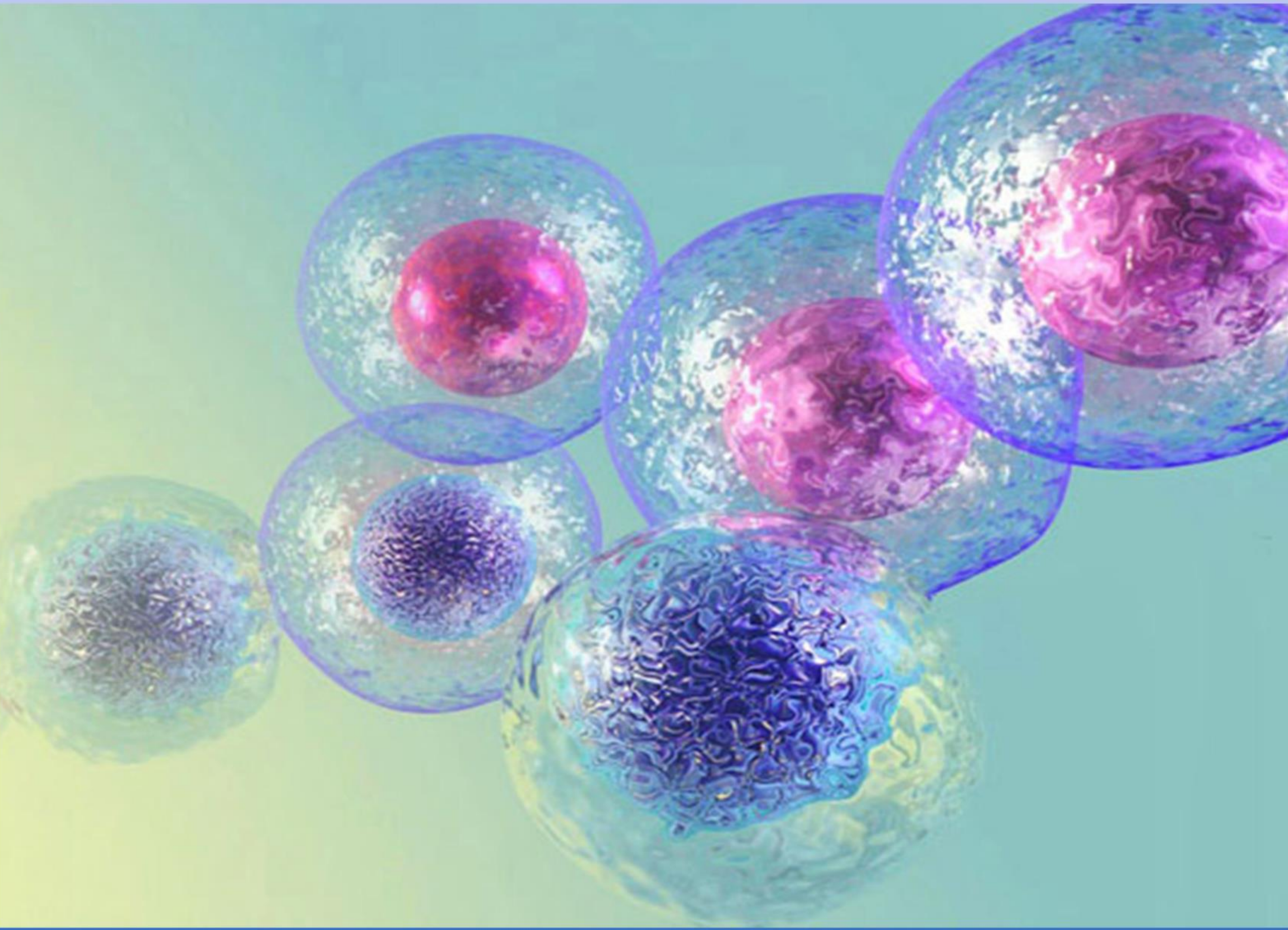
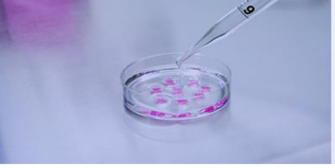
ستاد توسعه علوم و فناوری های سلول های بنیادی

# المپیاد ملی سلول های بنیادی
# و
# پزشکی بازساختی



## کتابچه آموزشی



**مبارزهٔ علمی برای جوانان، زنده کردن روح جست‌وجو**

**و کشف واقعیّت‌ها و حقیقت‌هاست.**

حضرت امام خمینی (ره)

ریاست جمهوری
معاونت علمی و فناوری

جمهوری اسلامی ایران
وزارت آموزش و پرورش


## 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**

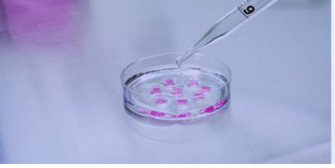
**بتول احدی ، بنفشه صادقی**



ستاد توسعه علوم و فناوری‌های سلول‌های بنیادی

مرکز ملی پرورش استعدادهای درخشان و دانش‌پژوهان جوان

www.isro.isti.ir



# هو العلیم

## پیشگفتار

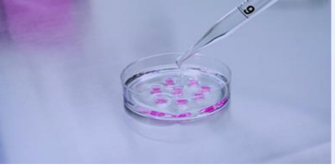
علوم و فناوری‌های سلول‌های بنیادی و پزشکی بازساختی طی سال‌های اخیر جایگاه ویژه‌ای در پزشکی به ویژه درمان بیماری‌های صعب العلاج پیدا کرده است و بسیاری از جوانان نیز علاقمند به ادامه تحصیل در اینگونه حوزه ها شده‌اند.

بدون شک دانش آموزان به عنوان آینده سازان کشور همواره مشتاق هستند تا اطلاعات جامعی در زمینه علوم و فناوری‌های نوین و حیطه های 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 دانش آموزی سلول‌های بنیادی و پزشکی بازساختی نیز فرصت بسیار مطلوبی را برای سیاست گذاران حوزه علوم سلولی کشور فراهم می آورد تا سرمایه‌های جوان کشور را با آینده درخشان 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 تعالی:

وَ لَقَدْ خَلَقْنَا الْإِنْسَانَ مِنْ سُلَالَةٍ مِنْ طِينٍ ۝ ثُمَّ جَعَلْنَاهُ نُطْفَةً فِي قَرَارٍ مَكِينٍ ۝ ثُمَّ خَلَقْنَا النُّطْفَةَ عَلَقَةً فَخَلَقْنَا الْعَلَقَةَ مُضْغَةً
فَخَلَقْنَا الْمُضْغَةَ عِظَامًا فَكَسَوْنَا الْعِظَامَ لَحْمًا ثُمَّ أَنْشَأْنَاهُ خَلْقًا آخَرَ فَتَبَارَكَ اللَّهