاژن است که نزدیک به نیمی از کل پروتئین‌های بدن انسان را شامل می‌شود.

پروتئین‌های ECM توسط پروتئازهای ویژه‌ای تجزیه می‌شوند. این پروتئازها ابتدا به صورت غیرفعال توسط سلول‌ها ترشح می‌شوند و فقط در زمان مورد نیاز (معمولاً) با برش پروتئازی فعال می‌شوند. سلول‌ها هم‌زمان مهارکننده‌های این پروتئازها را هم ترشح می‌کنند تا مانع از تجزیه ناخواسته شوند. ماتریکس خارج سلولی کمپلکسی پویا است که توسط تنظیم دقیق تجزیه و نوآرایی آن در بافت حفظ می‌شود.

سلول‌ها توسط پروتئین‌های تراغشایی به نام اینتگرین‌ها به گلیکوپروتئین‌هایی (مانند فیبرونکتین) در ماتریکس متصل هستند. اینتگرین، یک پروتئین فعال است و پیام‌ها را بین ماتریکس خارج سلولی و اسکلت سلولی انتقال می‌دهد.

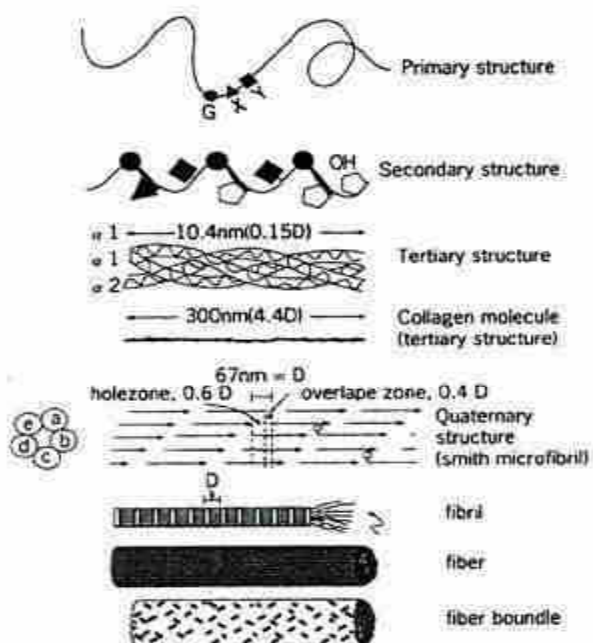
دسته‌ای از مولکول‌ها موسوم به گلیکوزآمینوگلیکان‌ها (GAG) (ها) قندهایی هستند که در پروتئوگلیکان‌ها و یا به تنهایی در ECM یافت می‌شوند. این پلی‌ساکاریدهای شدیداً آبدوست، با جذب آب حجیم شده و حالت ژله‌ای ماندنی به خود می‌گیرند. ECM داربستی را فراهم می‌کند که به همراه مایع بین سلولی سبب مقاومت در برابر کشش‌های حاصل از رشته‌ها و استرس‌های فشار حاصل از شبکه هیدراته می‌شود. برعکس کلاژن که در برابر کشش مقاوم است، پروتئوگلیکان‌هایی که به GAGها متصل می‌شوند، در برابر متراکم شدن مقاوم هستند. در بافت‌های متراکم مانند



استخوان ها، مقدار GAG ها در ماتریکس کمتر است و بافت عمدتاً از کلاژن تشکیل یافته است. برعکس، ماده ژله مانند چشم اساساً از یک نوع GAG به علاوه آب تشکیل شده است. بارهای منفی GAG ها، کاتیونهایی مانند سدیم را به مایع میان بافتی جذب می کنند که به دنبال آن آب به طریق اسمز جذب می شود.

کلاژن

کلاژن خانواده ای بزرگ از پروتئین های بستر بیرون سلولی است که عمل اصلی آنها فراهم کردن پشتیبانی ساختاری برای بافت است. بیش از ۲۰ نوع کلاژن وجود دارد که ۱۶ نوع آنها در انسان شناسایی شده است که هر کدام در بافت خاصی وجود دارد. تمام مولکول های کلاژن مارپیچ راست گرد سه پلی پپتیدی هستند. تنوع این کلاژن ها به دلیل تفاوت

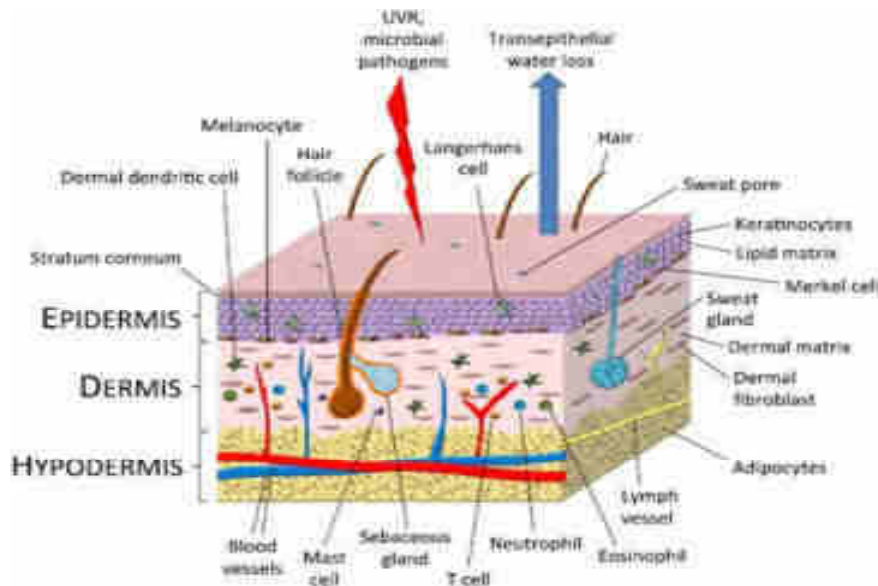


در ماهیت پلی پپتیدی های تشکیل دهنده آنها است. از کنار هم قرار گرفتن مارپیچ های کلاژن، رشته های کلاژن به وجود می آیند. پلی پپتیدهای کلاژن پس از ساخته شدن بر روی شبکه ای اندوپلاسمی زبر، هیدروکسیله و گلیکوزیله می شوند (این فرآیند نیازمند آسکوربیک اسید یا ویتامین C) است و در همین اندامک به شکل مارپیچ سه پلی پپتیدی در می آیند. در مرحله ای بعد اضافه شدن گروه های قندی دیگر به این ساختار در دستگاه گلژی صورت می گیرد و باعث استحکام ساختمان مارپیچ سه تایی کلاژن می شود. کلاژن به این شکل طی اگزوسیتوز، از جسم گلژی به بیرون سلول هدایت می شود و مراحل بعدی تکامل ساختاری کلاژن در خارج سلول صورت می گیرد.

مولکول های کلاژن ها به دنبال و در کنار یکدیگر قرار می گیرند. اتصال بین مولکول های کلاژن با پیوندهای کووالان بین انتهای آمینو (N) و انتهای کربن (C) مولکول مجاور برقرار می گردد و باعث پایداری می شود. انواع کلاژن بخش عمده ای ماده زمینه ای بافت پیوندی غضروف و استخوان را تشکیل می دهند. دستجات متراکم این رشته ها در تاندون که ماهیچه را به استخوان متصل می کند، وجود دارند و با قابلیت کشش خود می توانند نیروهای زیادی را متحمل شوند. بیشتر سلول های پوششی و سایر دستجات منظم سلولی مثل ماهیچه بر روی زمینه ای نازکی به نام غشای پایه ای قرار گرفته اند. این غشا شبکه ای دو بعدی از رشته های کلاژن است و در حقیقت محل اتصال سلول های اپیتلیال و یا اندوتلیال به بافت پیوندی نرم زیرین آنهاست. غشای پایه ای از یک طرف با پروتئین های چسبنده غشای پلاسمایی سلول ها و از طرف دیگر با رشته های کلاژن بافت پیوندی نرم اتصال برقرار می کند. بافت پیوندی نرم واجد تعداد زیادی سلول از جمله فیبروبلاست هاست که زمینه ای خارج سلولی را می سازند و وجود پروتئین هایی مثل کلاژن و الاستین در زمینه ای سلولی



این بافت موجب شکل‌گیری، استحکام و انعطاف‌پذیری آن می‌شود. قسمت عمده‌ی فضای بافت پیوندی نرم را پروتئوگلیکان‌های به شدت آبدار اشغال می‌کنند و موجب طبیعت ژله مانند آن می‌گردند. مویرگ‌های خونی که اکسیژن و مواد غذایی را به تمام سلول‌ها در سطح بدن می‌رسانند، در بافت پیوندی نرم وجود دارند. نقش عمده‌ی زمینه‌ی سلولی در این بافت، تسهیل انتشار اکسیژن و مواد غذایی به سلول‌های سطحی (اپیتلیوم) و غده‌هاست. بافت پیوندی سخت در اعضای از بدن وجود دارد که عملکرد آنها با قدرت و انعطاف‌پذیری همراه است مثل استخوان، غضروف و تاندون. این بافت بر خلاف بافت پیوندی نرم تعداد کمی سلول دارد و اجزای اصلی ساختار آن را پروتئین‌های رشته‌ای نظیر کلاژن، پروتئوگلیکان‌ها، گلیکو پروتئین‌ها و الاستین تشکیل می‌دهند.



شکل ۴۷- نمای شماتیک یک مقطع از پوست. سلول‌های اپیدرم بر روی غشای پایه‌ای نازکی مستقر شده‌اند. غشای پایه‌ای با لایه‌ی ضخیم بافت پیوندی نرم ارتباط برقرار می‌کند که از مقدار زیادی رشته کلاژن و سلول‌های مختلف تشکیل شده است.

اسید هیالورونیک

اسید هیالورونیک یکی دیگر از انواع GAG‌های تشکیل دهنده‌ی زمینه‌ی خارج سلولی و تنها GAGی است که به طور طبیعی جزئی از پروتئوگلیکان نیست. این ترکیب در بافت غضروف، و در بافت‌هایی که سلول‌ها در آن مهاجرت می‌کنند مانند بافت‌های در حال ترمیم و بافت‌های جنینی، جزء اصلی زمینه را تشکیل می‌دهد. سلول‌های مهاجر سلول‌هایی هستند که به صورت منفرد در بدن جابجا می‌شوند. اسید هیالورونیک با خواص فیزیکی شگفت‌انگیز خود باعث مقاومت، حالت ارتجاعی و لغزندگی بسیاری از بافت‌های پیوندی مثل مفاصل می‌گردد. اسید هیالورونیک یک پلی ساکارید با زنجیره طویل و با بار منفی است. این مولکول بسیار آبدوست است و در نتیجه‌ی جذب آب، ژل پر آب و چسبنده‌ای را به وجود می‌آورد. در اثر جذب آب، حجم مولکول ۱۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ برابر افزایش می‌یابد که نتیجه‌ی آن حجم شدن و ایجاد مقاومت در مقابل فشردگی است.

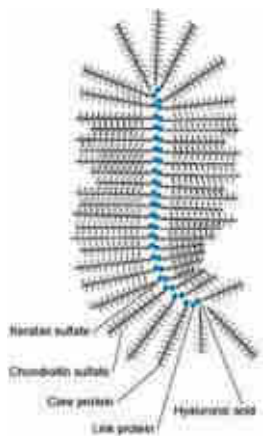
اسیده‌های هیالورونیک در سطح بسیاری از سلول‌های مهاجر نیز وجود دارد. اسید هیالورونیک به دلیل داشتن طبیعت شل، آبکی و متخلخل، مانع از چسبیدن سلول‌ها به یکدیگر می‌شود و به آنها آزادی حرکت می‌دهد. کاهش در مقدار اسید هیالورونیک باعث توقف حرکت سلول‌ها و چسبیدن آنها به یکدیگر می‌شود. عملکردهای اسید هیالورونیک بخصوص



در تمایز سلول ها اهمیت زیادی دارد. یک نمونه‌ی بارز، تمایز سلول های پیش‌ساز ماهیچه‌ی مخطط یا میوبلاست‌هاست. میوبلاست‌ها در سطح خود پوششی غنی از اسید هیالورونیک دارند که از هم جوشی زودرس سلول ها ممانعت می‌کند. در نتیجه‌ی هم‌جوشی چندین میوبلاست، ساختار رشته مانند که چند هسته‌ای است به وجود می‌آید که میوفیبر نام دارد. در هنگام هم جوشی سلول ها، اسید هیالورونیک تجزیه می‌گردد و سلول های بهم چسبیده شروع به ساختن زمینه‌ی سلولی جدید که عاری از اسید هیالورونیک است می‌نمایند. این زمینه‌ی جدید همان غشای پایه‌ای است که سلول ها را به بافت پیوندی متصل می‌کند.


سایر مولکول ها

پروتئوگلیکان‌ها و گلیکوپروتئین‌ها هر دو ماکرومولکول هایی هستند که در تمام بافت‌های پیوندی، زمینه‌های خارج سلولی و سطح بسیاری از سلول ها وجود دارند. تفاوت این دو ماکرومولکول در نسبت پروتئین و کربوهیدرات و طول زنجیره‌های پلی‌ساکاریدی آنهاست. مقدار قند در پروتئو گلیکان‌ها، در مقایسه با گلیکوپروتئین‌ها زیادتر و طول زنجیره‌ی قندی بیشتر است. ویژگی مهم این ماکرومولکول‌ها تنوع زیاد آنهاست که دلیل آن وجود پروتئین و قندهای متفاوت در ساختار آنها می‌باشد. پروتئوگلیکان‌های موجود در غضروف یک تجمع بسیار بزرگ مولکولی را تشکیل می‌دهند. طول این مجموعه به چهار میکرومتر می‌رسد و حجم آن بیش از حجم یک سلول باکتری است. این پروتئوگلیکان موجب خاصیت منحصر به فرد ژله مانند غضروف و پایداری شکل آن می‌شود. این موضوع برای توزیع بار روی مفاصل تحمل کننده وزن ضروری است. گلیکوپروتئین‌ها علاوه بر اینکه در ساختار زمینه‌ی سلولی وجود دارند، نقش مهمی در تنظیم اتصال سلول به زمینه، مهاجرت سلول و شکل‌گیری آن ایفا می‌کنند. لامینین و فیبرونکتین از انواع مهم گلیکو پروتئین‌ها هستند.



هر دو این گلیکوپروتئین‌ها دارای جایگاه اتصال به گیرنده های سلولی و اجزای زمینه‌ی سلولی می‌باشند، بنابراین سلول ها را به زمینه‌ی اطرافشان متصل می‌کنند. یک مثال از نقش این ترکیبات در مهاجرت و تمایز سلول ها، طویل شدن اکسون‌ها است. طویل شدن و حرکت انشعاب اکسونی نوروها اغلب در مسیرهایی صورت می‌گیرد که واجد لامینین است. در حالی که اکسون‌ها به جلو حرکت می‌کنند، اتصال بین گیرنده‌های سر اکسون و لامینین در زمینه‌ی سلولی، دائماً تشکیل و تخریب می‌شود. به این ترتیب اکسون‌ها در مسیرهای معین پیشروی می‌کنند و به بافت هدف می‌رسند. اگر سلول های عصبی را بر روی لایه نازکی از لامینین و کلاژن که بر روی سطح پلاستیک خشک شده‌اند قرار دهیم، انشعابات اکسونی ایجاد می‌گردند. لامینین اثراتی شبیه هورمون‌ها بر سلول های عصبی دارد از این نظر که پیام‌های خود را از طریق چسبیدن به گیرنده‌های سطح سلول به درون آن منتقل می‌کند.

فیبرونکتین علاوه بر نقشی که در اتصال سلول ها به زمینه دارد، در تمایز سلول های جنینی و ترمیم زخم‌ها نیز دخالت دارد. فیبرونکتین‌ها به همراه کلاژن‌ها و پروتئوگلیکان‌ها زمینه‌ای با فشردگی کم به وجود می‌آورند و در نتیجه حرکت سلول ها از میان آن به آسانی صورت می‌گیرد. فیبرونکتین‌ها باعث سهولت در مهاجرت ماکروفاژها و سایر سلول



های ایمنی به محل زخم و ترمیم آن می‌گردند. هنگام لخته شدن خون، فیبرونکتین‌ها باعث چسبیدن پلاکت‌ها به یکدیگر می‌شوند. بسیاری از سلول‌های حیوانی کشت شده با ترشح فیبرونکتین به جدار داخلی ظرف می‌چسبند.

۰.۴.۲ پیام‌رسانی سلولی (signaling):

سلول‌های منفرد همانند موجودات پرسلولی نیاز دارند محیط زندگی خود را درک کنند و به آن پاسخ بدهند. به همین منظور باید مکانیسم‌هایی برای دریافت اطلاعات از محیط اطراف خود داشته باشند. این مکانیسم‌ها در همه‌ی سلول‌ها دیده می‌شود و از مثال‌های شاخص آن می‌توان به ارتباط بین سلول‌های آمیزشی مخمر اشاره کرد. با این وجود، در پرسلولی‌ها این مکانیسم‌ها نسبت به تک‌سلولی‌ها پیچیده‌تر شده است و سلول‌ها برای ارتباط با یکدیگر و محیط اطراف به ابزارهایی مجهز شده‌اند.

پیام‌ها انواع مختلفی دارند. سلول‌ها برای دریافت هر پیام باید گیرنده‌ی مربوط به آن را داشته باشند (انواع گیرنده‌ها در ادامه بررسی خواهد شد). بیشتر پیام‌ها از نوع شیمیایی هستند، فاکتورهای رشد، هورمون‌ها، اجزای محیط خارج سلولی مانند میانجی‌های موضعی اما محرک‌های مکانیکی هم چون فشار و لمس، محرک‌های صوتی (امواج صوتی) و محرک‌های نورانی نیز وجود دارند.

انواع پیام‌رسانی:

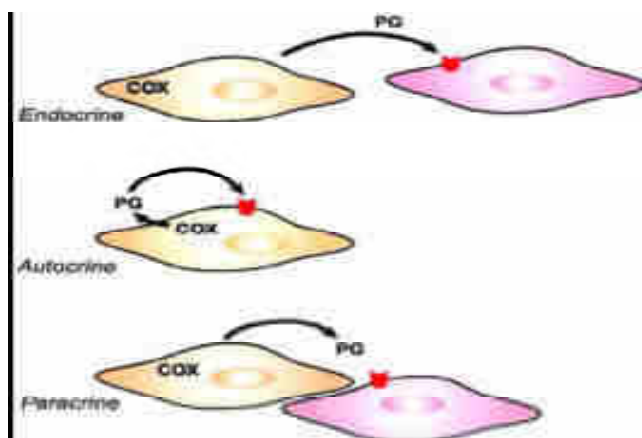
۱- اندوکراین: هورمون‌ها پیام‌رسان‌های این مسیر می‌باشند که از سلول ترشح‌کننده، به داخل خون ترشح شده و به گیرنده‌ی خود در داخل (هورمون استروئیدی و بعضی از هورمون‌های آمینواسیدی) یا درغشای سلول هدف (هورمون پروتئینی) متصل می‌شوند.

۲- پاراکراین: انتقال بین سلول‌هایی که در نزدیکی هم قرار گرفته‌اند. پیام‌رسان‌های این مسیر میانجی‌های موضعی هم چون (EFG, NO, ...) هستند. این مسیر در تکوین موجودات (مثل تکوین سیستم عصبی) اهمیت زیادی دارد. سلول‌ها طی این روش رفتار سلول‌های اطراف خود را تنظیم می‌کنند. نوعی از پیام‌رسانی پاراکراین، اتوکراین است. گاهی امکان فعالسازی مسیر خاصی از درون سلول وجود ندارد و سلول حتماً باید توسط محرک خاصی فعال شود در نتیجه خود سلول مولکول پیام‌رسان تولید کرده و به مولکول پیام‌رسانی که خود تولید کرده پاسخ می‌دهد. مثلاً در سیستم ایمنی، سلول‌های T در برخورد با میکروارگانیسم‌های مهاجم (آنتی‌ژن‌های بیماری‌زا) فاکتورهای رشدی از خود ترشح می‌کنند و خود به آن پاسخ داده و تقسیم می‌شوند تا تعدادشان افزایش پیدا کند و نابودی میکروارگانیسم مذکور سریع‌تر اتفاق بیفتد.

۳- synaptic signaling (پیام‌رسانی سیناپسی): که تقریباً نوعی پیام‌رسانی پاراکراین محسوب می‌شود اما پیام‌رسان‌های آن عصبی بوده و neurotransmitter نامیده می‌شوند که از جمله‌ی آن‌ها می‌توان به استیل‌کولین و GABA اشاره کرد.



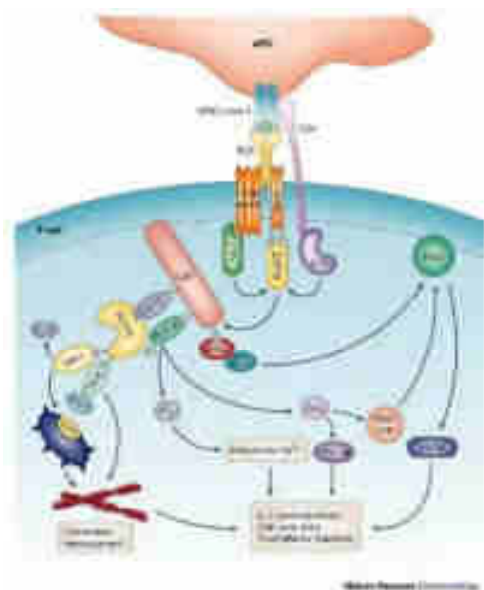
۴- پیام رسانی تماسی: در این روش سلول ها نزدیک ترین فاصله را با هم دارند و نیازی به ترشح مولکول پیام رسان نیست بلکه سلول ها از طریق پیام رسان های موجود در غشای سلول با هم در تماس مستقیم اند. (مولکول پیام رسان واقع در غشا به گیرنده ی خود در غشای سلول دیگر متصل می شود). مثالی از این روش، پیام رسانی Notch-delta است.



شکل ۴۸- تصاویر شماتیک از انواع پیام رسانی (شکل سمت چپ پیام رسانی تماسی بین دو نوع از سلول های دستگاه ایمنی را نشان می دهد)

پیام رسانی سلولی از سه مرحله تشکیل شده است:

- ۱- دریافت پیام
- ۲- انتقال پیام (تغییر شکل پیام به گونه ای که برای سلول قابل فهم و پاسخ باشد)
- ۳- پاسخ به پیام



۱- دریافت: دریافت پیام نیازمند وجود گیرنده ی اختصاصی برای آن پیام مورد نظر میباشد. (به مولکول پیام رسانی که به گیرنده متصل میشود لیگاند میگوییم).

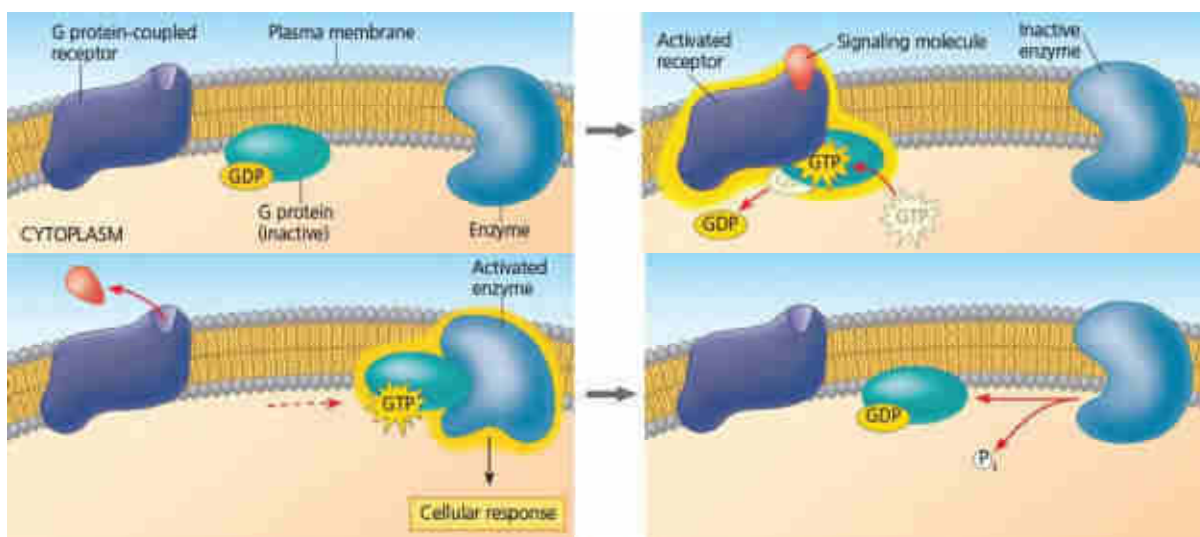
انواع گیرنده:

- ۱- گیرنده ی وابسته به پروتئین G: این گیرنده یک پروتئین سراسری با مارپیچ آلفا است که هفت بار از غشا عبور کرده (مارپیچ آلفا یک

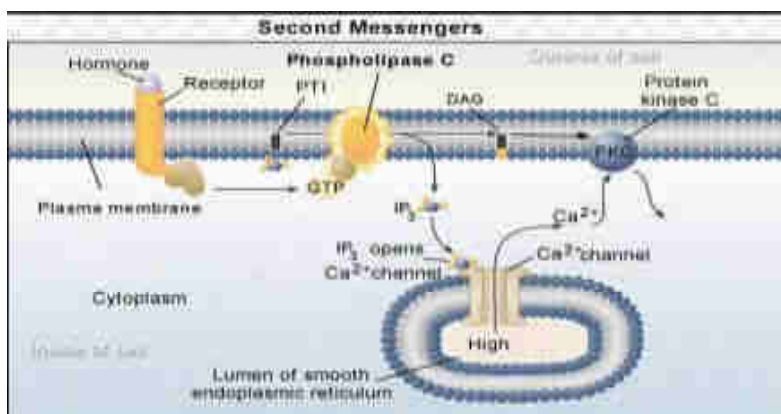
ساختار دوم برای پروتئین است) و در قسمت آبدوست مجاور سیتوپلاسم به پروتئین G متصل است. پروتئین G از سه دمین آلفا و بتا و گاما تشکیل شده که بتا و گاما همیشه به هم متصل اند و دمین آلفا قابلیت حرکت دارد. این دمین در حالت غیر فعال به GDP و در حالت فعال به GTP متصل است. پس از اتصال لیگاند به گیرنده، شکل آن تغییر می کند و باعث میشود که یک GTP با GDP جایگزین شده و دمین آلفا فعال شود. حال دمین آلفا از بتا و گاما جدا شده و به سمت آنزیم مورد نظر خود در غشا میروود و با اتصال به آن، آن را فعال یا مهار می کند. دو مسیر پیام رسانی معروف در این رابطه وجود دارد که به طور مختصر به شرح زیر است:

-پیام رسانی آدرنالین: پس از اتصال دمین آلفا به آنزیم مورد نظر (که در این جا یک آدنیلیل سیکلاز است) آنزیم فعال شده و ATP را به cAMP تبدیل میکند. cAMP تولید شده به جایگاهی غیر از جایگاه فعال (جایگاه آلوستریک) پروتئین کیناز A متصل میشود و آن را فعال می کند. پروتئین کیناز A یک آنزیم فسفریله کننده است و از طریق فسفریله کردن پروتئین های دیگر آن ها را تنظیم میکند که در این جا فسفریلازی را فعال میکند که موجب فسفریله شدن گلیکوژن و تبدیل شدن آن به گلوکز ۱-فسفات می شود.

-پیام رسانی IP3 , DAG : آنزیم فعال شده در این مسیر فسفولیپازی است که یک فسفولیپید در غشا را که PIP2 نام دارد به DAG و IP3 تجزیه می کند. IP3 وارد سیتوپلاسم شده و روی گیرنده اش در غشای شبکه اندوپلاسمی می نشیند و باعث باز شدن کانال کلسیم و نشت آن به داخل سلول می شود. Ca به همراه DAG که در غشا باقی مانده است آنزیم دیگری را فعال می کنند و مسیر های دیگری را راه اندازی می کنند.

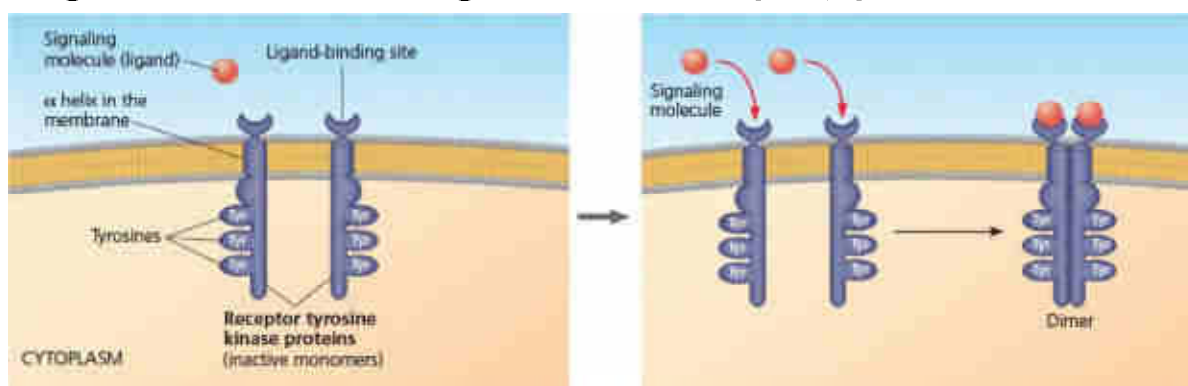


شکل ۴۹- تصویر شماتیک از مسیر پیام رسانی پروتئین G



شکل ۵۰- تصویری از مسیر پیام رسانی DAG, IP₃

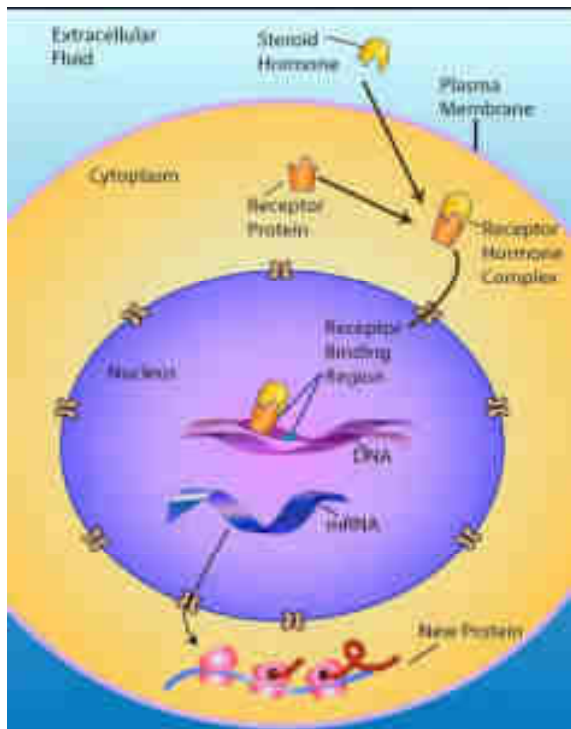
۲- گیرنده ی تیروزین کیناز: ویژگی این گیرنده ها این است که می توانند بیش از یک مسیر پیام رسانی را هم زمان فعال کنند. این گیرنده ها حاوی آمینو اسید تیروزین هستند که می توانند فسفریله شده و سپس پروتئین های دیگری را فعال یا مهار کنند. بیشتر این پروتئین ها فاکتور های رونویسی هستند و یا بر فاکتورها اثر می گذارند.



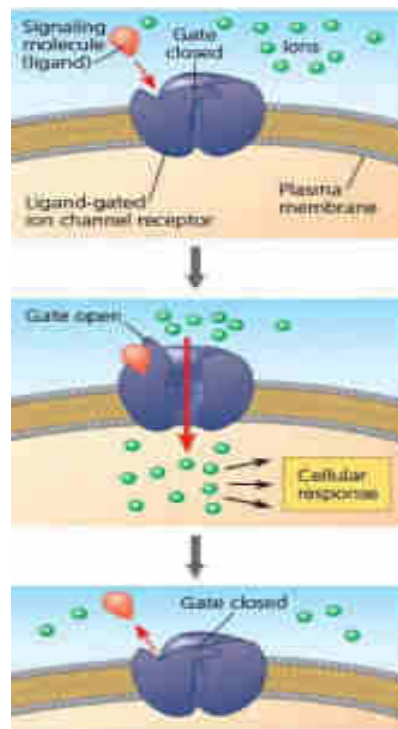
شکل ۵۱- تصویر شماتیک از یک گیرنده تیروزین کیناز و نحوه ی فعال شدن آن

۳- گیرنده های کانال یونی: این گیرنده ها دریچه دارند، برخی وابسته به لیگاند (گیرنده ی استیل کولین در غشای نورون پس سیناپسی) و برخی وابسته به ولتاژ هستند (در صورت تغییر پتانسیل غشا باز و بسته می شوند، کانال سدیم و پتاسیم) و عده ای نیز مکانیکی بوده و در اثر کشش یا فشار باز و بسته می شوند (گیرنده ها در ماهیچه ی صاف لوله ی گوارش).

۴- گیرنده های سیتوپلاسمی و هسته ای: بیشتر پروتئین های فعال شده در این مسیر فاکتور رونویسی اند.

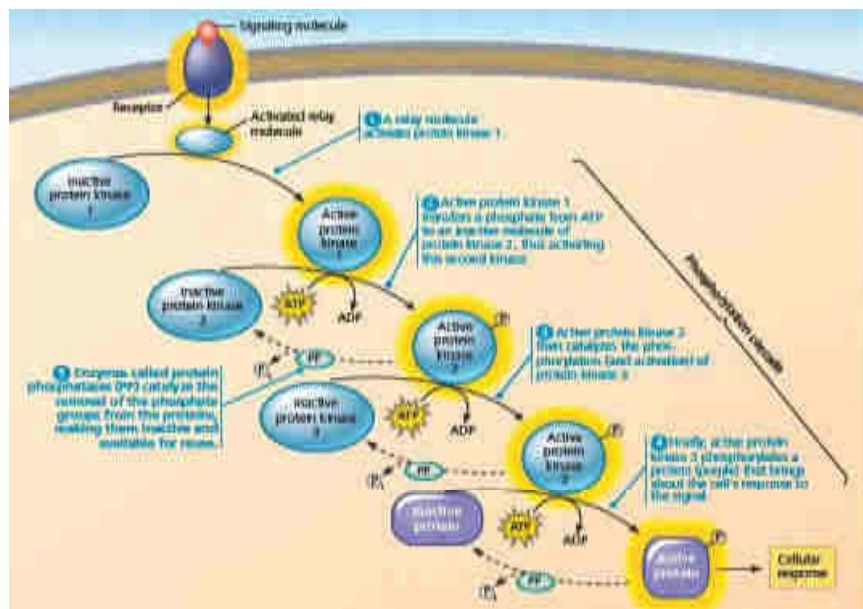


شکل ۵۳- تصویری از مسیر پیام رسانی هورمون استروئیدی (گیرنده داخل سلولی)



شکل ۵۲- تصویر شماتیک از یک گیرنده کانال یونی

۲- **تبدیل و انتقال پیام:** اتصال مولکول پیام رسان به گیرنده موجب راه اندازی زنجیره ای از واکنش ها می شود. از جمله ی این واکنش ها می توان به فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون پروتئین ها و در نتیجه تحریک و مهار شدنشان اشاره کرد. پروتئین های فعال شده در سلول کاری را انجام می دهند یا از آن جلوگیری می کنند.



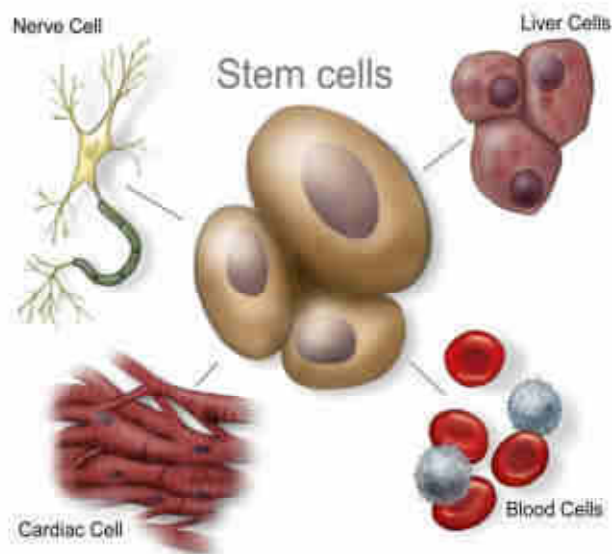
شکل ۵۴- نمونه ای از آیشار پیام رسانی در فرایند تبدیل و انتقال پیام

۳- پاسخ: ممکن است در سیتوپلاسم رخ دهد یا فعالیتی در هسته را شامل شود. پاسخ سلول به بسیاری از مسیرها روشن یا خاموش کردن برخی از ژن هاست که توسط عوامل رونویسی انجام می شود.
 * آن چه خواندید خلاصه ای از فرایند signaling بود. مطالب زیاد دیگری نیز وجود دارد که در این مقوله نمیگنجد.



فصل دوم

سلول های بنیادی



مفاهیم کلیدی :

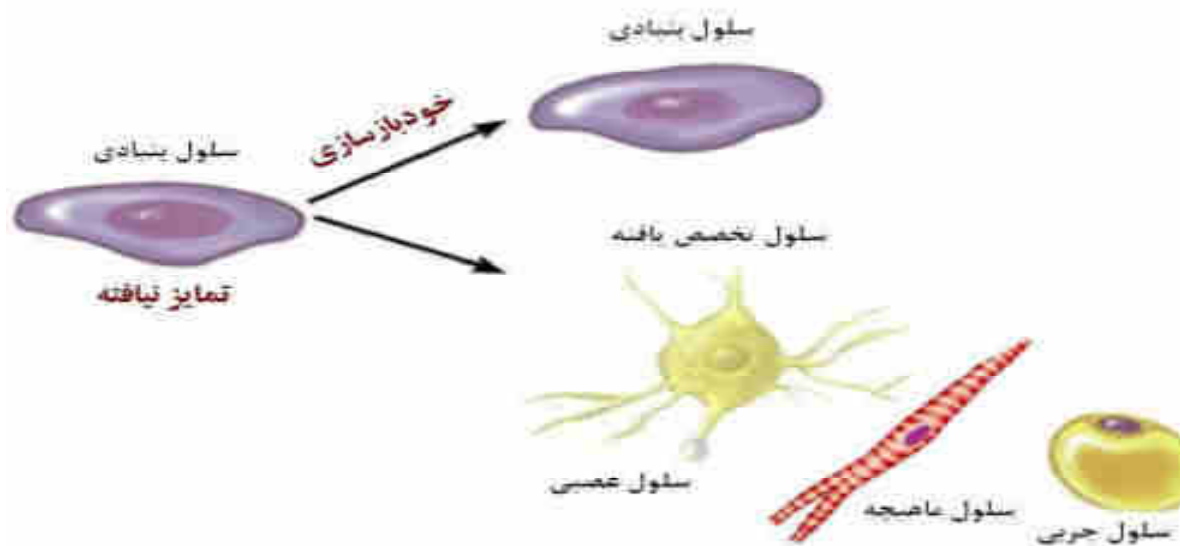
- ۲.۱ مقدمه ای در مورد سلول بنیادی
- ۲.۲ طبقه بندی سلول های بنیادی
- ۲.۳ نگاهی دقیق تر به سلول های بنیادی
- ۲.۴ استفاده از سلول های بنیادی

۲.۱ مقدمه ای راجع به سلول بنیادی

سلول بنیادی لفظی کلی است و به گروهی از سلول های بدن گفته می شوند که دارای چند ویژگی مهم باشند:

۱. این سلول ها تخصص نیافته هستند.
۲. مجدداً در بدن از طریق تقسیم سلولی خود را تولید و تکثیر می کنند.
۳. عمری طولانی دارند.
۴. در شرایط آزمایشگاهی، می توان آن ها را به سلول هایی تخصص یافته با اعمال و فعالیت مشخص تبدیل کرد. به طوری که در محیط کشت و در مجاورت عوامل مغذی خاصی، با دست کاری یک سلول بنیادی در حالت پایه، در سلول ژن هایی را فعال نمود که این سلول بنیادی را مجبور به ایجاد عواملی پروتئینی در داخل و سطح خود کند و در نهایت به یک سلول مشخص تبدیل شود.

سلول های بنیادی تقریباً در همه بافت های بدن یافت می شوند و به نوعی مسئول ترمیم آنها هستند. این سلول ها دارای انواع متفاوتی می باشند. بدون توجه به انواع سلول های بنیادی این خواص در همه آنها دیده می شود. سلول بنیادی مادر تمام سلول ها است و توانایی تبدیل به تمام سلول های بدن را دارا می باشد. این سلول های واجد توانایی خود نوسازی (Self Renewing) می توانند به انواع سلول ها از جمله سلول های خونی، قلبی، عصبی و غضروفی تبدیل شوند (تمایز یابند؛ Differentiation). هم چنین با تمایز در بازسازی و ترمیم بافت های مختلف بدن بدنبال آسیب و جراحی موثر هستند. این سلول ها می توانند به درون بافتهای آسیب دیده ای که بخش عمده سلول های آنها از بین رفته است، پیوند زده شوند و جایگزین سلول های آسیب دیده شده و به ترمیم و رفع نقص در آن بافت بپردازند. خود نوزایی، به معنای تکثیر و حفظ توان تکوینی برای تمایز به انواع دیگر سلول ها می باشد. سلول های بنیادی در مراحل مختلف تکوینی قرار دارند و در نتیجه درجات متفاوتی از خود نوزایی و تمایز را نشان می دهند. به دلیل توانایی منحصر به فرد سلول های بنیادی، این سلول ها امروزه از مباحث جذاب در زیست شناسی و علوم درمانی می باشند. هم چنین تحقیقات در این زمینه دانش ما را درباره چگونگی رشد و تکوین یک اندام از یک سلول منفرد افزایش داده است و مهمتر آنکه به فهم مکانیزم جایگزینی سلول های سالم با سلول های آسیب دیده کمک نموده است.



شکل ۱: تمایز سلول های بنیادی

سلول های بنیادی تهیه کننده سلول های جدید هستند. وقتی که سلول های بنیادی تقسیم می شوند، می توانند سلول های مانند خودشان تولید کنند و یا می توانند سلول های دیگری از نوع دیگر تولید کنند. برای مثال سلول های بنیادی پوست می توانند سلول های بنیادی پوست بیشتری بسازند یا می توانند سلول هایی مختلف دیگری در پوست بسازند که کار مخصوص به خودشان را دارند مثل ساختن رنگدانه های ملانین.

چرا سلول های بنیادی در سلامت ما مهم هستند؟ وقتی که ما زخمی یا بیمار میشویم ، سلول هایمان هم صدمه میبینند یا از بین می روند. زمانی که این اتفاق میافتد، سلول های بنیادی فعال می شوند. سلول های بنیادی مسئول ترمیم کردن بافت های صدمه دیده و جایگزین کردن سلول هایی که در شرایط نرمال می میرند هستند. این گونه است که سلول های بنیادی ما را سلامت نگاه می دارند و باعث جلوگیری از پیری زودرس ما می شوند. با این که تعریف جامع و مانعی برای سلول بنیادی وجود ندارد اما بهینه ترین تعریف این است:

"سلول بنیادی، سلولی است که دو ویژگی خود نوزایی و تمایز را داشته باشد"

۲.۲ طبقه بندی سلولهای بنیادی

۲.۲.۱ طبقه بندی بر اساس زمان حضور در بدن

سلول های بنیادی را میتوان از لحاظ منشأ بدست آوردن به ۳ گروه تقسیم بندی کرد:



- ۱- سلول بنیادی رویانی (embryonic stem cell): به گروهی از سلول های بنیادی که از پیکر رویان استخراج می شوند، سلول های بنیادی رویانی می گوئیم. نام رویان به توده‌ی سلولی اطلاق می شود که حاصل تقسیمات متوالی زیگوت تا هفته‌ی هشتم تکوین است. در این بازه، هر کدام از سلول ها به دودمان خاصی تعهد پیدا می کنند.
- ۲- سلول بنیادی جنینی (fetal stem cell): از هفته‌ی هشتم، اندام های جنین شروع به شکل گیری و تکامل می کنند. به سلول های بنیادی جنین که در زمان رویانی به دودمان معینی تعهد پیدا کرده، سلول های بنیادی جنینی می گوئیم.
- ۳- سلول بنیادی بزرگسال (adult stem cell): یا سلول های بنیادی بالغ، به سلول های بنیادی حاضر در پیکر فرد بعد از تولد میگوئیم. اما تعریف دقیق تر این دسته از سلول ها به این صورت است: گروهی از سلول های بنیادی که در بسیاری از بافت های تخصصی یافت می شوند. وظیفه‌ی این سلول ها جایگزینی مداوم سلول های از بین رفته با سلول های تازه و جوان است. بافت هایی مانند مغز، مغز استخوان و پوست، از جمله بافت هایی هستند که دارای سلول های بنیادی ویژه‌ی بافت و یا سلول های بنیادی بزرگسال هستند. با استناد به تعریف دوم، سلول های بنیادی بزرگسال در مواردی در دوره‌ی قبل از تولد هم دیده می شوند. برای زدودن چنین ابهام هایی، سلول های بنیادی را با توجه به یکی دیگر از ویژگی هایشان نیز تقسیم بندی می کنیم.

۲.۲.۲ طبقه بندی بر اساس توان تمایزی

- بر اساس توان تمایزی و برگشت پذیری (potentiation)، میتوان سلول های بنیادی را به انواع زیر تقسیم کرد:
- ۱- همه توان (totipotent): سلول هایی هستند که می توانند همه سلول ها، اعم از سلول های رویان و بافت های خارج رویانی را تولید کنند. - بافت های خارج رویانی بافت هایی هستند که طی تبدیل سلول تخم به رویان بر سلولی بوجود آمده ولی در ساختار بدن رویان مشارکت نمی کنند بلکه وظیفه ی آنها اغلب اتصال رویان به بدن مادر است- سلول های حاضر در توده‌ی سلولی که حاصل تقسیمات متوالی زیگوت تا روز چهارم تکوین هستند، تنها سلولهای همه توان موجود در بدن انسان هستند.
 - ۲- پر توان (pluripotent): سلول هایی هستند که میتوانند غالب یا همه سلول های فرد را بسازند، ولی قادر به ایجاد بافت های خارج رویانی نیستند. سلول های بدست آمده از توده سلولی داخلی (ICM) رویان در مرحله بلاستوسیست و سلول های که از گنادهای رویانی بدست می آیند و به آنها سلول های زاینده رویانی گفته میشوند و سلول های کارسینومای رویانی و مشتق از تراتوکارسینوما نیز جزو این دسته اند.
 - ۳- چند توان (multipotent): تعداد محدودتری از انواع سلول ها را ایجاد می کنند. این سلول ها توان تولید همه ی ۲۰۰ نوع سلول شناخته شده در بدن انسان را ندارند بلکه هر کدام قادر به تولید تعداد مشخصی از سلول ها هستند. از جمله این سلول ها می توان سلول های بنیادی مغز استخوان انسان را نام برد.

- ۴- اندک توان (oligopotent): الیگو در زبان یونانی به اعداد ۲-۹ اطلاق میشود. بنابراین الیگوپوتنت نامی غیر رسمی برای اشاره به گروهی از سلول های بنیادی است که توان تمایز به دودمانه های محدود ولی بیشتر از ۱ را دارند. این نام بیشتر برای اشاره به سلول های بنیادی دوتوان و سه توان استفاده می شود. برای مثال میتوان به سلول های لنفوئید اشاره کرد که توان تمایز به لنفوسیت B و لنفوسیت T را دارند.
- ۵- تک توان (unipotent): این سلول ها، در بین سلول های بنیادی کمترین توان تمایز و بیشترین محدودیت را دارند. به صورتی که می توانند تنها به یک نوع سلول تمایز پیدا کنند. مانند سلول های اسپرماتوگونی.



شکل ۲: طبقه بندی سلول های بنیادی

هدف از این تقسیم بندی ها، تعیین ظرفیت عملکردی سلول های بنیادی بر اساس توان تمایزی آنها می باشد. در شرایط ارمانی در آزمایشگاه بهترین سلول ها برای استفاده در کار های تحقیقاتی و درمانی، سلول های همه توان می باشند زیرا توان تمایز به همه سلول ها را دارند. اما در شرایط واقعی همه سلول ها حتی سلول های تک توان که کمترین توان تمایزی را دارند دارای کاربرد های تحقیقی و پزشکی و غربالگری دارویی مخصوص به خود هستند.

۲.۳ نگاهی دقیق تر به سلول های بنیادی

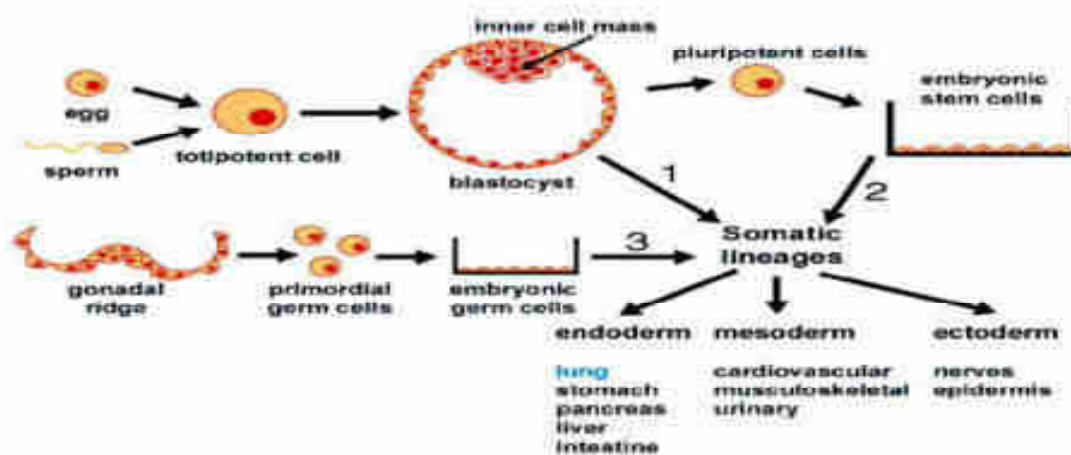
۲.۳.۱ سلولهای بنیادی رویانی

برای اولین بار در سال ۱۹۸۱، سلول های بنیادی رویانی موشی، توسط دو دانشمند به نام های مارتین و اوانس در محیط آزمایشگاه از بلاستوسیست در حال رشد جدا شدند. این سلول های بنیادی رویانی به طور اختصاصی قادر به تشکیل هر سه لایه رویانی در محیط آزمایشگاه بودند آنها همچنین قادر بودند در محیط کشت به صورت تمایز نیافته



تحت تقسیمات متقارن تکثیر شده و یک جمعیت سلولی هموزن (خالص) را ایجاد کرده و همچنان خصوصیات ژنتیکی خود را حتی در کشت طولانی مدت در محیط آزمایشگاهی حفظ کنند. سلول های بنیادی رویانی خود براساس پتانسیل تمایزی و زمان جداسازی از بلاستوسیست، به دو گروه تقسیم میشوند:

۱. سلول های بنیادی رویانی جدا شده از رویان اولیه (۲-۴ روزهای اولیه گاسترولاسیون) همه توان بوده و قادر به تشکیل هر نوع سلول یا اندام خارج رویان مثل جفت و حتی انسان کامل می باشند.
۲. سلول های بنیادی رویانی گرفته شده از رویان مسن تر، در مرحله بلاستوسیست (روز ۵-۷ گاسترولاسیون در انسان) سلول های پر توان هستند و دارای پتانسیل تمایز به بافتهای مختلف بدن هستند ولی قادر به ایجاد جفت نبوده و همچنین نمی توانند یک انسان کامل را ایجاد نمایند.



شکل ۳- تصویر شماتیک از محل سلول های بنیادی رویانی در بلاستوسیست اولیه. سلول های بنیادی رویانی از توده سلولی داخلی جدا شده‌اند و آنها قادر به تشکیل هر سه لایه رویانی می باشند.

سلول های بنیادی رویانی همراه با منشاشان تعریف می شوند. این سلول ها از مرحله بلاستوسیست رویان بدست می آیند. بلاستوسیست مرحله از تکوین پیش از لانه گزینی در پستانداران است که معمولا چهار تا پنج روز بعد از لقاح ایجاد می شود همچنین درون این کره مجتمعی از سلول ها به نام توده سلولی داخلی وجود دارد. برای اولین بار تولید سلول های بنیادی رویانی انسانی در سال ۱۹۹۸ توسط تامسون و همکارانش گزارش شد. علاوه بر این مطالعه سلول های کارسینومای رویانی موشی و انسانی به تولید و رشد سلول های بنیادی رویانی کمک نموده است. تا کنون تنها از سه گونه از پستانداران سلول های بنیادی رویانی با توان خود نوسازی و کشت های طولانی مدت بدست آمده است که عبارتند از موش، میمون و انسان. در موش بازدهی تولید سلول های بنیادی رویانی، تحت تاثیر نژاد ژنتیکی موش، شرایط کشت و عواملی است که بر موش های آبستن اثر می گذارد. تا کنون از نژادهای محدودی، سلول های بنیادی رویانی بدست آمده است. رده های سلولی پر توان مشتق از موش مدل مناسبی برای تحقیق پیرامون تمایز سلولی مهره داران است و سیستم مهمی را برای تغییرات ژنتیکی فراهم می کند. به دلیل این کاربردهای سودمند، کوشش های فراوانی برای تولید سلول های بنیادی رویانی و سلول های زاینده رویانی گونه های دیگر صورت گرفته است. علاوه بر این

تا کنون از گونه های دیگر نیز سلول های بنیادی رویانی تهیه شده است که از آن جمله می توان به موارد: گورخرماهی، جوجه، خرگوش، رت، هامستر، خوک، گاو و گوسفند اشاره کرد.

تولید رده های سلولی پر توان، از مهره دارانی غیر از موش، اثر عمیقی بر مطالعات مراحل اولیه تکوین نظیر دودمان سلولی متعهد شده و نشانه گذاری ژنتیکی و بخصوص تغییر ژنتیکی در گونه های اهلی داشته است. اما تا کنون تولید فرد کامل از سلول های بنیادی رویانی هیچ گونه ای غیر از موش گزارش نشده است. در حقیقت منشا سلول های بنیادی رویانی مشخص نیست و معلوم نیست که آیا سلول های بنیادی رویانی، سلول هایی در توده سلولی داخلی بلاستوسیست هستند و یا آنکه توده سلولی داخلی بلاستوسیست تحت شرایط آزمایشگاهی تبدیل به سلول های بنیادی رویانی می شوند. به هر حال برای اهداف تحقیقاتی، تعریف یک سلول بنیادی رویانی، بیش از "سلول بنیادی با توان تقسیم زیاد مشتق از رویان که می تواند تقریباً به تمام سلول های بدن تمایز یابد" است. بنابراین بیان نکات با اهمیت و خاص در تعریف سلول های بنیادی رویانی ضروری است. بر اساس تعریف اسمیت که مطالعات فراوانی بر سلول های بنیادی رویانی موشی داشته است، مشخصات زیر را برای تعریف سلول های بنیادی رویانی ضروری می داند:

۱. از توده سلولی داخلی و یا اپی بلاست بلاستوسیست مشتق شده باشند.
۲. دارای توان تقسیم متقارن نامحدود و بدون تمایز باشد و در عین حال توان تمایزی را حفظ نماید.
۳. دارای کاربوتایپ طبیعی کروموزومی بوده و این حالت را نیز حفظ نماید.
۴. سلول های بنیادی رویانی پرتوان بتوانند انواع سلول تمایز یافته که از سه لایه زاینده اولیه رویان است را بوجود آورند.
۵. طی تکوین دارای توان ادغام در تمام بافت های رویان باشد.
۶. دارای توان تولید دودمان زاینده که در نهایت اسپرم و تخمک را می سازند باشد.
۷. کلون زایی به این معنی که یک سلول منفرد دارای توان تولید یک کلونی متشکل از سلول هایی با خواص ژنتیکی یکسان باشد.
۸. فاکتور نسخه برداری Oct-4 را بیان کند. این فاکتور سبب تحریک یا مهار دسته ای از ژن ها می شود که سلول های بنیادی رویانی را در حالت تکثیری و غیر تمایزی نگه می دارد.
۹. بتوان آن را به تکثیر یا تمایز القا کرد.
۱۰. فاقد نقطه کنترل G_1 باشد. سلول های بنیادی رویانی، بیشتر زمانشان را در فاز S هستند.
۱۱. غیر فعال شدن کروموزوم X را نشان ندهد.

۲.۳.۲ سلول های بنیادی جنینی

سلول های بنیادی جنینی را میتوان از خون جنین، مغز استخوان جنین و همینطور اندام های دیگر مانند کبد و کلیه جنین استخراج کرد. این سلول ها نسبت به سلول های بالغ مزایایی دارند که می توان به توان تمایزی بیشتر و تحریک کمتر دستگاه ایمنی اشاره کرد. گرچه در مورد کار با این سلول ها باید به مسائل اخلاقی توجه داشت. سلول های بنیادی جنینی ابزاری قدرتمند برای کنکاش زوایای مختلف زیست شناسی سلولی و روش امیدبخشی برای درمان های جدید و آینده نگر هستند

۲.۳.۳ سلول های بنیادی بالغ


این دسته از سلول های بنیادی پس از دوره جنینی در بافت های بدن (مثل پوست، مغز، عضلات، عروق خونی، قلب، مغز، شبکیه چشم، پالپ عاج دندان، استخوان، کبد و سایر بافت ها) و هم چنین در خون بند ناف یافت می شوند. سلول های بنیادی بالغ موجود در بافت های بدن مسئول تولید و ترمیم همان بافت هستند. به نظر می رسد سلول های بنیادی بالغ می توانند بسته به فراهم سازی شرایط مناسب، به سایر سلول های بدن تمایز یابند. فرایند ایجاد سلول های تخصصی از سلول های بنیادی را تمایز می نامند. قدرت تمایزی سلول های بنیادی بالغ از انواع رویانی و جنینی کمتر است. سلول های بنیادی بالغ، سلول های سوماتیکی هستند که از بافتهای مختلف بدن جدا می شوند و بسته به محلی که این سلول ها در آن ساکن هستند، دارای خصوصیات متفاوتی می باشند. عمل مهم این سلول ها در بافتهای مختلف، تولید مجدد سلول های اختصاصی بالغ آن بافت است. بنابراین این سلول ها در همه اندام ها و بافت ها در سرتاسر زندگی یافت می شوند و سلول های موجود در آن بافت را در طول زندگی موجود زنده حفظ، نگهداری و پشتیبانی می کنند. این سلول ها به طور مشخصی چند توان بوده و سلول های حاصل از تقسیم آن سلول هایی است که تا حدودی متمایز شده و تحت عنوان سلول های بینابینی یا پیش ساز می باشند. این سلول ها به طور مکرر تقسیم شده و با افزایش تقسیمات سلولی، پتانسیل تمایزی آنها کمتر شده و بیشتر به سمت سلول های بالغ با سرنوشت مشخص شده پیش می روند.

در پزشکی امروزه تنها در چند بیماری محدود از سلول های بنیادی ویژه بافت به صورت گسترده ای استفاده می شود. این موارد شامل استفاده از سلول های بنیادی خون ساز مغز استخوان و خون بند ناف برای درمان سرطان ها، سلول های بنیادی پوست برای درمان سوختگی ها و سلول های بنیادی لیمبال برای درمان نقص سلول های لیمبال قرنیه است. در همه این بیماری ها از سلول های بنیادی خود بافت برای ترمیم همان بافت استفاده می شود. نوع دیگری از سلول های بنیادی بزرگسالان، سلولی است به نام سلول بنیادی مزانشیمی که آن را می توان از بافت های مختلفی از جمله مغز استخوان به دست آورد. این سلول ها قادرند به سلول های استخوانی، غضروفی و چربی تبدیل شوند. این سلول ها همچنین ممکن است در ترمیم سایر بافت ها نیز کمک کننده باشند. در حال حاضر مطالعات حیوانی گسترده ای در حال انجام است که تاثیر این سلول ها در درمان آرتروز و شکستگی های دیر جوش و یا جوش نخورده مورد ارزیابی قرار دهند. این سلول ها همچنین ممکن است قادر باشند که سیستم ایمنی افراد را نیز تنظیم نمایند.

حال سلول های بنیادی بالغ را به تفکیک بافتی که در آن استقرار دارند معرفی می کنیم.

۲.۳.۳.۱ سلول های بنیادی بند ناف (cord blood stem cell)

خون بندناف خونی است که پس از تولد در بند ناف و جفت باقیمانده و دور ریخته می شود. این خون غنی از سلول های بنیادی است. اولین پیوند خون بند ناف در سال ۱۹۸۸ میلادی در فرانسه و توسط دکتر گلوکمن به یک کودک مبتلا به کم خونی فانکونی (یک نوع کم خونی مادرزادی) انجام گرفت و به این ترتیب تا به امروز صد ها پیوند موفق خون بند ناف صورت گرفته است و مراکز بزرگ ذخیره این سلول ها در کشور های مختلف جهان تاسیس گردیده است.



مرور آمار منتشر شده نشان می دهد که هر ساله حدود ۳۰۰۰۰ بیمار با بیماریهایی که با پیوند سلول های بنیادی مغز استخوان، قابل درمان هستند شناسائی می شوند و حدود ۷۵ درصد این بیماران قادر به یافتن یک داوطلب مناسب برای اهداء خون مغز استخوان نیستند. از سوی دیگر جستجوی مراکز ثبت اهدا کنندگان مغز استخوان زمان بسیاری به خود اختصاص می دهد به این ترتیب ذخیره خون بندناف زمان را کوتاه و تعداد اهدا کنندگان را بیشتر می سازد و به این ترتیب زمان را برای مبتلایان به لوسمی های حاد، کم خونی ها و نقایص ایمنی که در زمان کوتاهی می میرند کوتاهتر می کند. امروزه تحقیقات گسترده ای به منظور درمان بیماریها و ضایعات عصبی، ترمیم بافتهای آسیب دیده قلبی و استخوانی، ترمیم سوختگیها و ضایعات پوستی، ترمیم لوزالمعده و ترشح انسولین و ترمیم سایر بافت های آسیب دیده با استفاده از سلول های بنیادی مغز استخوان، خون بندناف و سایر سلول های بنیادی یک فرد بالغ درحال انجام است. ترمیم لوزالمعده و ترشح انسولین و ترمیم سایر بافت های آسیب دیده با استفاده از سلول های بنیادی مغز استخوان، خون بندناف و سایر سلول های بنیادی یک فرد بالغ درحال انجام است.


سلول های بنیادی بند ناف بلافاصله بعد از تولد از خون بند ناف بدست می آیند این سلول ها نسبت به سلول های بنیادی مغز استخوان بالغین و بچه ها نابالغ تر و نسبت به سلول های بنیادی جنینی مسن تر یا بالغ تر می باشد. این سلول ها چند توان بوده با خاصیت چسبندگی بالا و به آهستگی در محیط کشت می شوند. این سلول ها حاوی آنتی ژن های مخصوص سلول های بنیادی بوده ولی آنتی ژنهای سلول های خون ساز را بیان نمی کنند و دارای سطح پایینی از بیان آنتی ژنهای سلول های استخوانی بوده و در مقایسه با سلول های بنیادی مغز استخوان فاقد بیان آنتی ژنهای عصبی می باشند. سلول های بنیادی بندناف اخیراً به عنوان یک منبع سلولی منحصر به فرد برای ترمیم لوسمی و بقیه بیماری های خونی شناخته شده و با وجود اینکه حاوی سلول های ایمنی می باشد ولی واکنش قوی در مقابل سلول های میزبان ایجاد نمی کند.

۲.۳.۳.۲ سلول های بنیادی مغز استخوان (bone marrow stem cells)

همانطور که قبلاً ذکر شد، استرومای مغز استخوان بافت پیچیده ای است که از رگ های خونی، انواع سلول های بافت همبند از جمله سلول های اندوتلیالی، سلول های ماهیچه صاف، آدیپوسیتها، سلول های استخوانی و استرومایی تشکیل شده است. در فضای خارج رگی مغز استخوان، یک شبکه فشرده از سلول ها، شامل سلول های محیطی مغز استخوان وجود دارد که سلول های بنیادی مغز استخوان در این ناحیه قرار دارند. این سلول ها شامل انواع سلول های زیر می باشد:

سلول های بنیادی خون ساز (Hematopoietic Stem Cells: HSCs)

سلول های بنیادی خون ساز، سلول های چند توان بوده که به صورت ذخیره ی سلولی برای انواع سلول های خونی در مغز استخوان وجود دارند. این سلول ها قادر به ایجاد انواع سلول های خونی بالغ از جمله اریتروسیتها، گرانولوسیتها، مونوسیتها، ماست سل ها، لنفوسیت ها و مگاکاریوسیتها می باشند. تعداد این سلول ها در مغز استخوان بسیار محدود بوده و در واقع به ازای هر ۱۰۴ سلول مغز استخوان یک سلول بنیادی خونساز وجود دارد ولی این سلول ها به اتکاء ظرفیتشان برای خود تجدیدی، یک پشتیبانی قوی را در سرتاسر زندگی موجود زنده برای سلول های خونی فراهم می



آورند. این سلول ها، علاوه بر توانایی تمایزشان به انواع سلول های خونی بالغ، قادر به ایجاد سلول های تخم مرغی کبدی نیز می باشند.

سلول های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells: MSCs)

سلول های بنیادی مزانشیمی، سلول های چند توان هستند که توانایی تمایز به انواع دودمان های بافت همبند از جمله آدیپوسیت، کندروسیت و استئوسیت را دارا می باشند. این سلول ها قادرند ظرفیت تمایزشان را همچنان در محیط خارج از بدن (محیط کشت) حفظ نمایند. وجود سلول های بنیادی مزانشیمی با ظرفیت تمایز به فیبروبلاستها برای اولین بار توسط **Friedenstein** در سال ۱۹۶۵ مطرح شد. او عنوان کرد که بافت همبند مغز استخوان شامل سلول های پیچیده ای با مورفولوژی فیبروبلاستی شکل است که به صورت کلنی رشد کرده و توانایی تمایز به سلول های استخوانی و غضروفی را داراست.

خصوصیات سلول های بنیادی مزانشیمی:

خصوصیات MSCs در بین آزمایشگاههای مختلف و گونه های حیوانی مختلف یا مدل های آزمایشگاهی، متفاوت می باشد. هنوز یک مارکر ویژه و یا ترکیبی از مارکرهای ویژه بافتی به منظور شناسایی MSCs در محیط برون تنی و درون تنی وجود ندارد. بنابراین MSCs به طور معمول به وسیله ترکیبی از ویژگی های فیزیکی، مورفولوژیکی، فنوتیپی و عملکردی تعریف می شوند که بسیاری از آنها به طور مشخص غیرفیزیولوژیکی هستند. به هر حال فرضیه ای وجود دارد که سلول های بنیادی مشتق شده از مغز استخوان در بالغین، برای حفظ و نگهداری بافتهای میزبان و همچنین تولید مجدد آنها در طی مرگ طبیعی سلولی در طول زندگی دخالت داشته و در پاسخ به زخم و یا بیماری در ترمیم بافت ها وارد عمل می شود. یکی از انواع سلول های ذکر شده، MSCs است که در مغز استخوان ساکن بوده و از تمام بافت استخوان محافظت می کند و یا سلول های بنیادی موجود در بافت های ویژه که در زمان بیماری و یا جراحی پاسخ داده و وارد عمل می شود. در این خصوص می توان سلول های همراه را در ماهیچه اسکلتی و سلول های بیضی شکل در کبد را نام برد. سلول های مزانشیمی مغز استخوان، سلول هایی هستند که در قسمتهای استرومایی مغز استخوان ساکن بوده که یک دودمان مجزا با طبیعت مزانشیمی شکل را تشکیل می دهد. در شرایط درون تنی این سلول ها برای مدت طولانی در مرحله G0 از سیکل سلولی باقی مانده و در شرایط خاص مثل شکستگی استخوان وارد فاز همانندسازی S شده و بعد از ۲۴-۶۰ ساعت از تحریک اولیه، شروع به تکثیر می کنند. به نظر برخی از محققین MSCs از طریق تولید مقطعی فاکتورهای رشد در زمان پیوند موجب ترمیم و بهبود زخم می شود، به نظر این محققین اثر غیر مستقیم این سلول ها در ترمیم جراحی بیشتر از اثر مستقیم آنها (تمایز به سلول های بالغ بافت) در ترمیم بافت آسیب دیده مورد نظر است. نشان می دهد که بعد از تزریق MSCs انسانی به صورت خالص یا همراه سلول های بنیادی خون ساز، تعداد زیادی از این سلول ها در کناره عروق ریوی ساکن شده و به مقدار زیادی، رد پیوند پایین می آید. سلول های بنیادی مزانشیمی در محیط آزمایشگاه، بلافاصله ۴ ساعت بعد از کشت اولیه ۲ روز در محیط کشت به صورت خاموش - به کف ظرف کشت چسبیده و ساکن می شوند. این سلول ها در حدود ۴ باقی مانده و سپس شروع به تقسیم کرده و با قدرت بالا تکثیر میشوند. این سلول ها خاصیت کلونی زایی داشته و کلنی هایی با اشکال منظم و یا نامنظم، با تراکم بالای سلولی تشکیل می دهند. این سلول ها در محیط کشت به فرم سلول های مزانشیمی و بیشتر دوکی شکل بوده البته اشکال ستاره ای و چند وجهی نیز به خود می گیرند.

۲.۳.۳.۳ سلول های بنیادی عصبی

سلول های بنیادی عصبی یک جمعیت خودنوزا می باشند که توانایی تمایز به نوروں و گلیا را در سیستم عصبی بزرگسال و در حال تکامل دارا می باشند این سلول ها را می توان تکثیر نمود و بر روی آنها دستکاری ژنتیکی انجام داد و می توان آنها را به سوی سلول های در حال تکوین، بالغ و یا سلول های با اثرات درمانی دوباره برنامه ریزی کرد. علاوه بر این توانایی بالایی برای مهاجرت داشته و به نظر می رسد به نواحی از مغز که دچار آسیب شده اند مهاجرت می کنند.

خصوصیات سلول های بنیادی عصبی:

- ۱- یک سلول بنیادی عصبی، سلول چند توانی است که قادر به تکثیر و تولید پیش سازهایی است که قابلیت تبدیل به سه نوع اصلی سلول های سیستم اعصاب مرکزی را دارد: یعنی آستروسیتها، الیگودندروسیتها، و نوروںها.
- ۲- این سلول ها باید توانایی خودنوزایی را داشته باشند و همچنین به صورت متقارن و نامتقارن تقسیم گردند.
- ۳- یک سلول بنیادی عصبی باید بتواند خصوصیت چند توانی خود را تا زمانی طولانی حفظ کند. این نکته بسیار حائز اهمیت است، چون سلول های پیش ساز پرتوان خودنوزایی شان را در حد محدود و تا زمان کوتاهی حفظ می کنند.

سلول پیش ساز عصبی:

یک سلول پیش ساز، سلولی است که توانایی محدودی برای خودنوزایی و تولید سلول های تمایز یافته دارد ها در محیط آزمایشگاهی قادر به ایجاد یک سری ساختارهای کلونی شکل هستند که نوروسفر نامیده می شوند و تنوعاتی از لحاظ رده های سلولی دخیل در تشکیل این ساختارها در آنها دیده می شود

کاربردهای سلول های بنیادی عصبی:

در مطالعات اخیر نشان داده شده که پیوند سلول های پیش ساز عصبی مشتق از مغز انسان بزرگسال به مدل حیوانی مبتلا به ضایعه نخاعی، سبب تجدید میلین سازی در این سلول ها می شود که مشابه روند تولید میلین در سلول های شوان است. اکسون های مجدد میلینه شده، پالس های عصبی را بسیار شبیه به حالت نرمال منتقل میکنند. این امر پیشنهاد می کند که انتقال این سلول ها به محل فاقد میلین آسیب دیده نخاعی می تواند در درمان ضایعات ایجاد شده مفید باشد.

۲.۳.۳.۴ سلول های بنیادی اندومتریال

اندومتریوم بافتی است که تغییر وضعیت دینامیکی داشته و حدود ۴۰۰ سیکل نوزایش و تمایز و خونریزی را در طی سالهای زایا بودن یک زن متحمل می شود. فعالیتهای مداوم و منظم استروژن و پروژسترون این تغییر وضعیت را اداره می کند تا اندومتریوم پذیرای بلاستوسیست کاشته شده در یک دوره حاملگی گردد. اندومتریوم رحم انسان شامل بافت اندومتریال که یک بافت با قدرت بازسازی بالا است بوده و در مجاور میومتریوم ماهیچه ای قرار گرفته است. اتصال



اندومتريوم با ميومتريوم بصورت نامنظم است و هيچ بافت زير مخاطي براي جدا كردن بافت غده اي اندومتريال از بافت ماهيچه اي صاف ميومتريال زير آن وجود ندارد. اندومتريوم و ميومتريوم (زير اندومتريوم) هر دو از مجاري مولر در طول زندگي جنيني منشا مي گيرند. درصورتى كه ميومتريوم خارجى منشا غير مولرينى دارد. ريزش لايه فاكشنال اندومتريوم در زمان قاعدگي و بازسازى دوباره آن از لايه قاعده اي يا بازال نشان مي دهد كه سلول هاي بنيادي بالغ همگي در اين لايه بازال قرار دارند و از آنجا كه اندومتريوم حاوي غده، اپيتليوم سطحى و استروما مي باشد، چنين گفته مي شود كه هر دو سلول هاي بنيادي و پيش ساز استرومال و اپيتليال مسئول بازسازى اندومتريوم مي باشند .

سلول هاي بنيادي/اجدادى بزرگسال مسئول نوزايى اندومتريوم مي باشند. اين امر كه سلول هاي بنيادي اندومتريال مسئول بازسازى لايه اندومتر رحم در هر سيكل قاعدگي است از سال ها پيش گزارش شده است اما تلاش براي جداسازى و شناسايى خصوصيات سلول هاي بنيادى اندومتريال فقط در طى چند سال اخير، بعد از شناسايى سلول هاي بنيادى و پروژنياتور ساير بافت ها، طى آزمايشاتى پيگيري شده است.

سلول هاي بنيادى بالغ بوسيله خصوصيات عملکردى و بيان ماركرهاى خود شناسايى مي شوند. شواهدى براي وجود سلول هاي بنيادى بالغ و سلول هاي پروژنياتور در اندومتر رحم انسان و موش با بررسى سلول هاي بنيادى عملکردى در بافت ها و سلول هاي رحمى فراهم آمده است. اين مطالعات عملکردى بر سلول هاي بنيادى و پروژنياتورهاي همراه با تكثير اندومتريال، زمينه را براي شناخت فيزيولوژى و پاتولوژى انواع بي نظمي هاي غير طبيعى اندومتر رحم شامل سرطان اندومتر، هايپرپلازى اندومتري، اندومتريوزيس و آدنوميوزيس و . . فراهم ساخته است. اين سلول ها ، قابليت تمايز به آديپوسيت، ميو بلاست، كندروسيت و استئوبلاست را در محيطهاي تمايز مناسب، از خود نشان داده اند. اين مطالعه نشان داد كه جمعيت سلول هاي بنيادى اندومتريال حاوي سلول هاي بنيادى مزانشيمي مشابه با مغز استخوان مي باشد. اين سلول ها براحتى قابل تكثير بوده و از آنجايى كه با يك بيوپسى ساده از اندومتر بدست مي آيند و نيز مشكلات اخلاقى ندارند، ميتوانند بصورت اتولوگ در درمانهاي مختلف مورد استفاده قرار گيرند. علاوه بر اين، سلول هاي بنيادى اندومتريال توانايى تمايز به سلول هاي بافتهاي ديگر مانند استخوان ، چربي و غضروف را از خود نشان داده اند. بنا بر اين، اندومتريوم انساني منبعى جديد براي سلول هاي بنيادى در سلول درمانى بشمار مي آيد. اين مفهوم كه سلول هاي بنيادى / اجدادى قاعده اي مسئول بازسازى قابل توجه اندومتر هستند، سال ها قبل پيشنهاده شد. شواهد غير مستقيم براي وجود سلول هاي بنيادى / اجدادى بزرگسال در اندومتر مشخص شده است. تلاش براي جدا كردن و مشخص كردن ويژگي هاي سلول هاي بنيادى/ اجدادى به تازگي تحت عنوان آزمون شناسايى سلول هاي بنيادى بالغين در ساير بافت ها توسعه يافته اند. شواهد منتشر شده براي وجود سلول هاي بنيادى/ اجدادى بزرگسالان در اندومتر انسان منجر به شناساي سلول-- هاي اپيتليال و سلول هاي استروما كلونونژنيك به صورت نادر شد. كلونونژنيسيته به معنای توانايى يك سلول واحد براي شروع يك كلونى از سلول ها است (CFU) در زماني كه در شرايط بسيار محدود كشت قرار بگيرند. در واقع يك ويژگي كلاسيك سلول هاي بنيادى و پيش ساز در حالت برون تنى محسوب مي شود كه براي بسيارى از سلول هاي بنيادى بالغ تايد شده است. سلول هاي استرومائي اندومتريال انساني بطور قابل توجهي كلونونژنيك تر از سلول هاي اپيتليال مي باشند. هر چند كه هر دو نوع سلولى از نظر اندازه و شكل كلونى هاي كوچك و بزرگي را تشكيل مي دهند. بر همين اساس گفته شد كه دو نوع سلول بنيادى بالغ در اندومتر وجود دارد: سلول هاي نادر اپيتليال و سلول هاي استروما كه تشكيل كلونى (CFU) مي دهند.

مزایای سلول های بنیادی اندومتريال:

پیدا نمودن منبع مناسبی از سلول های بنیادی که امکان استفاده از آن در کلینیک وجود داشته باشد، چالش بزرگی بشمار می آید. سلول های بنیادی بالغ مشتق از مغز استخوان، پالپ دندان، سلول های بنیادی جنینی و... هرچند که پتانسیل رژنراتیو بالایی دارند، اما دارای مشکلاتی نیز هستند که عدم دسترسی آسان در کلینیک، تهاجمی بودن جداسازی این سلول ها که در مغز استخوان همراه با بیهوشی و بسیار دردناک بوده و نیز محدودیت های اخلاقی از جمله این مشکلات می باشد. آنچه که در حال حاضر ضروری بنظر میرسد، لزوم دستیابی به منبعی از سلول های بنیادی است که بر این نقایص فائق گردیده و نیز خطر تغییرات کاریوتیپیک در طول کشت را نداشته و با توجه به اهمیت خون رسانی در بافت ها، امکان رگزایی را داشته باشد. سلول های بنیادی اندومتريال نشان داده اند که توانایی رگزایی دارند. همچنین، تحقیق بر روی توانایی تمایز این سلول ها نشان داده است که این سلول ها، قادر به تمایز به سلول های هر سه لایه اندودرم (مثل هپاتوسیت ها) مزودرم (مثل آدیپوسیت ها) و اکتودرم (مثل نورون ها) هستند و بنابراین انتخاب مناسبی برای سلول درمانی بشمار می آیند. همچنین تحقیقات نشان داده است که این سلول ها پس از 34 پاساژ متوالی هنوز هم کاریوتیپ نرمالی دارند، سرعت تکثیر این سلول ها از سلول های بنیادی مغز استخوان بالاتر می باشد و بزرگترین مزیت این سلول ها نسبت به سلول های بنیادی دیگر دستیابی آسان به این سلول ها می باشد.

۲.۳.۳.۵ سلول های پرتوان القایی (Induced Pluripotent Stem cell: IPS)

چنان چه در تعریف سلول های بنیادی آمده است سلول های بنیادی دارای ۲ ویژگی تکثیر و تمایز هستند و با توجه به توانایی آن ها در تمایز به انواع مختلفی از سلول ها طبقه بندی می شوند: سلول های همه توان، پرتوان، چند توان و تک توان. سلول های همه توان، سلول های بنیادی هستند که قادرند علاوه بر تولید همه سلول های بدن، سلول های خارج جنینی مانند جفت را نیز تولید نمایند. سلول های پرتوان عبارتند از سلول هایی که قادرند همه انواع سلول های یک فرد بالغ را تولید نمایند ولی قادر به تولید سلول های خارج جنینی نیستند. سلول های چند توان هم، مانند سلول های بنیادی بزرگسالان قادر هستند به اعضای یک رده خاصی از سلول ها، همانند سلول های خونی (شامل منوسیت ها، لنفوسیت ها و گلبول های قرمز) تمایز پیدا کنند. بالاخره سلول های تک توان تنها قادر هستند به یک نوع خاص از سلول ها تمایز یابند. در سال ۲۰۰۶ میلادی گروهی از دانشمندان ژاپنی و سپس گروه دیگری از دانشمندان آمریکایی توانستند با وارد کردن ۴ ژن سلول های تک توان مانند فیروبلاست را به سلول های پرتوان تبدیل نمایند. این روش که از آن به عنوان باز برنامه نویسی (برنامه نویسی مجدد) یاد می شود این امکان را به محققان می دهد که از سلول های خود فرد، سلول های پرتوان القایی ایجاد کنند که همانند سلول های بنیادی جنینی قادرند به همه انواع سلول های بدن تمایز یابند. این روش به خصوص برای ایجاد مدل آزمایشگاهی بیماری ها کاربرد وسیعی دارد ولی هنوز برای استفاده درمانی باید آزمون های زیادی روی این سلول ها انجام شود تا سلامت و کار آمد بودن آن ها مورد تایید قرار گیرد.

۲.۴ استفاده از سلول های بنیادی

۲.۴.۱ ضرورت تحقیق و پژوهش در خصوص سلول های بنیادی

سلول های بنیادی قادرند به طور نامحدود هر نوع سلول را به وجود آورند که این خصوصیت باعث استفاده حیرت آور این سلول ها در علم پیوند شده است. علاوه بر این می توان به گونه ای این سلول ها را از نظر ژنتیکی تغییر داد تا پس از پیوند دفع نشوند.

کارهایی که در این رابطه تا به حال انجام شده اند عبارتند از:

۱- سلول های ماهیچه قلب توان تکثیر طی دوره بزرگسالی را ندارند و هرگاه با جراحی یا ایسکمی، به بافت مزبور آسیب برسد بافت غیرفعال جایگزین سلول های ماهیچه ای قلب فعال می شوند. سلول های بنیادی رویانی توان تبدیل به سلول های ماهیچه ای قلب را دارند که از آنها می توان در درمان موارد سکته های قلبی که عامل اصلی آسیب به ماهیچه قلب هستند و همچنین در موارد اختلالات مادرزادی قلبی استفاده کرد.

۲- سلول های بنیادی خون ساز در علم پیوند مغز استخوان برای درمان بعضی بیماری های خونی مانند تالاسمی و همچنین سرطان های افراد بزرگسال و خردسال به کار می روند که در ایران از سال ۱۳۷۱ در مرکز هماتولوژی و انکولوژی و پیوند مغز استخوان واقع در بیمارستان شریعتی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تهران و دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام می شود.

۳- سلول های مولد انسولین از سلول های بنیادی جنینی موش و انسان به دست آمده اند که می توانند راهگشایی در درمان بیماری دیابت باشند.

۴- سلول های عصبی از سلول های بنیادی رویانی به دست آمده اند که از آنها می توان در درمان بیماری های تخریب شونده سیستم عصبی مانند پارکینسون و یا آلزایمر استفاده کرد.

۵- سلول های پوستی از سلول های بنیادی رویانی به دست آمده اند که از این سلول ها می توان در درمان سوختگی ها و بهبود زخم ها استفاده کرد.

۶- تبدیل سلول بنیادی به سلول های سازنده غضروف و استخوان

۷- تبدیل سلول بنیادی به سلول کبدی

۸- تولید لوله گوارش از سلول های بنیادی

تمایز سلول های بنیادی رویانی به انواع سلول های عملکردی در محیط آزمایشگاهی ما را در درک مکانیسم های تکوین جنین، تمایز و ترمیم بافتی یاری می کند که باعث درمان هر چه بهتر ناهنجاری های نابووری و کاهش ناهنجاری های مادرزادی و تولید انواع محصولات فاکتورهای رشد می شود.



۲.۴.۲ سلول درمانی و ژن درمانی با استفاده از سلول بنیادی مزانشیمی

در این ارتباط سه استراتژی مهم وجود دارد. استراتژی اول تزریق سلول های مزانشیمی مستقیماً به محل آسیب دیده است. از این روش برای ضایعات استخوان و غضروف استفاده شده است. استراتژی دوم وارد کردن ژن پروتئین خاص در سلول مزانشیمی و تزریق آن به سیستم گردش خون است. این سلول ها در مغز استخوان مستقر شده و پروتئین مورد نظر را ترشح می کنند. محققین با وارد کردن ژن بداخل سلول مزانشیمی و تزریق آن به موش به مدت ۸ هفته ترشح فاکتور IX را مشاهده کردند. بالاخره استراتژی سوم تزریق سلول مزانشیمی بداخل گردش خون است. به طوریکه سلول های فوق در بافت هایی نظیر استخوان و غضروف و مغز و ریه مستقر شوند. امید می رود در آینده بتوان با این روش بیماری استخوان سازی ناقص را که نوعی بیماری ژنتیکی استخوان محسوب می شود درمان کرد.

۲.۴.۳ اخلاق

با افزایش مطالعه و استفاده از سلول های بنیادی بحث های اخلاقی زیادی راجع به استفاده از این سلول ها علی الخصوص سلول های بنیادی رویانی و جنینی به وجود آمده است. برای مثال جوامعی که شخصیت و انسان بودن جنین از همان ابتدای به وجود آمدن را باور دارند اینکار را کشتن یک انسان و خدشه دار کردن حرمت انسانی و استفاده ابزاری می دانند. به خصوص آنکه اینکار می تواند برای تولید و کلون کردن انسان ها بکار رود. اما امروزه راهکار هایی برای این مسایل پیش گرفته شده است نظیر استفاده از زواید جنینی یا سلول های پرتوان القایی.



فصل سوم

تجهيزات موجود در آزمایشگاه





۳.۱ تجهیزات موجود در آزمایشگاه

- ۱- هود لامینار
- ۲- انکوباتور
- ۳- میکروسکوپ Invert
- ۴- میکروسکوپ معمولی
- ۵- میکروسکوپ فلورسنت
- ۶- سانتریفیوژ
- ۷- یخچال و فریزر
- ۸- فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد
- ۹- تانک ازت
- ۱۰- اتوکلاو
- ۱۱- شیکر انکوباتور
- ۱۲- بن ماری
- ۱۳- روتاتور
- ۱۴- سمپلر ثابت و متغیر و شارژر سمپلرها
- ۱۵- فلاسک های کشت کپیپت ها کپلیت ها کسر سمپلر کوله های فالكون کویال های فریز
- ۱۶- لام نئوبار و لامل

۳.۲ هود لامینار:

هود دستگاهی است که با اشکال مختلف که با توجه به نیازهای مختلف به تهویه به کار برده می شود. کار اساسی هود تامین گستره‌ای از مکش هوا به منظور دریافت موثر آلاینده و انتقال آن به درون هود می باشد. هودها بطور کلی به دو دسته خانگی و صنعتی تقسیم می شوند. از انواع هودهای صنعتی هودهای محصور کننده می باشد.



شکل ۱- هود لامینار

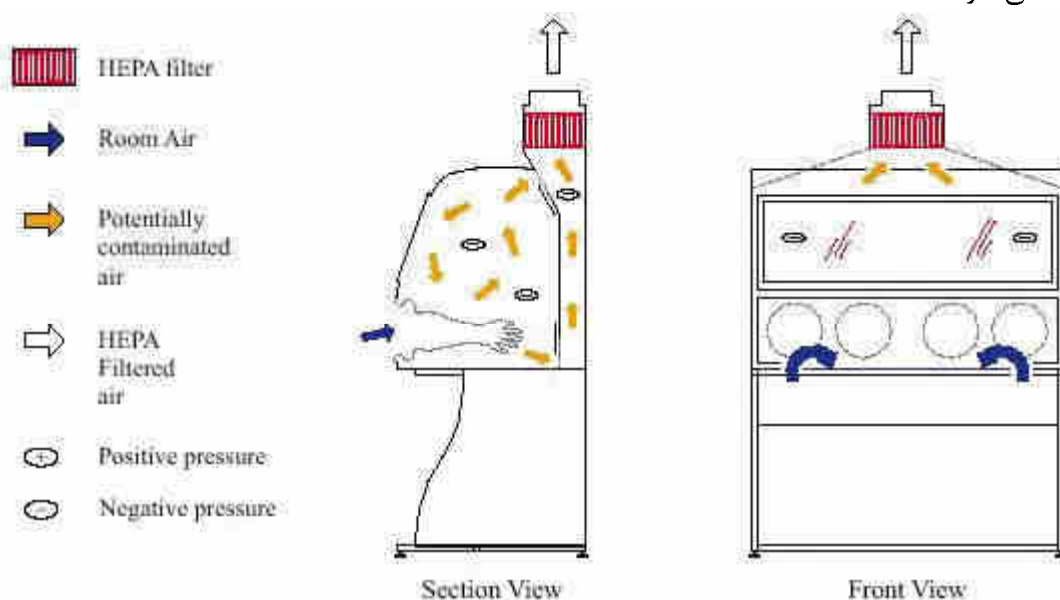


هودهای آزمایشگاهی نمونه‌های از هودهای محصور کننده هستند. معمول ترین نوع آن که جهت کشت سلول استفاده می شود هود لامینار است. هود لامینار نوعی دستگاه تهویه است که بنام هودهای جریان لایه ای نیز شناخته می شوند. جریان لامینار یعنی جریانی که در آن هوا بصورت ملایم، خطی، آرام و در یک جهت حرکت می کند و مسیرش قابل پیش بینی است. هود لامینار در آزمایشگاه های کشت سلولی و مواد بیماریزای انسانی (از قبیل باکتریها ، ویروسها ، میکروبهها و انگل ها) و برای کشت بافت و تومور و همچنین در مواقع استفاده از مواد بسیار سمی مورد استفاده قرار می گیرد.

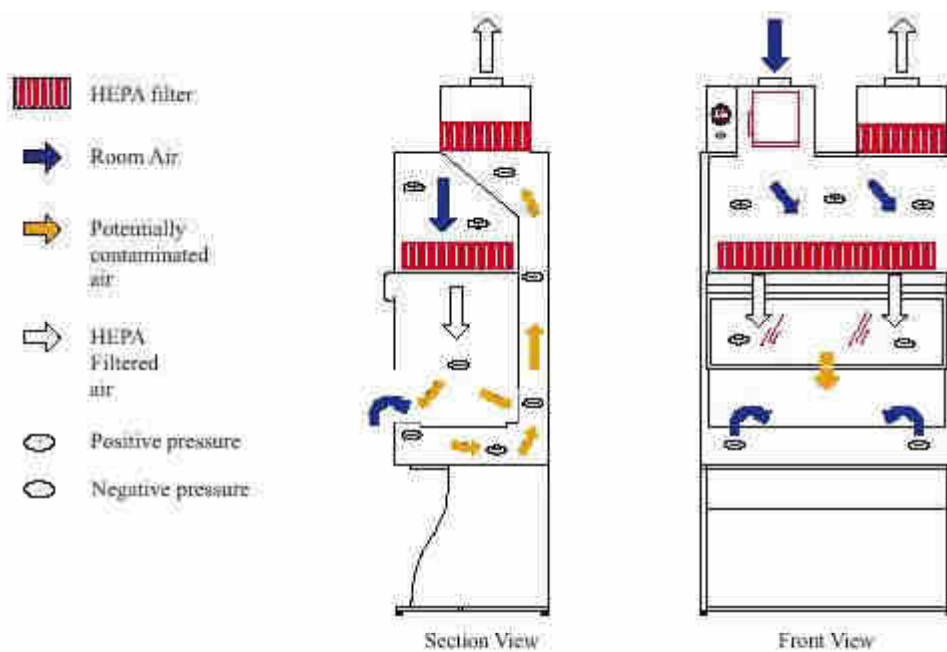
در هود های لامینار هوا از فیلتر های خاصی که حذف کننده ی ذرات و آلودگی ها می باشند عبور کرده و هوای در گردش را پاک و تمیز می سازد. هودهای جریان لامینار شامل یک پد فیلتری، یک فن و یک فیلتر مخصوص می باشند. فن موجود در دستگاه هوا را از پد فیلتر یعنی جایی که ذرات گرد و غبار بر جای می ماند مکش می کند. پس از آن هوایی که از سد فیلتر مقدماتی گذشته باید از فیلتر که ذراتی با ابعاد کوچکتر مانند قارچ ها و باکتری ها و ذرات گرد و غبار را فیلتر می کند عبور کند. حال هوای استریل شده دوباره به داخل فضای عملکرد یا همان بالن عملکرد وارد شده و انجام ادامه کار ها در فلاسک بدون خطر ضد عفونی ممکن می شود.

در دسته بندی دیگری هود ها را به سه دسته تقسیم می کنند :

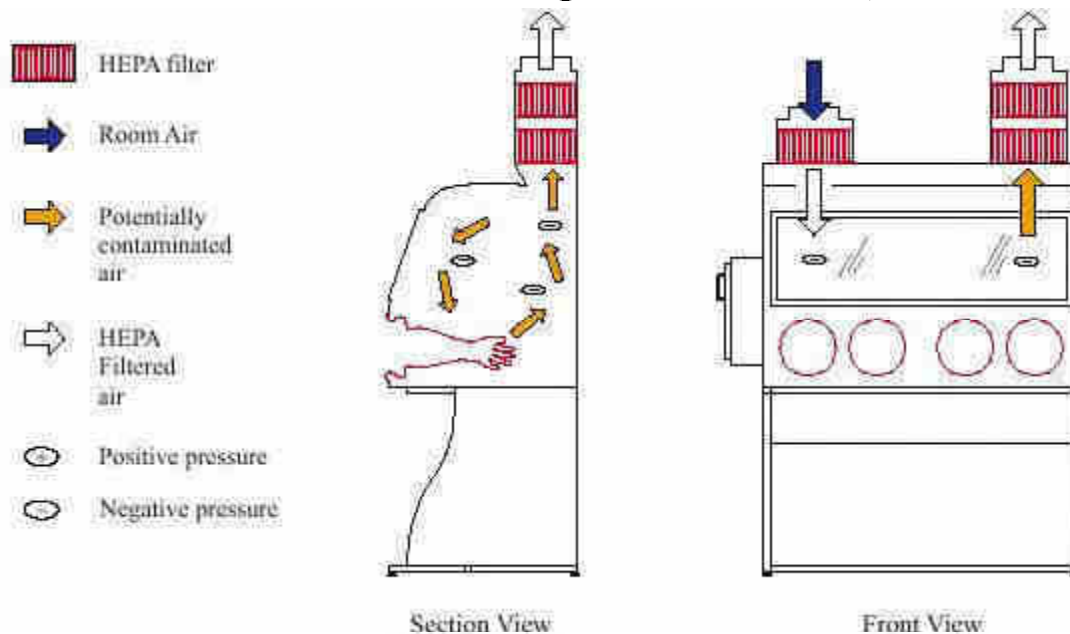
۱- هود های کلاس ۱ : هود های کلاس یک بیشتر برای محافظت از خود ما کاربرد دارند و معمولاً در مواقعی که پاکیزگی محیط کشت اهمیت کمتری دارد استفاده می شود. در این هود ها جریان هوا از سمت فرد به داخل کشیده می شود.



۲- هود های کلاس ۲ : هود های کلاس دو بیشتر برای محافظت از محیط کشت ما کاربرد دارند و معمولاً در مواقعی مورد استفاده قرار می گیرد که مواد مورد استفاده ما کم خطر است. در این هود جریان هوا از فیلتر گذشته و به محیط کشت رسیده و سپس به سمت فرد بر می گردد.



۳- هود های کلاس ۳ : این هود در مواردی کاربرد دارد که محافظت از محیط کشت و فرد، هر دو حائز اهمیت باشد. در این نوع هود هم در هوای ورودی و هم در هوای خروجی فیلترهایی برای تصفیه قرار داده شده است و برای وارد کردن اجسام به آن باید از جعبه مخصوصی که در کنار آن تعبیه شده استفاده کرد.



۳.۳ وسایل انکوباسیون

علاوه بر فیلترهای هوا و هود لامینار و میزهای کاری که تمیز کردنشان به راحتی صورت می‌گیرد، آزمایشگاه کشت سلول به یک انکوباتور برای نگهداری سلول‌ها در دمای ۳۰ تا ۴۰ درجه سانتیگراد هم نیاز خواهد داشت. دمای انکوباسیون به نوع سلول‌های کشت شده بستگی دارد. سلول‌های حشرات در دمای حدود ۳۰ درجه بهترین رشد خود را دارند، در حالی که سلول‌های پستانداران به دمای حدود ۳۷ درجه سانتیگراد نیاز دارند. استفاده از انکوباتورهایی که برای فراهم کردن CO₂ از یک منبع اصلی یا سیلندر گاز استفاده می‌کنند ضروری به نظر می‌رسد، چرا که هوای درون انکوباتور باید همیشه بین ۲ الی ۵٪ CO₂ داشته باشد. به طور کلی، لاین‌های سلولی بسیاری قادرند در اتمسفری حاوی ۹۵٪ هوا و ۵٪ CO₂ و با رطوبت نسبی ۹۹٪ قابلیت زنده ماندن خود را حفظ نمایند. غلظت CO₂ باید در تعادل با کربنات سدیم محیط کشت باشد. محیط کشت‌های مختلف ظرفیت بافری متفاوتی دارند. در صورتی که یک انکوباتور مجهز به CO₂ در دسترس نباشد به طور موقت می‌توان کشت‌ها را در یک فلاسک غیر قابل نفوذ حفظ نمود به این شکل که می‌بایست پس از گازدهی با CO₂ فلاسک‌ها را به کمک نوار پارافیلیم ببندید. همچنین ممکن است محیط کشت‌های مختلفی مورد استفاده قرار گیرند که نیازی به اتمسفر حاوی CO₂ نداشته باشند که در این حالت به انکوباتور مجهز به CO₂ نیازی نیست، برای مثال هیپاتوسیت‌ها در کشتهای اولیه خود در محیط کشت Lebovitz L-15 نگهداری می‌شوند که نیازی به CO₂ ندارد اما در این صورت نباید فلاسک‌های کشت مهر و موم و نفوذناپذیر شوند، چون که هیپاتوسیت‌ها به مقادیر بالای O₂ نیاز دارند و با گذشت زمان مقدار اکسیژن در محیط بدون گاز غیر قابل نفوذ کاهش می‌یابد. بیشتر لاین‌های سلولی در دمای ۳۶/۵ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شوند اگر چه برخی کشت‌ها، از جمله کشت‌های پوستی ممکن است به دمای پایین تری نیاز داشته باشند. سلول‌های کشت شده عموماً در دماهای پایین تر زنده می‌مانند، اما به ندرت دمای زنده ماندن آن‌ها بیش از ۲ درجه بالاتر از دمای نرمال است و بنابراین انکوباتور باید طوری تنظیم گردد که در دمای تقریباً ۳۸/۵ درجه سانتیگراد افزایش درجه حرارت را جهت جلوگیری از مرگ سلول‌ها قطع کند. انکوباتور‌ها طوری طراحی شده‌اند که یک درجه حرارت یکنواخت را تنظیم کنند، به عبارت دیگر درجه حرارت باید نهایتاً ± 0.5 درجه سانتیگراد در هر دمایی که تنظیم شده است تغییر کند. بنابراین انکوباتورهای مجهز به سیستم گردش هوا می‌تواند به یکنواختی هوا در انکوباتور کمک نموده و آن را حفظ کند.



شکل ۲- دستگاه انکوباتور



۳.۴ میکروسکوپ

واژه ای میکروسکوپ از دو واژه micro به معنای کوچک و skopin به معنای دیدن ترکیب شده است و ابزاری است که بوسیله آن اجسام بسیار ریز را می بینیم.

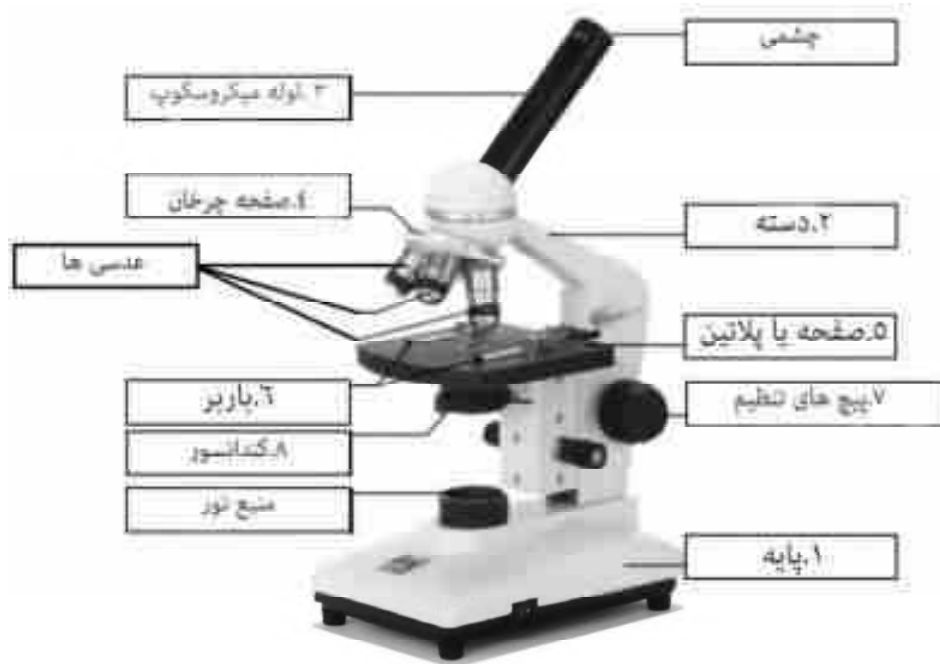
میکروسکوپی که در مراکز آموزشی مورد استفاده قرار می گیرد از نوع نوری است که خود دو نوع می باشد:

۱- میکروسکوپ مرکب (معمولی Microscope) با بزرگنمایی حدود ۴۰ تا ۲۰۰۰

۲- میکروسکوپ تشریح (برجسته بین Stereoscope)

میکروسکوپ نوری معمولی:

معمولا اجسام و موجوداتی با میکروسکوپ نوری قابل مشاهده اند که ضخامت و تراکم نداشته باشند تا نور به راحتی از آنها عبور کند. زیرا اساس تشکیل تصویر در میکروسکوپ نوری عبور نور و یا انتقال نور از جسم مورد مطالعه است و به علت تفاوت در میزان جذب نور از بخش های مختلف جسم شکل و ساختمان آن را می توان در زیر میکروسکوپ تشخیص داد.



شکل ۳- میکروسکوپ نوری

۳.۵ اجزای اصلی میکروسکوپ نوری

الف: بخش مکانیکی: بخش هایی از میکروسکوپ که بطور مستقیم در تشکیل تصویر دخالت نمی کند.



۱. پایه میکروسکوپ

پایه شامل یک بخش پایین به صورت های مختلف و گاهی بصورت نعل اسبی می باشد که برای ثابت نگه داشتن میکروسکوپ بکار می رود و معمولاً از جنس فولاد است تا از لرزش آن جلوگیری کند. پایه دارای ستونی می باشد که اجزاء مختلف به آن متصل می شود، اجزائی که بر روی پایه سوارند عبارتند از: چشمه نور و حرکت دهنده لوله میکروسکوپ

۲. دسته میکروسکوپ

قسمتی است که از طرف پایین به پایه اتصال دارد و از طرف بالا لوله میکروسکوپ بر آن استوار است برای حمل میکروسکوپ معمولاً بازوی آن را در دست می گیرند و دست دیگر در زیر پایه قرار می دهند. در بعضی میکروسکوپ ها بین قسمت پایه و دسته مفصل یا پیچ زانو قرار دارد که می توان لوله میکروسکوپ را روی پایه به حالت مایل در آورد، امروزه لوله میکروسکوپ را بطور متمایل بر روی دسته قرار می دهند تا مشکل بالا حل شود.

۳. لوله میکروسکوپ

لوله میکروسکوپ فلزی و به شکل استوانه به طول تقریبی ۱۶cm تا ۲۵cm می باشد. این لوله که در حقیقت قسمت اصلی میکروسکوپ است، شکل های مختلف دارد. در قسمت فوقانی لوله عدسی چشمی و در قسمت پایین آن صفحه چرخان قرار گرفته است. با بزرگ شدن لوله درشت نمایی آن نیز بالا می رود.

۴. صفحه گردان، دماغه چرخان، قطعه خرطومی، رولور (Revolver)

صفحه بر آمده یا نیمکره مانندی است که در انتهای تحتانی لوله میکروسکوپ قرار دارد، و حول یک نقطه به آسانی حرکت می کند. در روی آن سوراخ هایی تعبیه شده است که لوله های عدسی شیئی به آن پیچ می شود و هرگاه بخواهیم یکی از این عدسی های شیئی در امتداد محور لوله میکروسکوپ قرار گیرد، صفحه گردان را می چرخانیم تا عدسی شیئی مورد نظر با صدای تیک جا بیفتد.

۵. صفحه یا پلاتین میکروسکوپ (stage)

صفحه ای است معمولاً مربع شکل و بطور افقی به دسته میکروسکوپ متصل است، در وسط آن سوراخی جهت عبور نور وجود دارد. صفحه میکروسکوپ با دو پیچ میزان بزرگ (بسرعت) و کوچک (به آهستگی) در جهت بالا و پایین حرکت می کند.

۶. باربر (chariot)

در روی صفحه ی پلاتین دو گیره برای نگهداری و تثبیت لام وجود دارد. در این صورت لام را بوسیله دسته جابجا می کنند. در روی صفحه ی پلاتین بعضی میکروسکوپ ها گیره ای وجود دارد که اسلاید ها را نگه می دارد و این گیره متصل به سیستمی است که می تواند در جهات جلو، عقب، چپ و راست حرکت کند این سیستم باربر یا شاریو نام دارد. در بعضی از میکروسکوپ ها این باربر مجهز به درجه بندی ورنیه ای است که بازیابی سریع نمونه را امکان پذیر می سازد.



۷. پیچ های تنظیم

در دور و نزدیک کردن اسلاید به عدسی های شیئی نقش دارند و این عمل با حرکت صفحه ی پلاتین به بالا و پائین انجام می گیرد پیچ های تنظیم دو نوع هستند:

۱. پیچ تنظیم میکرو یا کوچک یا دقیق : صفحه پلاتین را به آرامی وبصورت غیر محسوس جابجا می کند.

۲. پیچ تنظیم ماکرو یا بزرگ یا سریع: صفحه پلاتین را به سرعت وبصورت محسوس جابجا می کند.

۸. کندانسور

در زیر صفحه پلاتین که محل قرارگیری نمونه است، قرار دارد و از چند عدسی محدب تشکیل شده است و مجموعه این عدسی ها کار یک عدسی محدب الطرفین را انجام می دهند و پرتو های نور را بر روی نمونه متمرکز می کنند.

۹. عدسی

۱. عدسی شیئی یا ابژکتیو

در میکروسکوپ های معمولی چهار عدسی شیئی بر روی صفحه چرخان نصب می شود(عدسی های شماره ۴-۱۰-۴۰-۱۰۰) و اعدادی روی آنها نوشته شده است که هر یک بیانگر خصوصیتی از ابژکتیو است. اعداد نوشته شده بر روی عدسی شیئی شماره ۱۰ عبارتند از:

۱- عدد ۱۰ = بزرگ نمائی عدسی شیئی

۲- عدد ۰/۲۵ = عدد گشادگی (N. A) Number of aperture

۳- عدد ۱۶۰ = طول لوله میکروسکوپ (برحسب میلی متر)

۴- عدد ۰/۱۷ = ضخامت لامل مناسب برای آن عدسی شیئی (برحسب میلی متر)



شکل ۴- بزرگنمایی عدسی

- عدسی های شیئی در مجموع از جسم تصویری بزرگ تر، معکوس و حقیقی ایجاد می کنند.

- در استفاده از عدسی شماره ۱۰۰ بایستی از روغن گزبلول استفاده نمود.

- استفاده از روش ایمرسیون روغنی می تواند موجب افزایش N. A و افزایش روزلوشن شود.

۲. عدسی چشمی یا اکولر:

مجموعه ای از عدسی هاست که تصویری بزرگ تر، مستقیم و مجازی از جسم بوجود می آورد تصویر ابژکتیو به منزله جسم برای اکولر است به این ترتیب تصویر نهایی که به چشم ما می رسد تصویری مجازی، معکوس و بزرگتر است. میکروسکوپ های مختلف میتوانند تک چشمی (monocular) و یا دو چشمی (binocular) باشند، وقتی به مدت طولانی می خواهیم از میکروسکوپ استفاده کنیم دوچشمی بهتر است، چون مانع خستگی چشم می باشد.

بنابراین وظایفی که عدسی چشمی بر عهده دارند عبارتند از:

بزرگسازی تصویر معکوس حاصله از عدسی شیئی ، تشکیل تصویر مجازی از تصویر حاصله بوسیله عدسی شیئی، اندازه گیری و سنجش اجزا واقع در تصویر.

عدسی چشمی ها دارای انواع مختلفی می باشند که دو نوع معروف و معمول آنها عبارتند از:

- عدسی چشمی هویگنس (Huygenian)
- عدسی چشمی رامزدن (Ramsden)

عدسی چشمی هویگنس متشکل از دو عدسی سطح محدب می باشد که یک طرف هر کدام مسطح و یکطرف محدب می باشد. در نوع هویگنس سطح محدب هر دو عدسی بطرف پایین می باشد و بین این دو عدسی دیافراگم قرار گرفته است، دیافراگم در محل کانون عدسی بالای عدسی چشمی واقع است. عدسی پایین پرتوهای رسیده از عدسی شیئی را جمع آوری نموده و در محل دیافراگم یا در نزدیکی آن متمرکز می نماید. عدسی چشمی این تصویر را بزرگ نموده و البته بصورت یک تصویر مجازی بزرگ شده به چشم فرد مشاهده گر منتقل می کند.

کار دیافراگم کاهش خیره کننده گی نور رسیده به چشم بیننده هاست. چشمی های هویگنس به چشمی های منفی معروفند و دارای بزرگنمایی ۱۰ و ۵ می باشند. عدسی چشمی هویگنس دارای قیمت نسبتا ارزان و کارایی مناسب می باشد، اشکال عمده آن محدود بودن میدان دید و عدم تامین راحتی کافی برای چشم است.

۱۰. دیافراگم

دیافراگم میزان نوری را که از میکروسکوپ می گذرد تنظیم می کند در هر میکروسکوپ سه دیافراگم می تواند وجود داشته باشد:

الف: دیافراگم زمینه: در مقابل منبع نور قرار دارد و میزان نوری را که از منبع به کندانسور می رسد، تنظیم می کند

ب: دیافراگم کندانسور: میزان نوری را که از کندانسور به نمونه ی مورد نظر می رسد، تنظیم می کند

- این دو دیافراگم بوسیله محقق قابل تنظیم است.

ج: دیافراگم اکولر: میزان نوری را که نمونه به چشم ما می رسد، تنظیم می کند این دیافراگم همیشه ثابت است و بوسیله مشاهده گر قابل دستکاری نمی باشد.

۳.۶ انواع میکروسکوپ ها

۳.۶.۱ میکروسکوپ فلورسانت (fluorescent microscope)

انواع خاصی از میکروسکوپ نوری که منبع نور آن پرتوهای فرابنفش است. برای مشاهده نمونه زیر این میکروسکوپ ها بخش ها یا مولکول های ویژه داخل سلول با مواد فلورسانت یا نورافشان رنگ آمیزی می شوند. زمانی هدف تشخیص پروتئین های خاص یا جایگاه آنها در سلول باشد، روش های معمولی رنگ آمیزی که پروتئین ها را به طور عام رنگ می کنند قابل استفاده نیست. برای رنگ آمیزی اختصاصی، معمولا از پادتن های اختصاصی متصل به مواد فلورسانت استفاده می شود. مواد فلورسانت نور را در طول موج فرابنفش جذب می کنند و در طول موج بلندتری در طیف مرئی تابش می کنند. تصویری که دیده می شود حاصل نور تابش شده از نمونه است. رودامین و فلورسئین دو نوع از رنگ های معمول فلورسانت هستند که به ترتیب نور قرمز و سبز از خود تابش می کنند.



شکل ۵- میکروسکوپ فلورسانت

۳.۶.۲ میکروسکوپ الکترونی (electron microscope)

قدرت جداسازی میکروسکوپ الکترونی از میکروسکوپ نوری بهتر است به این معنی که با میکروسکوپ الکترونی اجزای کوچکتری را می توان دید. قبلا گفته شد حد تفکیک (R) به طول موج نوری بستگی دارد که به نمونه می تابد. در حقیقت بین این دو رابطه مستقیمی وجود دارد یعنی هر چقدر طول موج تابشی کوچکتر باشد، R نیز کوچکتر و قدرت جداسازی بیشتر است. در میکروسکوپ الکترونی بجای استفاده از نور مرئی از امواج الکترون ها استفاده می شود. در شرایط مناسب طول موج الکترون ها به 0.05 nm می رسد. در این طول موج بهترین R ممکن حدود 0.2 nm است. در عمل به علت محدودیت های دیگر، قدرت جداسازی میکروسکوپ های الکترونی هیچ وقت به این خوبی نیست.

حد تفکیک با میکروسکوپ الکترونی برای مولکول های تخلیص شده ی زیستی ، حدود ۰/۱ نانومتر و برای سلول ها ۲ نانومتر است که دست کم ۱۰۰ برابر بهتر از بهترین میکروسکوپ های نوری است.



شکل ۶- میکروسکوپ الکترونی

دو نوع میکروسکوپ الکترونی به نام میکروسکوپ الکترونی گذاره و میکروسکوپ الکترونی نگاره وجود دارد. میکروسکوپ الکترونی گذاره (transmission electron microscope) زودتر اختراع شد و قدرت جداسازی بهتری دارد. در این نوع میکروسکوپ ، الکترون ها هنگام برخورد به نمونه از برخی مناطق آن عبور می کنند و از مناطقی دیگر بازتابیده می شوند. عامل تعیین کننده در این امر در نهایت ویژگی اتم های تشکیل دهنده ی مناطق مختلف سلول است. الکترون های عبوری در دستگاه تشخیص داده می شوند و تصویری از نمونه حاصل می شود. سلول های زنده با میکروسکوپ الکترونی قابل مشاهده نیست.



شکل ۷- میکروسکوپ الکترونی گذاره

۳.۶.۳ میکروسکوپ الکترونی نگاره (scanning electron microscope)

نوع ساده تر میکروسکوپ الکترونی است برای بررسی نمونه با این میکروسکوپ ، نمونه باید با لایه ای نازک از فلز سنگین به صورت یکنواخت پوشیده شود. الکترون های تابیده شده به سطح نمونه از هیچ ناحیه ای از آن عبور نمی کنند، بلکه در برخورد با سطح نمونه باعث تولید الکترون های بازتابیده می شوند. این الکترون ها تشخیص داده شده و تصویری سه بعدی از سطح نمونه حاصل می گردد. قدرت جداسازی میکروسکوپ الکترونی نگاره حدود ۱۰nm است.



شکل ۸- میکروسکوپ الکترونی نگاره

۳.۶.۴ میکروسکوپ STM و میکروسکوپ پرتو X

STM حروف اول Scanning Tunneling Microscope است این نوع میکروسکوپ در دهه ۱۹۷۰ اختراع شد و مخترعان آن در سال ۱۹۸۱ جایزه نوبل را دریافت کردند. همانطور که گفته شد طول موج محدودیتی برای میزان R تعیین می کند. نوآوری STM در این است که در آن امواج نوری یا امواج نوع دیگر به کار گرفته نمی شود و هیچ نوع عدسی در آن وجود ندارد. بیان دقیق نحوه کار این میکروسکوپ خارج از توان این مطلب است ولی به طور خلاصه سوندی که نوک آن به اندازه یک اتم است، ویژگی های نمونه را در ابعاد اتمی رویش می کند. STM ساختار سطحی نمونه را بررسی می کند. اما میکروسکوپ مشابه دیگر ویژگی های الکتریکی، مغناطیسی و یا دمای نمونه را تعیین می کنند. در حال حاضر این میکروسکوپ ها برای نمونه های زیستی و بیشتر برای نمونه های غیر زیستی مورد استفاده قرار می گیرند.

میکروسکوپ پرتو X نوع دیگری از میکروسکوپ های نوین است که کاربرد بیشتری برای نمونه های زیستی دارد. قدرت جداسازی آن چند صد آنگستروم و ضعیف تر از میکروسکوپ الکترونی است، اما سلول های زنده با آن قابل بررسی هستند.



شکل ۹- میکروسکوپ پرتو X

۳.۶.۵ میکروسکوپ زمینه سیاه (Dark Field Microscope)

ساختمان این میکروسکوپ به طور کلی شبیه ساختمان یک میکروسکوپ نوری معمولی است با این تفاوت که دیافراگم آنولار (حلقوی) که در زیر کوندانسور آن قرار دارد در بخش میانی غیر شفاف بوده در نتیجه نور نمی‌تواند از مرکز دیافراگم عبور کند و نور فقط می‌تواند از کناره‌های دیافراگم و به طور مایل به نمونه بتابد، در نتیجه نمونه از کنار روشن می‌شود و می‌توان از سلول یا نمونه مورد نظر را به صورت نقاط روشن در زمینه تاریک مشاهده کرد. با این میکروسکوپ می‌توان نمونه‌های زنده و برخی از نمونه‌هایی با میکروسکوپ نوری معمولی قابل مشاهده نیستند را مشاهده کرد، به علاوه با این میکروسکوپ می‌توان حرکات سلولی مانند مهاجرت سلولی و فرایندهایی که در میتوز اتفاق می‌افتد را نیز مشاهده نمود.



شکل ۱۰- میکروسکوپ زمینه تاریک

۳.۶.۶ میکروسکوپ اختلاف فاز و میکروسکوپ تداخلی

از آنجایی که مراحل آماده سازی نمونه مانند تثبیت، انجماد و رنگ آمیزی ممکن است به برخی از اجزای درون سلولی آسیب برساند بنابراین مشاهده سلول‌ها تیمار نشده و زنده بسیار مطلوب است. برای این منظور از میکروسکوپ‌های اختلاف فاز و میکروسکوپ تداخلی سیستم‌های نوری خاصی ابداع شده است، که سبب افزودن اختلاف ضریب انکسار بین اجزا تشکیل دهنده سلول می‌شود. با این میکروسکوپ‌ها نیز همانند میکروسکوپ زمینه تاریک می‌توان حرکات سلولی مانند مهاجرت سلولی و فرایند میتوز را مشاهده کرد.



شکل ۱۱- میکروسکوپ اختلاف فاز و میکروسکوپ تداخلی

۳.۶.۷ میکروسکوپ معکوس (Invert)

جهت بررسی رشد روزانه سلول ها و اطلاع از چگونگی و نحوه تاثیر عصاره بر حیات سلول ها و همچنین جهت بررسی مورفولوژی سلول ها ناچاریم سلول ها را در همان وضعیت طبیعی که در داخل فلاسکهای مخصوص کشت می باشند مشاهده کنیم. چون میکروسکوپ های معمولی قادر به انجام این عمل نمی باشند لذا از میکروسکوپ معکوس استفاده می شود. این میکروسکوپ به گونه ای طراحی شده که به راحتی می توان سلول های درون فلاسک را با آن مشاهده نمود و از وضعیت آنها اطلاع حاصل کرد.



شکل ۱۲- میکروسکوپ معکوس

۳.۷ سانتریفیوژ

اساس کار دستگاه سانتریفیوژ بر اساس نیروی گریز از مرکز است. در این دستگاه محفظه هایی که برای مخلوط ها در نظر گرفته شده است به کمک موتوری حول یک محور می چرخند و به حالت افقی در می آیند. در اثر حرکت نیرویی به سمت بیرون و برخلاف مرکز سانتریفیوژ به مخلوط وارد می شود که باعث می شود اجزای سنگین تر مخلوط بیشتر به سمت بیرون رانده شوند که باعث می شود پس از اینکه دستگاه از حرکت باز می ایستد مواد به صورت غیرمخلوط باقی بمانند. بطور کلی از سانتریفیوژ برای جدا کردن ذرات جامد از مایع یا تقسیم مخلوطی از مایعات به اجزای سازنده آن،

استفاده می شود. در آزمایشگاه های زیست شناسی، جداسازی اجزای خون و سایر نمونه های بیولوژیکی با کمک این دستگاه صورت می گیرد.



شکل ۱۳- سانتریفیوژ

۳.۸ فلوسایتومتری

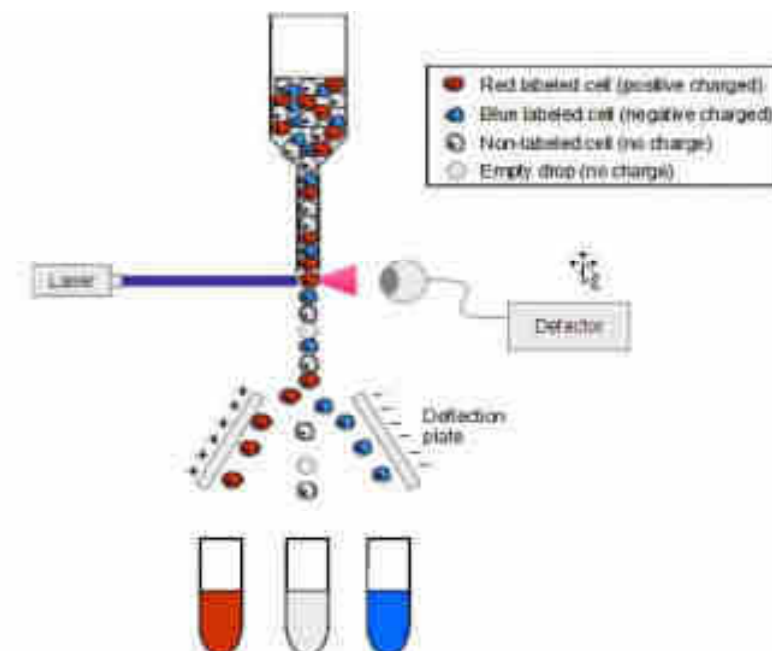
تصور کنید محلولی درون ظرف آزمایشگاه دارید که مخلوطی از انواع سلول هاست و شما می خواهید برای مثال سلول های عصبی را از آن جدا کنید. در این دستگاه که از یک بخش لوله مانند تشکیل شده است محلول خود را قرار می دهید. انتهای این لوله به قدری نازک است که فقط اجازه عبور یک سلول را میدهد. پس سلول ها یکی یکی از انتهای لوله خارج می شوند.

توجه کنید که سطح هر سلول با مارکر های خاصی پوشیده شده است که فقط مختص آن نوع سلول می باشد. مثلاً مارکر سلول های عصبی در سلول های چربی وجود ندارند. (این نکته نیز قابل توجه است که بعضی مارکر ها در چندین نوع سلول وجود دارند.)

ما برای این مارکر ها، آنتی بادی های مونوکلونال خاصی تهیه می کنیم که متصل به ذره فلوروسنس هستند. سپس این آنتی بادی ها را با محلول سلول ها مخلوط میکنیم. همانطور که انتظار میرود آنتی بادی های مخصوص به سلول عصبی به آن متصل می شوند. اما هنوز قابل رویت و تفکیک از دیگر سلول ها نیستند. تا اینکه پس از عبور از مسیر لوله دستگاه در نقطه ای خاص با اشعه فلوروسنس برخورد می کنند و نشاندار می شود. سپس دستگاه توسط **Detector** شناسایی می کند کدام سلول ها فلوروسنس هستند و به آنها بار منفی می دهد. در نتیجه می توان با قرار دادن یک صفحه باردار و منحرف کردن سلول های آنتی بادی دار باردار، آن ها را از محلول جدا کرد. این روش اساساً توسط ایمونولوژیست هایی ابداع شد که تلاش می کردند جمعیت های خالص سلول ها را از یکدیگر جدا کرده و پس از تکثیر آنها در محیط کشت سلولی، نقش مجزای هر سلول را در سیستم ایمنی بررسی نمایند. دستگاه های اولیه قادر بودند فقط یک یا دو رنگ فلوروسانس را تجزیه و تحلیل کنند اما امروز دستگاه هایی عرضه شده اند که قادرند یازده رنگ فلوروسانس را به طور همزمان ردیابی و تجزیه و تحلیل کنند. امروزه استفاده از تکنولوژی های مدرن روز، برای افزایش سرعت انجام کارها و سهولت انجام آنها روز به روز در حال گسترش است. در دهه اخیر فلوسایتومتری به ابزاری ضروری در تشخیص لوسمیهای خونی در انسان تبدیل شده است. فلوسایتومتری به طور معمول برای شناخت رده سلولی، تحلیل یا تجزیه



بافت سلولی بالغ و تشخیص هتروژنیستی در میان جمعیت سلول های توموری استفاده می شود. در دهه اخیر استفاده از این روش در آزمایشگاه های کلینیکی و همچنین تشخیص انواع سرطان به طور چشمگیری افزایش یافته است. تاریخچه فلوسایتومتری به آزمایش های آندرو مولداوان در سال ۱۹۳۰ بر می گردد که دستگاهی را با استفاده از سلول فتوالکتریک طراحی کرد که سلول های در حال عبور از میانه لوله موئینه ای بر روی صفحه اسلاید میکروسکوپ را شمارش می کرد. اولین مقاله مربوط به فلوسایتومتری به سال ۱۹۳۴ بر می گردد که توسط ایشان در مجله Science چاپ شد. نویسنده در این مقاله به شمارش سلول های خونی در یک لوله موئینه توسط یک سنسور فتوالکتریک اشاره کرده است. در سال ۱۹۷۰ اولین سیستم فلوسایتومتری توسط فی. وی. آ. جی تولید، و وارد بازار شد که قابلیت اصلی آن تجزیه و تحلیل DNA و بررسی مقادیر آن بود. پس از آن شمارشگرهای افتراقی با اساس فلوسایتومتری را وارد بازار شد. منابع نوری به کار رفته در این سیستمها لامپهای تنگستنی هالوژنی بودند. در سال ۱۹۷۲ هرزبرگ و همکارانش اولین دستگاه جداکننده سلول براساس فلورسنس را ابداع کردند. این دستگاه اساسا یک فلوسایتومتر بود که پس از آنالیز سلولی قادر به جداسازی سلول های مورد بررسی بود. در سال ۱۹۹۵ امکان اندازه گیری حداقل ۵ پارامتر در ۲۵۰۰۰ سلول در ثانیه به طور معمول به منظور بالا بردن تشخیص و مدیریت حالت های متفاوت بیماری ها و تشخیص بیماری ها استفاده شد. در سال ۲۰۰۳ دستگاه های پرسرعت با استفاده از تکنولوژی دیجیتالی معرفی شدند. پیشرفت و بهبودی کارایی این دستگاه در طول زمان، نمونه کوچکی از تاثیر شگرف خلاقیت و تلاش آدمی در پی بردن به حقایق علم و استفاده از آن برای خدمت به بشریت است.

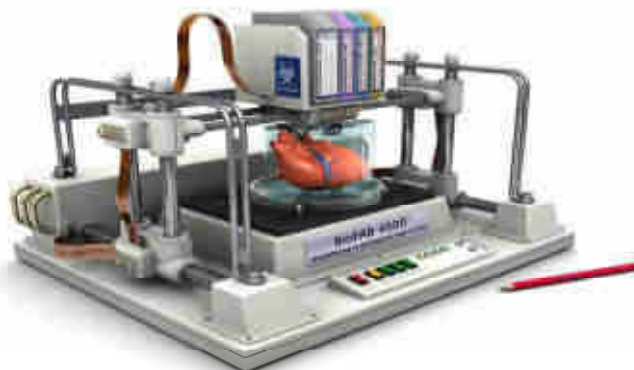


شکل ۱۴- فلوسایتومتری

۳.۹ چاپگرهای سه بعدی

وسایلی هستند که با استفاده از آنها می‌توانید از فایل‌های سه بعدی که در کامپیوتر خود دارید نمونه سه بعدی واقعی بسازید. در چاپگرهای سه بعدی خانگی، برای تولید محصولات از ذوب پلاستیک بهره می‌برند اما چاپگرهای سه بعدی صنعتی با قابلیت پرینت با استفاده از فلزات، خمیر سرامیک و حتی مواد خوراکی ساخته شده‌اند. برای تولید تجهیزات پزشکی و طراحی‌های دقیق در این زمینه و همچنین تولید اندام‌های مصنوعی، نیاز به تولید طراحی‌های قالب‌هایی با ابعاد و مواد بادوام می‌باشد که پرینترهای سه بعدی پاسخگوی این نیاز در علم پزشکی می‌باشند.

فناوری استفاده از چاپ سه بعدی برای تولید اندام‌ها به منظور پیوند زدن، یک گام به پیش برداشته است. در سال‌های اخیر گروهی از دانشمندان توانستند جوهر زیستی کشف کنند. جوهر زیستی ترکیبی از سلول‌های اندام‌هاست و چاپگر آن را به شیوه دقیقی برای ساختن ارگان انتخابی به کار می‌گیرد.

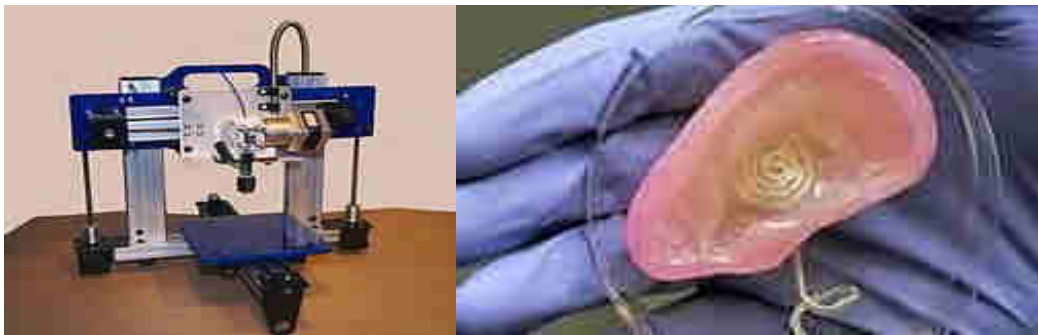


شکل ۱۵- چاپگر سه بعدی

پژوهشگران همچنین با استفاده از یک چاپگر سه بعدی عادی ارزان موفق شدند که بافت نرم چاپ کنند، به این ترتیب که بافت نرم را در داخل نوعی ژل که به طرز خاصی طراحی شده بود، چاپ کردند. اما چالشی که در رابطه با مواد ژله مانند مخصوص چاپ بافت های نرم وجود دارد، این است که بافت ها و یا اندام های نرم پس از چاپ شدن با این مواد، همچون ژله خوراکی بر اثر وزن خود خراب می شوند. محققان برای حل این مشکل، روشی را ابداع کرده اند که با استفاده از آن، مواد نرم در داخل حمامی از مواد پشتیبان حاوی ژلاتین چاپ می شوند.

به تازگی تیمی از دانشمندان روشی را برای مدل بندی مولکولی در مقیاس نانو و شبیه سازی هایی برای زیست شناسی سلولی ارائه داده اند. محققان در نظر دارند تجمع های سلولی را به طور دیجیتالی طراحی کنند، یک دگمه «اینتر» را فشار دهند و ظرف چند ثانیه چگونگی تغییر ساختار و تکامل بافت های زنده کامل را تجسم بخشند. به نظر می رسد نخستین محصول زیستی کامل اورگانو بافت کبد برای آزمایش دارویی خواهد بود. مسمومیت کبد شایع ترین دلیل برای ساخت دارویی از آزمایش های بالینی و بازاریابی آن پس از تایید خواهد بود. هنوز هیچ شیوه ای برای ارزیابی چگونگی اثر گذاری یک دارو بر کبد انسانی پیش از مصرف آن حتی در درمان های حیوانی، وجود ندارد. هدف نیز چاپ بافت پانکراس برای درمان گزارش شده است. این بافت فقط از سلول های درون ریزی ساخته می شود که قادر به تولید انسولین هستند.

در صورت کاشت در بدن انسان، چنین بافتی می تواند قند خون را تنظیم کرده و دیابت نوع ۱ را درمان کند. ارگان های قابل پیوند چالش نهایی فرایند چاپ سه بعدی زیستی خواهد بود، زیرا هم اکنون در ایالات متحده ۱۱۸ هزار نفر در فهرست انتظار گرفتن اهدای عضو هستند. چاپگرهای زیستی همچنین می توانند در دانشکده های پزشکی کارآمد باشند. دانشجویان در حال حاضر بر روی جسد آموزش می بینند، اما هنگام برخورد با فرایندهایی مانند سرطان، هیچ چیز با تجربه واقعی همخوانی ندارد. به جای چاپ بافت سالم، چاپگرهای زیستی می توانند ارگان های دارای تومور یا دیگر نواقص را بسازند، به طوری که جراحان بتوانند پیش از ورود به اتاق عمل، فرایند جراحی را با آن ها تجربه کنند.



شکل ۱۶- چاپگر زیستی

۳.۱۰ اتوکلاو (Autoclave)

اتوکلاو استریل کننده ای است که میکروارگانیسم ها را با استفاده از بخار آب و گرمای تحت فشار از بین می برد. ساز و کار این دستگاه براساس تغییر نقطه جوش آب با تغییر فشار است. اتوکلاو فضایی بسته و تحت فشار دارد و دارای دیواره دوجداره فلزی برای مقاومت در برابر فشار است. در فشار 15 lb/inch^2 آب در دمای ۱۲۱ می جوشد و این گرمای مرطوب جهت استریل کردن محیطهای کشت، ظروف شیشه‌ای در پیچ دار، مایعات و سایر مواردی که به حرارت حساس نیستند، بکار می رود بطوریکه اگر این دما و فشار به مدت ۱۵ دقیقه ثابت نگه داشته شود تمام میکروارگانیسم های زنده از بین می روند. اتوکلاو اندازه ها و انواع مختلفی دارد. مثلاً نوعی که در آن بطور عمودی باز می شود و یا نوعی که بطور افقی و دریک جهت باز می شود.



شکل ۱۷- اتوکلاو

۳.۱۱ آون (Oven)

استریلیزاسیون توسط گرمای خشک با هوای داغ عمدتاً توسط آون انجام می شود. استریلیزاسیون با گرمای خشک باعث خروج آب از میکروارگانیسم ها می شود. آون یک کابینت فلزی با دیواره های عایق سه جداره و یک درب می باشد. دیواره خارجی حاوی پنبه فاسفر بوده، که باعث کاهش انتشار گرما به خارج می شود. در قسمت زیرین آون، سیم پیچ

های الکتریکی تمام سطح را پوشانده اند و یک صفحه فلزی بر روی آن قرار داده شده است که ظروف شیشه‌ای و سایر وسایل جهت استریل شدن بر روی آن گذاشته می‌شوند. آون دارای ترموستات، ترمومتر و دستگیره است. ترمومتر دمای داخلی را نشان می‌دهد و ترموستات دما را ثابت نگه می‌دارد. آون علاوه بر استریلیزاسیون، برای خشک کردن وسایل نیز بکار می‌رود. به منظور استریلیزاسیون، وسایل باید به مدت ۴ ساعت در دمای 160°C قرار گیرند.



شکل ۱۸- آون

۳.۱۲ یخچال و فریزر (-۲۰)

هر دو این وسایل برای ذخیره محیط کشت مایع در 4°C درجه سانتیگراد و برای آنزیم‌ها (به طور مثال تریپسین) و برخی دیگر از محتویات محیط کشت (مانند گلوتامین و سرم) در 20°C درجه بسیار مهم و ضروری هستند. یخچال برای نگهداری محیط‌های کشت و بافرها و فریزر برای ذخیره سرم قبل از تقسیم بندی، مواد مغذی و آنتی‌بادی‌ها مورد نیاز خواهد بود. این مواد طبیعی برای ذخیره شدن به دمای 20°C نیاز دارند اما سلول‌ها برای ذخیره و نگهداری به نیتروژن مایع یا فریزر 70°C درجه سانتیگراد نیاز دارند.



شکل ۱۹- یخچال و فریزر (-۲۰)

۳.۱۳ نیتروژن مایع / فریزر (-۷۰)

همواره چه برای لاین های سلولی که مکرراً تکثیر می شوند و چه لاین هایی که در نهایت از بین می روند، نمونه های از کشت جهت ذخیره سازی باید فریز شوند. این عمل به منظور ممانعت از جهش سلولی و محافظت از لاین سلولی در مقابل آلودگی و دیگر اتفاقات ناگوار صورت می پذیرد.

فرآیند فریز کردن سلول ها عموماً برای تمامی انواع سلولی صورت می گیرد. سلول ها باید در فاز تصاعدی رشد با یک نگهدارنده مناسب که معمولاً دای متیل سولفوکسید (DMSO) است فریز شوند. سلول ها معمولاً ابتدا چند ساعت در ۲۰- درجه قرار داده می شوند و سپس در نیتروژن مایع ۱۹۶- درجه فرو برده می شوند (در ویال های کوچک درب بسته) یا اینکه در فاز گازی که در قسمت بالای مایع قرار دارد نگهداری می شوند. مواردی از تخریب و مرگ سلولی در ۷۰- درجه مشاهده شده است، بنابراین اولویت استفاده از نیتروژن مایع است. ویال ها را می توان در یک جعبه پلی استایرنی با دیواره های ۱ اینچی فریز نمود.



شکل ۲۰- نیتروژن مایع/ فریزر (-۷۰)

۳.۱۴ ظروف کشت بافت

ظروف یکبار مصرف پلاستیکی جهت انجام کشت انواع مختلفی دارند، اما معمول ترین آن ها ظروفی از جنس پلی استایرن می باشد. اگرچه تمام ظروف پلاستیکی یکبار مصرف برای کشت سلول باید به اندازه کافی رشد سلولی را فراهم آورند، اما حصول اطمینان از اینکه کشت در یک ظرف جدید هم قادر به رشد است یا خیر ضروری به نظر می رسد. آزمایشاتی که در این راستا صورت می گیرند، شامل منحنی های رشد و زمان رسیدن به یک لایه یکنواخت سلولی می باشد.

سلول ها می توانند در پتری دیش ها یا فلاسک هایی نگهداری شوند که مجهز به یک سری امکاناتند، از جمله اینکه می

توان فلاسک‌ها را با CO₂ گازدهی کرده و سپس آنها را محکم بسته (غیر قابل نفوذ)، به طوری که نیاز به استفاده از انکوباتور CO₂ مرتفع گردد. این حالت خصوصاً زمانی که انکوباتور به خوبی کار نمی کند مفید خواهد بود.



شکل ۲۱- ظروف کشت

۳.۱۵ سیستم اسمزی معکوس

تهیه یک آب دوبار تقطیر شده یا اسمز معکوس برای آماده سازی محیط کشت و شستشوی ظروف شیشه ای ضروری است. PH آب دوبار تقطیر شده باید مرتباً چک شود چرا که در مواردی امکان تغییر در PH وجود دارد. تنوع در کیفیت آب مورد استفاده ممکن است سبب تغییراتی در نتیجه شود، بنابراین آبی که از یک منبع می آید باید مورد استفاده قرار گیرد. آب با اتوکلاو شدن در ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه استریل می شود.



شکل ۲۲- سیستم اسمزی معکوس

۳.۱۶ استریلیزاسیون فیلتری

محیط‌هایی که قابلیت اتوکلاو ندارند باید به واسطه عبور از یک فیلتر غشایی با قطر منافذ ۰/۲۲ استریل شوند. این فیلترها در اندازه‌ها مختلف به منظور فیلتراسیون طیف وسیعی از مواد با حجم‌های مختلف طراحی شده‌اند. این فیلترها می‌توانند به صورت یک بار مصرف و یا به صورت فیلترهایی با قابلیت اتوکلاو همراه با یک نگهدارنده مناسب خریداری شوند. محیط‌های کشت، آنزیم‌ها، هورمون‌ها، کوفاکتورها و بافرهای بی‌کربنات نمونه‌ای از این مواد غیر قابل اتوکلاو هستند.



شکل ۲۳- استریلیزاسیون فیلتری

۳.۱۷ بیوراکتورها

بیوراکتور کلمه ای است که می تواند به هر وسیله یا سیستم مهندسی شده که محیط فعال زیستی را حمایت می کند گفته شود. بیوراکتور ظرفی است که در آن پروسه ی شیمیایی انجام می شود که ارگانسیم یا ماده ی بیوشیمیایی جدا شده از ارگانسیم در این پروسه دخالت دارند. عموماً یک بیوراکتور باید شرایط سه بعدی تکوین بافت ها را حفظ کرده، بقای سلول ها و عملکرد مناسب آن ها را حمایت کند و شرایط فیزیکی و مولکولی مناسب را برای رشد بهتر سلول ها فراهم نماید. نیروهای که در بیوراکتورها اعمال می شوند میتوانند تحت شرایط استاتیک یا دینامیک به سیستم وارد شوند از جمله این نیروها می توان به نیروهای برشی، الکتریکی، مکانیک-دینامیک، مکانیک-استاتیک و هیدرواستاتیک اشاره کرد. سلول ها در یک محیط مناسب در خارج بدن می توانند زنده بمانند. امروزه روش های رایج کشت سلول ابزار قابل کنترلی را برای تکثیر سلول ها در خارج از بدن در اختیار پژوهشگران قرار داده اند. همچنین بر مبنای این روش های قابل کنترل پژوهشگران قادرند تا سلول های بنیادی را در خارج از بدن به سلول های مورد نظر تبدیل کنند و از این سلول ها برای درمان بیماری های مختلف استفاده کنند. با این وجود این روش های معمول توانایی تقلید شرایط محیط درون بدن را بطور کامل ندارند چرا که در محیط بدن سلول ها در معرض انواع جریان های مایعات و فشار های هیدروستاتیک مختلف قرار دارند و نیز در تعامل دائمی با سلول ها و بافت های اطراف قرار دارند در نتیجه سلول ها که در محیط خارج بدن در شرایط دو بعدی قرار می گیرند کاملاً در شرایط طبیعی خود نبوده لاجرم برخی ویژگی های آن ها دستخوش تغییرات ناخواسته می شوند. جریان های موجود در بدن اغلب مواد مورد نیاز را در اختیار سلول ها قرار داده و مواد زائد را حذف می کنند. همچنین وجود نیروهای مختلف مکانیکی برای عملکرد برخی سلول ها ضروری است که در شرایط کشت دو بعدی ناخواسته نادیده گرفته میشود مثلاً سلول های جداره ی عروق با نیرویی که از فشار خون به آن ها اعمال می شود به عملکرد بهینه ی خود می رسند و در صورت عدم وجود این جریان بسیاری از مولکول های شیمیایی که وجود آن ها برای کارکرد بهتر این سلول ها ضروری است توسط آن ها تولید نشده و یا کمتر تولید می شوند. پس برای اینکه حداکثر شباهت با محیط درون بدن و شرایط طبیعی برای سلول ها حاصل شود نیاز به دستگامی است که بیوراکتور نام دارد. باید توجه داشت که بیوراکتورها کاربردهای مختلفی دارند و در زمینه های مختلف زیست شناسی مورد استفاده قرار می گیرند و استفاده در زیست شناسی سلول های بنیادی تنها یکی از کاربردهای آن ها محسوب می شود.



در مهندسی بافت و پزشکی بازساختی بیوراکتورها را می توان برای مقاصد مختلفی به کار برد. چنانکه گفته شد از محدودیت های کشت دو بعدی عدم وجود جریانی است که مواد زائد را که برای سلول سمی هستند بطور مداوم از محیط سلول ها دفع کند. بیوراکتورها این امکان را ایجاد می کنند و در نتیجه با دفع مواد زائد یکی از موانع رشد و تکثیر سلول ها برطرف شده و تکثیر سلول ها تسهیل می شود. از طرف دیگر در شرایط کشت دو بعدی بدلیل تفاوت عملکرد پژوهشگران مختلف در حین کار با سلول ها، بدلیل حساسیت بالای برخی سلول ها بخصوص برخی سلول های بنیادی، ممکن است نتایج مختلفی از یک آزمایش بدست آید که با توجه به قابلیت تنظیم و کنترل بیوراکتورها در صورت استفاده از آن ها در تحقیقات این مانع نیز برطرف می شود.

در بیوراکتورها بسته به نوع سلولی که مورد مطالعه قرار گرفته و در بیوراکتور کشت می شود پارامترهای مختلفی را تغییر می دهیم. این پارامترها شامل دما، PH، غلظت گازهای تنفسی، سرعت جریان مایع، تنش برشی و فاکتورهای هیدرودینامیکی و نیروهای مکانیکی دیگر هستند. در پزشکی بازساختی ارگان هایی مثل کبد و کلیه که کارهای پیچیده ای مانند سم زدایی، تولید پروتئین و تصفیه ی خون را در بدن به عهده دارند، محققین دستگاه هایی ساخته اند که قادر به تقلید عملکرد کبد و یا کلیه هستند. این دستگاه ها نیز در واقع بیوراکتور هستند. پس بیوراکتورها غیر از عملکردهای تحقیقاتی، در درمان هم می توانند مفید باشند. اگرچه موفقیت ها در این زمینه چندان زیاد نبوده است ولی افق های جدیدی را پیش روی دانشمندان گشوده است.

۳.۱۸ مشخصات بیوراکتورها

یک بیوراکتور باید شرایط محیطی را به گونه ای فراهم کند که امکان رشد، تکثیر و تمایز سلول ها را تا حد امکان مشابه شرایط درون بدن ایجاد شود. یعنی دما، PH و مواد مغذی به دقت مشابه شرایط بدن تنظیم شود. در بدن فاصله ی یک سلول از نزدیک ترین منبع خونی از ۱۰۰ میکرومتر بیشتر نیست. در نتیجه فضایی تعریف می شود که واحد ریزمحیط اساسی (fundamental microenvironment unit) نامیده می شود که حجم آن معادل $100 \times 100 \times 100$ میکرومتر است و در انسان بطور متوسط ۵ سلول در آن قرار می گیرد که البته در بافت های مختلف بسته به وظایف بافت تعداد سلول در هر واحد متغیر است. بیوراکتورها انواع مختلفی شامل hollow, spinner flask, direct perfusion bioreactor, fiber perfusion دارند که این بیوراکتورها هر کدام مزایا و معایب خاص خود را دارند و بسته به نیاز پژوهشگر و نوع تحقیقات هر کدام از آن ها را می توان برای پیشبرد تحقیقات به کار برد.

۳.۱۹ سایر تجهیزات مورد نیاز

علاوه بر وسایل و امکانات فوق تعداد دیگری از تجهیزات نیز برای انجام عمل کشت سلول مفید هستند. یک حمام آب گرم یا بن ماری و سانتریفیوژ برای انجام کار ضروری به نظر می رسد. یک پمپ مکشی جهت تسریع در مکش محیط کشت و مواد و جلوگیری از آلودگی مفید خواهد بود. پمپ باید به طور مناسبی مانع از بازگشت مایع به محیط گردد. تجهیزات اضافی شامل پیپت های مدرج در سایز های مختلف، لوله ها و فالكون های سانتریفیوژ، نگهدارنده های عمومی، پیپت های یک بار مصرف و بالن های پلاستیکی جهت استفاده با پیپت ها هستند. میکرو پیپت های دقیق یا



سمپلر (حجم های ۱ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر) برای تیمار کشت ها با مواد شیمیایی مورد استفاده هستند. این میکروپیپت ها به صورت یک بار مصرف، قابل اتوکلاو و پلاستیکی موجود هستند. برای انجام آزمایشات اختصاصی نیز ممکن است به تجهیزات خاص دیگری نیاز باشد.



فصل چهارم

کشت سلول و روش های رنگ آمیزی سلولی



۴.۱ کشت سلول چیست؟

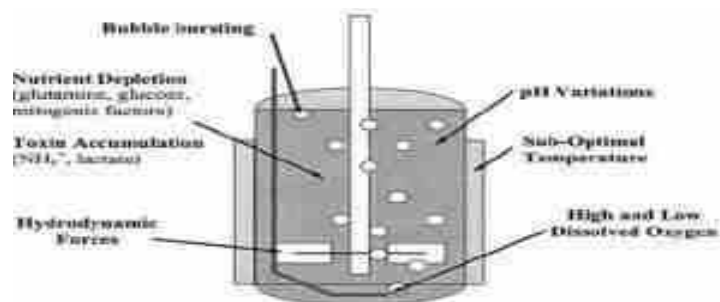
کشت سلولی یعنی ازدیاد تعداد سلول ها در محیط کشت با شرایطی مشابه شرایط درون بدن، پس در دمای معادل دمای بدن (۳۷ درجه سانتیگراد) در درون انکوباتورهای CO₂ شرایط کاملاً ضد عفونی شده انجام می شود. برای رشد سلول های مشخص محیط های کشت اختصاصی نیز وجود دارد. مانند محیط کشتی که در آن فقط سلول های کبدی (هپاتوسیت ها) رشد می کنند و یا محیط کشت هایی که در آن ها فقط نوروها (که قابلیت تقسیم ندارند)، می توانند زنده بمانند. برای اینکه سلول ها در محیط کشت بخوبی تکثیر یابند، شرایط ویژه ای نیاز است: ۱- تراکم آن ها در محیط کشت کم باشد: برای این منظور باید هر چند وقت یکبار، سلول ها را به محیط کشت های تازه پاساژ داد. در صورتیکه تراکم سلول ها بالا رود، بعلت ممانعت تماسی تکثیر سلول ها متوقف شده و سلول ها وارد مرحله تمایز می شوند. ۲- چون رشد سلول های جانوری بسیار کندتر از رشد باکتری ها و مخمرها است امکان آلودگی وجود دارد. برای جلوگیری از رشد باکتری ها در فضای کشت بسته به نوع سلول و نوع محیط کشت از روش ها و ابزار های متفاوت استریل کردن استفاده می شود. مانند استفاده از حرارت خشک یا حرارت مرطوب (اتوکلاو)، آنتی بیوتیک هایی مانند پنسیلین، استرپتومایسین و یا جنتامایسین، اشعه UV و گاما.

. سلول ها از نظر نحوه کشت مدل های متفاوت دارند و به دو حالت کلی تقسیم می شوند:

۱- سلول های وابسته به بستر (Anchorage dependent): این سلول ها برای اینکه بتوانند تکثیر شوند، باید به سطحی متصل شده باشند. این سلول ها بر روی محیط کشت آنقدر تکثیر می شوند تا بصورت تک لایه، تمام سطح محیط کشت را فرا گیرند. پس از آن بعلت اثر فرایند ممانعت تماسی تکثیر سلول ها، متوقف می شود. برخی سلول های تغییر یافته بعلت اینکه پروتئین های سطحی خود (که در ممانعت تماسی نقش دارند) را از دست داده اند، می توانند بصورت چند لایه رشد کنند.

برای کشت سلول های وابسته به بستر، به بسترهای خاصی نیاز است. شیشه بعلت دارا بودن بار منفی بهترین سطح برای اتصال سلول ها است. از سطوح پلاستیکی (دارای بار مثبت) نیز، در صورتیکه به کمک اشعه های یونیزه کننده (مانند پرتو گاما) بار زدایی شوند، می توان استفاده کرد. سلول ها به کمک پروتئین های سطحی خود مانند: اینتگرین ها، فیبرونکتین، کلاژن و لامینین به این سطوح متصل می شوند. سلول های وابسته به بستر را همچنین می توان بر روی سطوح معلق کشت داد. برای این منظور گاهی از گلوله های کلاژن، ژلاتین و یا پلی اکریل آمید، بعنوان سطحی برای اتصال سلول ها استفاده می شود. این گلوله ها در محیط کشت مایع معلق می شوند. برای اینکه سلول ها بهتر به سطوح متصل شوند، می توان این سطوح را با کلاژن، فیبرونکتین، هیپاران سولفات (از پروتئوگلیکان های مهم بافت هی اغلب جانوران) پوشاند. همچنین می توان برای رشد اختصاصی سلول ها از مواد خاصی استفاده کرد. برای مثال برای رشد اختصاصی سلول های غضروفی (کندروسیت ها) از کوندرونکتین (یک نوع گلیکوپروتئین) استفاده می شود.

۲- سلول های غیروابسته به بستر (Anchorage Independent): این سلول ها برای تکثیر و زنده ماندن به سطحی برای اتصال نیاز ندارند، مانند سلول های خونی



۴.۲ کاربردهای کشت سلولی

- ۱- مطالعه سلول از نظر نحوه رشد، نیازهای غذایی، علل توقف رشد و در نهایت توسعه روش‌های کنترل رشد سلول‌های سرطانی و تعدیل بیان ژن‌ها
 - ۲- مطالعه سیر تکامل جانوران از یک سلول لقاح یافته به یک جاندار پر سلولی
 - ۳- مطالعات ژنتیکی، تزریق ژن به ژنوم سلول‌های بنیادی جنینی و تولید حیوانات ترانس ژنتیکی (تراریخته) که بتوانند ژنهای خاصی را بیان نمایند.
 - ۴- ترکیب کردن سلول‌ها برای ایجاد سلول‌های هیبرید و تولید آنتی‌بادی‌های منوکلونال (یک رده یا کلون سلولی)
- مثال: ترکیب سلول مولد یک آنتی‌بادی خاص با سلول سرطانی و ایجاد یک کلون سلولی هیبرید (دورگه) که هم توانایی تولید آن آنتی‌بادی را دارد و هم دارای قابلیت رشد نامحدود سلول‌های سرطانی است.
- ۵- آزمایشات سم‌شناسی
 - ۶- تولید واکسن‌های ویروسی
 - ۷- مطالعه فعالیت‌های داخل سلولی از قبیل تکثیر DNA و سنتز RNA، سنتز پروتئین‌ها و جزئیات مربوط به متابولیسم
 - ۸- مطالعه برهمکنش سلول‌ها
 - ۹- مطالعه محصولات تهیه شده توسط سلول‌ها



۴.۳ فاز های رشد سلولی در محیط کشت و منحنی رشد

رشد سلول دارای فازهای مختلفی هست که در واقع هر فاز نشان دهنده مواردی چون مساعد بودن محیط اطراف سلول، در دسترس بودن بستر فیزیکی و منبع غذایی کافی و لازم برای حمایت از سلول های جدید است. از آنجا که پاسخ و عملکرد رده های سلولی در آزمایش های زیستی مختلف در هر یک از فازهای مختلف منحنی رشد متفاوت است، برای بسیاری از آزمایش ها نظیر تأثیر داروها و محرک های مختلف بر روی سلول ها و بررسی کیفیت محیط های کشت، سرم ها و عوامل رشد، دانستن اطلاعات مربوط به منحنی رشد و تغییرات آن ضروری است. مقایسه خواص زیستی سلول ها از قبیل تفاوت کلون های سلولی و مقایسه رشد سلول های سرطانی از دیگر موارد استفاده منحنی رشد سلول هاست.

فاز تاخیری (Lag Phase)

بدنبال وارد کردن سلول ها به محیط کشت جدید، سلول ها یک فاز تاخیری را در رشد نشان می دهند که در طی آن تقسیمی صورت نمی گیرد زیرا در حال سازگاری با محیط جدید هستند. مدت فاز تاخیری وابسته به حداقل دو فاکتور است: تعداد سلول ها و فاز رشد سلول ها در هنگام پاساژ (subculture). کشت هایی که با تعداد کم سلول انجام می شوند فاز تاخیری طولانی تری داشته و محیط را دیرتر برای رشد خود مساعد می کنند. وقتی از سلول هایی که به طور فعال در فاز تقسیم باشند گروهی جدا شده و به محیط کشت جدید منتقل شوند (اصطلاحاً پاساژ انجام شود) فاز تاخیری کوتاهتری مشاهده می شود.

فاز رشد لگاریتمی (Logarithmic Growth Phase)

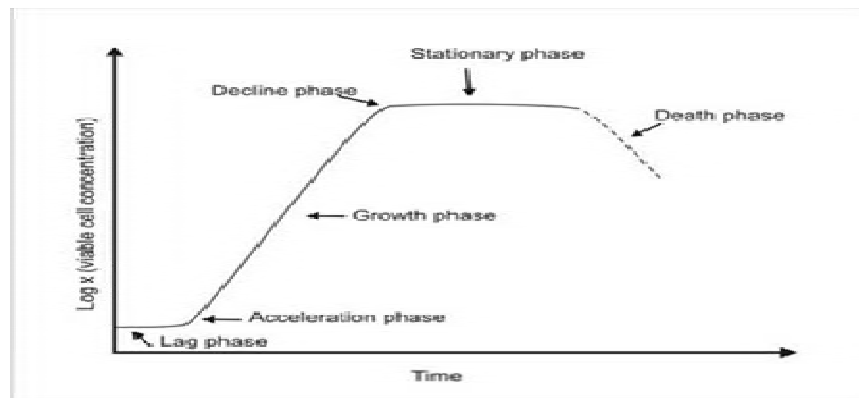
این فاز یک دوره تکثیر فعال است که در طی آن تعداد سلول ها بصورت لگاریتمی افزایش می یابد. در فاز لگاریتمی ممکن است درصد سلول های در حال تقسیم ۹۰ تا ۱۰۰٪ باشد و در یک زمان معین سلول ها بطور تصادفی در وضعیت های مختلف تقسیم سلولی دیده شوند. بعنوان یک قانون کلی، در طی فاز لگاریتمی سلول ها عموماً در سالمترین وضعیتشان در نظر گرفته می شوند و بنابراین طبیعی است که هنگام مطالعه از سلول های این فاز استفاده می شود. کینتیک سلول در طی فاز لگاریتمی جزو خصوصیات رده های سلولی است و در این فاز است که زمان دو برابر شدن تعیین می شود. فاکتورهایی که مدت فاز لگاریتمی را تحت تاثیر قرار می دهند شامل: تراکم سلول ها، میزان رشد سلول و تراکم اشباع (saturation density) رده سلول هستند.

فاز ثابت (Plateau Phase - Stationary Phase)

هنگامی که جمعیت سلول ها به انبوه رسید میزان تکثیر سلول کند شده و کاهش می یابد. این مرحله فاز پلاتو نامیده می شود. اندازه نهایی جمعیت به میزان در دسترس بودن مواد غذایی، نوع رده سلولی و فاکتور های دیگر بستگی دارد. در فاز پلاتو تقسیم سلول بوسیله مرگ سلول متعادل می شود. سلول ها بسیار آسیب پذیر می شوند و درصد سلول هایی که به طور فعال در چرخه تقسیم سلولی قرار دارند ممکن است به ۰ تا ۱۰٪ برسد. برای برخی از رده های سلولی اگر محیط تجدید شود امکان طولانی تر شدن فاز پلاتو وجود دارد.

مرحله کاهش رشد (Decline Phase)

فاز پلاتو بوسیله دوره ای از رکود در تعداد سلول ها دنبال می شود. این کاهش تعداد سلول های زنده مربوط به عدم تعادل در رشد و مرگ آن هاست و ارتباط چندانی با کاهش منابع تغذیه ندارد.



شکل ۱- فازهای رشد سلولی


۴.۴ محیط کار استریل

سلول ها به کوچکترین آلودگی حساس هستند بنابراین، اتاق کشت و محیط کشت سلول دارای استانداردهای خاصی است و شدیداً از نظر پاکیزگی و ضدعفونی بودن مورد مراقبت قرار می گیرد. کارکنان اتاق کشت سلول باید از نظر بهداشتی سالم باشند و برای جلوگیری از انتقال عوامل تخریب سلولی به محصول، کاملاً پوشیده باشند تا سطح پوست با سطوح محیط کشت تماس نداشته باشند. پوشش های مخصوص آزمایشگاه کشت سلول، باید در مکان هایی که برای تعویض لباس پیش از ورودی آزمایشگاه تعبیه شده، پوشیده شوند و لباسی که از این محیط خارج می گردد نباید مجدداً وارد آزمایشگاه شود.

برای انجام کارهای مربوط به کشت سلول باید تا جایی که امکان دارد یک اتاقی جداگانه در نظر گرفته شود. این اتاق باید عاری از هر گونه شلوغی بوده و در صورت امکان از سیستم تهویه هوای فیلتر شده برخوردار باشد. فیلتر های هوا انواع متفاوت دارند مانند فیلتر هپا (HEPA: High Efficiency Particle Air Filter). بهره گیری از هود های متفاوت بسته به شرایط کشت، جهت حفظ بهتر شرایط استریل پیشنهاد می گردد. در صورت استفاده از یک ماده شیمیایی خطرناک باید از هودهای عمودی (ورتیکال) استفاده گردد. اگر امکان استفاده از هود لامینار یا فیلتر های هوا در محیط کار وجود نداشته باشد، کار کشت می تواند بر روی یک میز تمیز با کمک شعله آتش جهت استریل نمودن سطح کار و هوای اطراف آن انجام گردد. بافت های اولیه حیوانی و میکروارگانیسم ها نباید در نزدیکی آزمایشگاه اصلی کشت سلول، کشت شوند بلکه باید یک آزمایشگاه جداگانه و اختصاصی برای کشت آن ها به صورت استریل طراحی شود.

برای استریل کردن سطوح، وسایل و مواد مختلف از روش های متفاوت استریل کردن استفاده می شود.

حرارت: از روش حرارت مرطوب (اتوکلاو) و حرارت خشک (آون) برای استریل کردن بیشتر وسایل زیر هود مانند سوزن ها، تیغ، قیچی، شیشه ها و مواد پلاستیکی مقاوم به حرارت استفاده می شود. در هنگام استفاده از این روش ها باید



نکات ایمنی زیر رعایت شود: از دستکش مقاوم به حرارت و محافظ چشم استفاده کنید. هرگز در هنگام روشن بودن دستگاه اقدام به بارگذاری یا خارج نمودن وسایل و مواد نکنید. اتوکلاو نباید در فضای داخلی آزمایشگاه باشد چرا که بخار بیرون آمده از آن سبب آلودگی محیط آزمایشگاه می گردد.

اشعه ها: سطوح و جریان هوا توسط اشعه ماوراءبنفش استریل می شوند. نیم ساعت قبل از کار تا نیم ساعت پس از آن باید لامپ UV داخل آزمایشگاه، روشن باشد تا محیط از برخی عوامل میکروبی پاک شود (هاگ ها به این اشعه مقاوم هستند). از اشعه گاما برای استریل کردن پلاستیک، داربست های ارگانیک (scaffold) و مواد حساس به حرارت استفاده می شود.

مواد شیمیایی: استریل کردن دست ها ، برخی مواد زیر هود، لوازم جراحی (همراه شعله استفاده شود) ، بعضی از پلاستیک ها، سطوح کار، میزها و قفسه ها و هود لامینار با الکل ۷۰٪ صورت می گیرد. در واقع الکل پاک کننده ی محیط کشت است.

فیلتر کردن: تمامی محلول ها به خصوص محلول های حساس به حرارت. معرف ها و محیط کشت برای استریل کردن فیلتر می شوند. ست فیلتراسیون شامل : کیف، کاغذ فیلتر، ارلن و خروجی خلا است که پس از تنظیم کردن، از آن استفاده می کنیم. برخی فیلترها سر سرنگی هستند. در واقع سر یک سرنگ نصب می شوند و موادی که از سر سرنگ با فشار عبور داده می شوند کم کم فیلتر می شوند. معمولاً فیلترها یک بار مصرف هستند و پس از هر بار مصرف out می شوند. برای حجم های متفاوت از فیلتر های مختلف استفاده می شود. این روش برای بعضی از حلال ها مانند DMSO مناسب نیست.

۴.۵ کشت سلولی (شرح کار به صورت مقدماتی)

در بیشتر آزمایش های کشت سلول، از سلول های فیبروبلاست استفاده می گردد. سلول های فیبروبلاست، فراوانترین سلول بافت همبند هستند که همه انواع رشته های بافت همبند و مواد آلی ماده زمینه ای را سنتز می کند. فیبروبلاست، سلولی است با هسته بیضوی و روشن که کروماتین ظریف و یک یا دو هسته واضح دارد. اندامک های دخیل در پروتئین سازی بطور گسترده در آن دیده می شوند. در مواردی که فعالیت سلول کاهش می یابد، اندازه اش کوچک تر شده و هسته آن پر رنگ و دوکی دیده می شود که در این حالت آن را فیبروسیت نیز می نامند. فیبروسیت ها در صورت تحریک قابل برگشت به حالت فعال (فیبروبلاست) هستند. سلول های CHO (Chinese Hamster Ovary) از سلول های تخمدان همستر چینی گرفته می شود. این سلول ها نیز رفتاری شبیه به سلول های فیبروبلاست دارند.

ذخیره سازی سلول ها در تانک ازت (نیتروژن مایع با دمای منفی ۱۹۶) به صورت فریز شده امکان استفاده از سلول ها را به مدت طولانی فراهم می سازد. برای جلوگیری از تشکیل بلورهای یخ که باعث آسیب دیدن سلول ها می شود از ماده ی ضد یخی بنام دی متیل سولفوکساید (DMSO) استفاده می شود. این ماده بسیار سمی است و نباید با بدن تماسی داشته باشد. برای کشت، DMSO باید از محیط سلول ها بیرون بیاید.



برای استفاده از سلول ها، ابتدا باید آن ها را دفریز کنیم و به دمای مناسب برای رشد سلول در محیط داخلی بدن انسان (۳۷ درجه) برسانیم، تا آماده ی کشت دادن شوند. سلول هایی که از تانک ازت خارج می شوند بسیار حساس اند بنابراین سرعت عمل، کار کردن به صورت استریل و مرحله به مرحله اهمیت زیادی دارد. برای دفریز کردن سلول ها از بن ماری (نوعی حمام آب گرم) یا انکوباتور استفاده می شود. به وسیله ی سل اسکرپر، سلول های باقیماند در ته فلاسک را جدا می کنیم. فلاسک ها باید زیر هود و در محیط کشت باز شوند تا آلودگی وارد آن ها نشود.

پس از این مرحله ، سلول ها را به وسیله ی سمپلر داخل فالكون ریخته و بلافاصله سانتریفیوژ می کنیم. (سمپلر برای انتقال دادن حجم های مشخص به کار برده می شود. خود سمپلر و سر سمپلر با رنگ های استاندارد مشخصی دسته بندی شده اند که هر رنگ معرف حجم خاص و کاربرد خاصی است. مثلاً رنگ زرد برای انتقال ۱۰ تا ۱۰۰ میلی لیتر کاربرد دارد.) سپس مایع رویی را خالی کرده تا سلول ته نشین شده را به راحتی ببینیم. خالی کردن مایع رویی به وسیله ی سمپلر انجام می گردد. حالا سلول ها را پیپتاژ می کنیم. در واقع به وسیله ی سمپلر آنها را از هم باز می کنیم و به هم می زنیم.



شکل ۳- سل اسکرپر



شکل ۲- انواع سمپلر

حال باید سلول ها را به فلاسک منتقل کنیم. استفاده از فلاسک های فیلتر دار برای کشت سلول مناسب تر است زیرا در غیر این صورت مجبوریم سر فلاسک را کمی باز بگذاریم تا سلول ها خفه نشوند، چرا که سلول دی اکسید کربن تولید می کند و این گاز باید به گونه ای از محیط تنفس سلولی خارج گردد. بهتر است ابتدا سلول ها را شمرد تا بدانیم در هر فلاسک چند سلول می ریزیم. در هر فلاسک پنج میلی لیتر ماده ی مغذی (که محیط کشت نامیده می شود) وارد می کنیم که ۴.۵ میلی لیتر از آن محیط کشت است ۰.۰۵ میلی لیتر از آن آنتی بیوتیک (برای تخلیه عوامل میکروبی) و ۰.۴۵ میلی لیتر از آن (Fetal Bovine Serum) FBS سرم جنین گاو، یا (Fetal Calf Serum) FCS سرم جنین گوساله ، که حاوی مواد مغذی و مورد نیاز برای رشد سلول ها است.



شکل ۵- سرم جنین گاوی



شکل ۴- انواع فلاسک

برای اینکه سلول ها خوب توزیع شوند فلاسک را کمی تکان می دهیم و آنها را داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه و استاندارد های لازم قرار می دهیم. در این مرحله کار ابتدایی ما تمام شده است و باید سلول ها را به حال خود بگذاریم تا رشد کنند و تکثیر شوند.

48 ساعت بعد سلول ها را از انکوباتور بیرون می آوریم. محیط کشت تغییر رنگ داده و از سرخ براق به زرد می گراید چرا که سلول ها، مواد داخل محیط را مصرف کرده اند. در این مرحله محیط را فیلتر می کنیم: یک سرنگ بزرگ را باز کرده و از مدیا (محللول قرمز رنگ) پر می کنیم، سر سرنگ را به آن وصل می کنیم. کمی به صورت عمودی نگاه می داریم تا هوای سر سرنگ تخلیه گردد. فالکن را به سر سرنگ وصل می کنیم و به آرامی و با دقت مدیا را فیلتر می کنیم. مدیا با فشار عبور می کند و فیلتر خواهد شد.



شکل ۸- مدیا (محیط کشت)



شکل ۷- ست فیلتراسیون



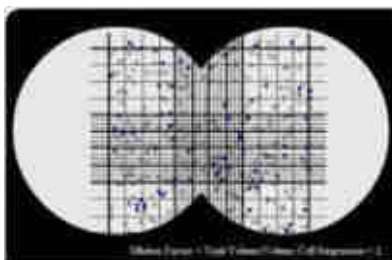
شکل ۶- لوله فالکن

ابتدا باید با میکروسکوپ چک کنیم که اصلاً تعداد سلول ها به میزانی رسیده که پاساژشان دهیم یا نه. سلول هایی که خیلی ریزند و به صورت نقطه های تیره دیده می شوند، مرده اند؛ اما سلول های زنده، حالت خودشان را حفظ کرده و کشیده تر شده اند. سلول های زنده عموماً به محیط می چسبند و سلول های مرده معلق خواهند ماند. مقدار کمی از سلول های مرده در محیط کشت، تاثیری روی سلول های زنده ی دیگر ندارد ولی اگر تعدادشان از حدی زیاد تر شود مشکل ساز می گردند. میتوانیم یک شمارش سلولی خیلی تقریبی و ساده زیر میکروسکوپ توسط سل کانتر انجام دهیم. محللول باید قبل از شمارش کاملاً یکنواخت گردد و باید به حجم کم از فلاسک برداشته شود (حدود یک قطره که معادل ۲۰ میکرو لیتر است). برای شمارش سلولی از تریپانبلو استفاده میکنیم. تریپانبلو یک آنزیم است و رنگ آمیزی آن به صورتی است که سلول مرده را از زنده متمایز می سازد. سرعت عمل شمارش زیر میکروسکوپ اهمیت زیادی دارد چرا که تریپان بلو ماده ای سمی است و ممکن است پس از گذشت چند دقیقه سلول های زنده ی ما را نیز بکشد!



مراحل پاساژ سلول های چسبنده : پس از تخلیه کامل محیط کشت قدیمی آن را با PBS (Phosphate Buffer Saline) دو تا سه بار شستشو می دهیم تا اگر احیاناً سلول مرده ای مانده باشد شستشو داده شود. سعی می کنیم فشار PBS به سول های چسبیده به کف ظرف (سلول های زنده) آسیب وارد نکند. حال نوبت اضافه کرده تریپسین به محیط است. از این آنزیم به عنوان عاملی برای کندن سلول ها از محیط و کف ظرف استفاده می شود. تریپسین برای سلول یک ماده ی خطرناک به شمار می رود. بنابراین باید سعی کنیم که سلول زیاد در معرض تریپسین قرار نگیرد چون قطعا می میرد. $0.05\% - 0.25\%$ تریپسین به محیط اضافه میکنیم. سپس فلاسک را به مدت ۲-۵ دقیقه (بسته به نوع سلول) در انکوباتور ۳۷ درجه می گذاریم. پس از گذشت این زمان، فلاسک را خارج کرده و سرم را به محیط اضافه می کنیم تا اثر تریپسین را خنثی کند. به ازای هر میلی لیتر ۳۰۰ تا ۴۰۰ میلی لیتر سرم FBS اضافه می کنیم. سلول ها در این مرحله باید گرد و شناور در سرم باشند. اگر هنوز هم سلولی به کف فلاسک چسبیده با چند ضربه و تکان آرام سعی می کنیم آن را از کف بکنیم یا از ابزار میله ای شکل مخصوص به این کار استفاده می کنیم تا تمامی سلول ها در محیط سرم شناور گردند. حالا محتویات را داخل یک فالکن جدید می ریزیم و دوباره سانتریفیوژ می کنیم تا سلول ها جداسازی شوند. در این فاصله محیط جدید را آماده سازی می کنیم. محیط قبلی داخل فلاسک را خالی می کنیم. حال دو میلی لیتر از محیط کشت جدید را به سلول ها اضافه می کنیم تا بتوانیم آنها را به راحتی برداریم. سلول ها را پیپتاژ می کنیم که دیگر سلولی در محیط قبلی ما نمانده باشد. حال محیط کشت، سرم و آنتی بیوتیک را به نسبت های گفته شده در فلاسکهای مجزا می ریزیم. در حال حاضر یک فلاسک سلولی ما تبدیل به دو فلاسک سلولی شده است. و مراحل پاساژ دادن تکمیل شده است. پس از چند مرحله پاساژ دادن می توانیم از سلول هایمان در آزمایشهای مختلف استفاده کنیم.

برای شمارش تعداد سلول ها از صفحه ی شطرنجی شکل زیر میکروسکوپ بهره می گیریم. این صفحه ی شطرنجی دارای چهار خانه ی بزرگ در گوشه هایش است. سلول های درون این چهار خانه را می شماریم و مجموع آنها را تقسیم بر چهار می کنیم تا میانگین بدست آید. حال آنها را ضربدر مقدار میلی لیتر موجود در محیط کشت می کنیم که پانصد میلی لیتر است و سپس ضربدر ده هزار یا ده به توان چهار می کنیم (یک عدد نرمالایز شده است) و سپس عدد حاصل را به عنوان تعداد سلول های موجود در محیط کشت گزارش می کنیم.



شکل ۹- شمارش سلولی

۴.۶ انواع رده های سلولی

امروزه در آزمایشگاه‌های کشت سلول از سه نوع رده سلولی استفاده می‌شود:

رده سلولی اولیه (primary cells): این سلول‌ها مستقیماً از بافت طبیعی انسان یا حیوان جدا می‌شوند. معمولاً از سلول‌های اپیتلیال، فیبروبلاست، مزانشیمی و هماتوپوئیتیک (خونساز) برای این منظور، استفاده می‌شود. این سلول‌ها مدت عمر کوتاه، تعداد تقسیمات و قابلیت پاساژ دادن محدودی دارند. قسمت اعظم سلول‌ها در انتهای چرخه حیاتی خود توانایی سنتز DNA را از دست داده وارد فاز بحرانی خود می‌شوند. در این حالت تقسیم سلولی متوقف شده و کشت پایان می‌یابد. نرخ جهش آنها پایین است و در طول عمر محدود خود تا حد زیادی ویژگی‌های بافتی که از آن جدا شده‌اند را حفظ می‌کنند؛ بنابراین برای تحقیقاتی که نیاز به مدل‌سازی شرایط طبیعی بدن (in vivo) دارند، مناسب هستند. کشت این سلول‌ها به زمان بیشتر و تعداد کمتری از سلول‌ها (نسبت به سایر رده‌های سلولی)، شرایط بهینه و مهارت نیاز دارد.

رده سلولی ثانویه (secondary cells یا cell lines): اگر سلول‌های اولیه را به صورت متوالی پاساژ دهیم رده سلول ثانویه حاصل می‌شود. قدرت تکثیر آنها بیشتر از رده اولیه است و سلول‌های حاصله می‌توانند از نوع محدود یا پیوسته (نامیرا) باشند.

محدود (finite): عمر محدودی دارند و در این مدت محدود ویژگی‌های بافت اولیه را حفظ می‌کنند. بسته به گونه، شرایط محیط کشت و فاکتورهای دیگر می‌توانند ۲۰-۱۰۰ بار پاساژ داده شوند. نرخ رشد آنها آهسته و مدت زمان تقسیم آنها طولانی است، محدودیت تراکم دارند و وابسته به بستر اند. این رده سلولی جهت تهیه واکسن نیز بکار می‌رود. واکسن ضد بیماری هاری از نوع HDVC که بهترین واکسن از نوع خود می‌باشد، روی سلول دیپلوئید ریه انسان تهیه می‌شود.

پیوسته (continuous): چنین دودمان‌های نامیرای سلولی می‌توانند به صورت خود به خودی (به عنوان یک پدیده نادر) یا از طریق تغییرات ژنتیکی (Transformation) به کمک مواد شیمیایی سرطان‌زا و یا ویروس‌های تومورزا بدست آیند. روش دیگر، ایجاد دودمان‌های سلولی هیبرید (دو رگه) بین یک سلول با دوره حیاطی محدود و یک رده سلول نامیرا و نامحدود، انجام شده است. تکنیک‌های مهندسی ژنتیک از جمله راهکارهای دیگر جهت نامیرا سازی سلول‌ها به حساب می‌آیند. طی این روند ژن‌های ویروسی جهت جلوگیری از پایان چرخه حیاتی سلول‌ها به ژنوم سلول وارد می‌شوند. این ژن‌ها به دو دسته تقسیم می‌شوند: دسته اول ژن‌هایی که توانایی نامیرا کردن سلول‌ها را دارند. این ژن‌ها سلول‌های اولیه را به سلول‌های زاینده (proliferative) تبدیل می‌کنند یا دوره حیاتی آن‌ها را، همانند سلول‌های فیبروبلاست جنبی اولیه، افزایش می‌دهند. دسته دوم ژن‌هایی هستند که باعث تغییرات ژنتیکی اساسی (Transformation) در سلول می‌شوند. مانند دودمان سلولی فیبروبلاست موشی NIH-3T₃، که توسط ویروس‌های DNA دار، طی یک روند چند مرحله‌ای و در نتیجه همکاری چندین ژن سرطانزا (oncogene)، تغییرات



ژنتیکی سرطان زایی در سلول ها انجام می‌پذیرد. این رده سلولی از بافت های بدخیم سرطانی نیز می تواند استخراج شود. آن ها مانند سلول های سرطانی، قدرت تقسیم زیاد و نرخ جهش بالا دارند. بنابراین با تقسیمات متوالی در طول زمان، ویژگی هایشان تغییرات اساسی کرده و تنوع ژنوتیپی و فنوتیپی زیادی را نسبت به بافت اولیه نشان می دهند. ماده ژنتیکی آن ها به صورت زوج کروموزوم های غیر طبیعی است. زمان تقسیم آنها کوتاه تر است، بهتر با شرایط آزمایشگاهی (invitro) سازگار می شوند و پروتوکل های زیادی برای کار با آنها وجود دارد؛ بنابراین، این سلول ها برای تحقیقاتی که نیاز به شرایط طبیعی بدن ندارند، مناسب هستند. از رده سلولی پیوسته هلا، Vero، KB و Hep2 نیز به طور خالص تهیه و امروزه در آزمایشگاه های کشت سلول مورد استفاده قرار می‌گیرد

به دلیل آسان تر بودن کار با cell lines، زمان کمتر مورد نیاز برای کشت و بازدهی بیشتر آنها، در گذشته بیشتر از این رده سلولی برای تحقیقات استفاده می شد. اما به علت تغییرات گسترده ژنتیکی در طی تقسیمات متوالی و همچنین ایجاد سلول های آلوده، با پیشرفته شدن ابزار ها، بیشتر پژوهشگران به استفاده از رده سلولی اولیه روی آورده اند.

برای تهیه رده های سلولی می‌توان از بافت های جنینی، بالغ یا سرطانی استفاده نمود. قدرت تکثیر سلول های جنینی زیاد است. معمولاً چند ساعت بعد از کشت در آنها میتوز شروع شده و در مدت ۴-۵ روز تعداد قابل ملاحظه ای از سلول ها تولید می گردند. برای این منظور اکثراً از کورتکس کلیه جنینی انسان و سلول های فیبروبلاستی جنینی مرغ یا موش استفاده می‌شود. همچنین، بافت های بالغ (بافت هایی که پس از تولد از بدن نوزاد برداشته می‌شوند مانند سلول های غشاء آمینوتیک، جفت نوزاد انسان، تیروئید و سلول های اپیتلیال کلیه خرگوش، میمون و غیره) برای کشت سلول استفاده می شوند. سلول های سرطانی نیز به نحوی که ذکر خواهد گردید در کشت سلولی به کار می‌روند.

۴.۷ کشت سلول اولیه

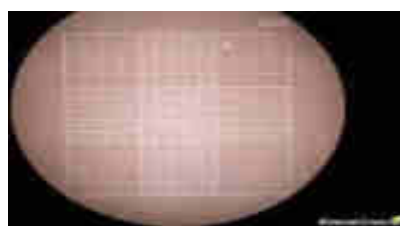
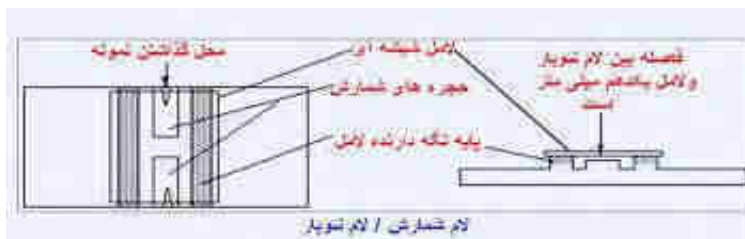
سلول های بسیاری از بافت ها را می‌توان در محیط خارج از بدن کشت داد. برای این منظور تکه های کوچک چند میلی متری از بافت مورد نظر را، بدون ایجاد آلودگی و تحت شرایط ضد عفونی شده، تهیه می کنیم. پس از چند بار شستشو با محلول های مغذی چون ارل و هنکس، برای از بین بردن کامل اتصالات سلولی از روش آنزیمی مناسب (آنزیم های پروتئولیتیک مانند تریپسین و کلاژناز) برای هضم پروتئین های ماتریکس خارج سلولی؛ یا فاکتور هایی که با یون های Ca^{2+} و Mg^{2+} (موثر در چسبندگی سلول ها) پیوند برقرار می کنند، استفاده می شود. سپس سلول ها را سانتریفیژ کرده و با محلول های مغذی فوق شست و شو می دهیم. سپس سوسپانسیونی از مخلوط تمام سلول های بافت مورد استفاده حاصل می شود. سلول های مورد نظر را می توان با استفاده از خواص مختلف مانند اندازه، مولکول ها و آنتی بادی های سطحی و چسبندگی سلولی از سایر سلول های موجود در سوسپانسیون جدا کرد. سلول های جداسازی شده را در محیط های کشت مخصوص، به همراه مواد لازم شامل املاح، ویتامین ها، گلوکز و اسیدهای آمینه در کنار ۲۰-۱۰ درصد سرم جنینی گوساله کشت می‌دهند.

حال اگر سوسپانسیون سلول ها بر سطح شیشه بطری و یا فلاسک کشت سلول ته نشین شده و پس از آن تکثیر یابد، می‌تواند یک ورقه تک لایه سلولی (monolayer) ایجاد کند و تمام سطح آن را بپوشاند و در این مرحله تقسیم سلولی

نیز متوقف می شود (Contact inhibition). حال کشت سلولی ایجاد شده را می توان مجدداً پاساژ داد و تعداد سلول ها را زیاد نمود.

۴.۸ شمارش سلولی

امکان ردیابی رشد سلول ها به صورت چشمی وجود ندارد، اما دقت هرچه بیشتر در شمارش سلولی برای اغلب اهداف آزمایشگاهی مورد نیاز است. معمولترین وسیله مورد استفاده جهت انجام شمارش سلولی، لام نئوبار هموسایتومتر است که اساساً برای شمارش سلول های خونی طراحی شده است. این لام ضخیم از یک سری خطوط عمودی و افقی به صورت مشبک تشکیل شده که میانگین تعداد سلول ها در ۴ خانه که هر کدام از ۱۶ خانه کوچکتر تشکیل یافته اند شمارش می گردد. سوسپانسیون سلولی پس از پیپتینگ، در زیر لامل بر روی این لام لود می شود. پیپتینگ مناسب سوسپانسیون سلولی قبل از لود کردن بسیار اهمیت دارد، این کار به منظور دقت بیشتر و شکستن توده های سلولی به هم چسبیده که کار شمارش را با سختی مواجه می کند صورت می گیرد. تعداد سلول های شمارش شده در این خانه ها در نشان دهنده میزان سلول ها در هر میلیتر مکعب از سوسپانسیون است.



شکل ۱۰- لام نئوبار

۴.۹ سلول ها چگونه رنگ آمیزی می شوند؟

رنگ آمیزی سلول ها روشی است که برای بهتر دیده شدن سلول ها یا اندامک های آن ها زیر میکروسکوپ انجام می شود. از رنگ های مختلف همچنین می توان برای نشان دادن انجام شدن پروسه های متابولیک مختلف یا برای نشان دادن برخی تغییرات در سلول ها مثلاً تبدیل یک سلول بنیادی به یک سلول تخصص یافته و همچنین تشخیص سلول



های مرده و زنده، بهره برد. همچنین می توان با رنگ آمیزی سلول ها شمارش آن ها را در یک محیط دلخواه امکان پذیر کرد. مثلاً اگر پژوهشگری بخواهد تعداد سلول های بتای یک توده ی سلولی برداشته شده از پانکراس را بشمارد باید از رنگ ویژه ای استفاده کند که فقط سلول های بتا را رنگ آمیزی می کند. در این حالت پژوهشگر می تواند تعداد سلول های بتا را که رنگ آمیزی اختصاصی شده اند از سلول های آلفا تشخیص داده و براحتی بشمارد. رنگ آمیزی اختصاصی سلول ها اغلب بر مبنای مولکول های ویژه ای است که فقط در آن سلول ها یافت می شود. رنگهای مختلفی وجود دارد که می توانند بصورت ترجیحی اندامک های خاصی مانند هسته یا دیواره ی سلولی یا کل سلول را رنگ آمیزی کنند. بیشتر رنگ ها برای سلول های غیر زنده قابل استفاده هستند در حالیکه برخی دیگر از رنگ ها می توانند سلول های زنده را رنگ آمیزی کنند. به رنگ هایی که سلول های زنده را رنگ آمیزی می کنند رنگ های حیاتی گفته می شود که معمولاً ترکیبات غیر سمی داشته و سلول های زنده قادر به جذب آنها هستند.

روش رنگ آمیزی سلول ها مبتنی بر نوع سلول و آنالیزی است که قرار است بعد از رنگ آمیزی روی سلول ها انجام شود. مثلاً اگر قرار است میزان ترشح پروتئین ویژه ای مثل کلاژن نوع یک بررسی شود باید از رنگ خاص و روش ویژه ای که فقط کلاژن نوع یک را رنگ آمیزی می کند استفاده کرد. پیش از استفاده از رنگ هم باید سلول ها را با روش های خاصی آماده کرد. مثلاً برای برخی رنگ آمیزی ها باید ابتدا نفوذپذیری غشای سلول ها را برای عبور رنگ ها افزایش داد. همچنین در برخی روش ها پیش از رنگ آمیزی سلول ها، باید آن ها را تثبیت کرد تا شکل ظاهری آن ها بخوبی حفظ شود و در اثر مرگ سلولی یا استفاده از رنگ ها، سلول یا بافت مورد نظر دچار تغییر شکل نشود. برای این کار از تثبیت کننده های مختلفی مانند فرمالدهید، اتانول، متانول، گلو تارآلدهید و . . . استفاده می شود. تثبیت کننده ها دارای گروه های عاملی ویژه ای هستند که با گروه های عاملی پروتئین های سلول و بافت واکنش داده و آن ها را در جای خود نگه می دارند و از نابودی و شکستن آن ها جلوگیری می کنند و بدین ترتیب شکل ظاهری سلول ها و بافت ها را حفظ می کنند. اجزای سلولی که معمولاً رنگ آمیزی می شوند شامل غشای سلولی، پروتئین ها و نوکلئوتیدها هستند. مولکول های کوچک خنثی (بدون بار) و مولکول های با بار مثبت می توانند از غشای سلول زنده عبور کنند و معمولاً در میتوکندری سلول های زنده تجمع می کنند. این مولکول ها می توانند بسته به فعالیت یا آبدوستی در سلول زنده، باقی بمانند. مولکول های با بار منفی نمی توانند از غشای سلول زنده عبور کنند. اغلب رنگ های مصرفی مانند ترکیبات اسیدی یا بازی رفتار می کنند. اجزای بافتی یا سلولی با بار منفی خالص (آنیونی) بیشتر با رنگ های بازی رنگ می گیرند و بازوفیل (بازی دوست) نامیده می شوند و اجزای با بار مثبت خالص (کاتیونی) مانند میتوکندری، تمایل به رنگ های اسیدی دارند و به همین دلیل اسیدوفیل (یعنی اسیدی دوست) نامیده می شوند. آبی تولوئیدین، آبی متیلن، آبی آلسین و هماتوکسیلین مثال هایی از رنگ های بازی هستند و در مقابل ائوزین، فوشین اسیدی و نارنجی جی (orange G) مثال هایی از رنگ های اسیدی هستند. معمولاً برای دیدن سلول ها در بافت ها، از ترکیب ساده ی هماتوکسیلین برای رنگ آمیزی اجزای اسیدی مانند DNA و RNA و ائوزین برای رنگ آمیزی سایر قسمت های بازی سیتوپلاسم استفاده می شوند. هماتوکسیلین هسته را بدلیل وجود DNA آبی کرده و ائوزین سیتوپلاسم را صورتی می کند. روش های رنگ آمیزی دیگری نیز وجود دارد که اساس آن ها پیچیده تر از واکنش الکترواستاتیکی اسید و باز است. مانند روش فولگن که برای رنگ آمیزی دقیق تر DNA و اندازه گیری آن به کار می رود. در این روش قندهای دئوکسی ریبوز توسط اسید هیدروکلریک ضعیف هیدرولیز شده و سپس در معرض معرف پرپودیک اسید و شیف قرار می گیرند.



در واقع در طی این پروسه گروه های ۱ و ۲-گلیکول موجود در قندها به آلدئید تبدیل می شوند که با معرف شیف واکنش داده و رنگ ارغوانی را تولید می کنند.

برخی از رنگ ها خاصیت فلوروسنت دارند یعنی در صورت قرار گرفتن در معرض تابش UV از خود نور ساطع می کنند که این نور ساطع شده در محدوده ی نور مرئی قرار می گیرد و با میکروسکوپ قابل مشاهده است. مثلاً نارنجی آکریدین به DNA و RNA متصل شده و خاصیت فلوروسنت دارد. رنگ های دیگری مانند DAPI و Hoechst اختصاصاً به DNA متصل می شوند و جهت رنگ آمیزی هسته ی سلول به کار می روند و با تابش نور UV از خود رنگ آبی مشخصی ساطع می کنند. استر یک، گروه عامل مناسب برای رنگ آمیزی سلول های زنده است؛ چرا که از غشای سلولی عبور می کند و در سلول توسط استراز (یک آنزیم درون سلولی) به مولکول های با بار منفی هیدرولیز می شود. برخی از رنگ ها پس از عبور از غشای سلولی با پروتئین های درون سلولی بصورت کووالانسی پیوند برقرار کرده و در نتیجه گاه تا چند هفته می توانند در سلول حفظ شوند. برخی رنگ ها که نوکلئوتید ها را رنگ آمیزی می کنند و برای مشخص کردن هسته مورد استفاده قرار می گیرند بین نوکلئوتید ها قرار گرفته و معمولاً برای سلول های مرده استفاده می شوند. یکی دیگر از روش های رنگ آمیزی سلول ها استفاده از میانکنش بین آنتی ژن و آنتی بادی است. سلول های ایمنی بر علیه مولکول های بیگانه که به بدن وارد می شوند (آنتی ژن ها) وارد عمل شده و مولکول هایی بنام آنتی بادی ترشح می کنند که به طور اختصاصی به آنتی ژن مورد نظر متصل می شوند. از آن جا که مولکول های زیستی یک گونه در بدن گونه ی دیگر می تواند سبب تولید آنتی بادی های اختصاصی شود، محققین با تولید کنترل شده ی آنتی بادی های اختصاصی علیه پروتئین های خاص و نشاندار کردن آنتی بادی ها با رنگ های ویژه ای که اغلب فلوروسنت هستند می توانند مولکول های زیستی ویژه ای را ردیابی کنند.

اساس کار به این صورت است که با استفاده از روش های خاصی سلول ها را آماده کرده و بعد در معرض آنتی بادی نشان دار شده با رنگ فلوروسنت قرار می دهند. در صورت وجود آنتی ژن (یعنی همان مولکولی که پیشتر از آن برای تولید آنتی بادی استفاده شده) در سلول، آنتی بادی به آن متصل شده و در صورت قرار گرفتن در معرض پرتو UV از نمونه نور ساطع می شود. پژوهشگران از این روش برای ردیابی سلول های خاصی استفاده می کنند. مثلاً نوروں ها پروتئینی بنام MAP-2 در درون خود تولید می کنند که جزئی از اسکلت سلولی است. دانشمندان قبلاً آنتی بادی علیه MAP-2 را تولید کرده اند. حال فرض کنیم می خواهیم سلول هایی را که در خارج از بدن نگهداری می کنیم از نظر توانایی تولید این پروتئین بررسی کنیم. آنتی بادی MAP-2 را به محیط سلول هایی که برای رنگ آمیزی آماده شده اند می افزایشیم. در صورت وجود MAP-2 آنتی بادی به آن متصل می شود و وجود پروتئین مذکور را می تواند در سلول با استفاده از میکروسکوپ مشاهده کرد.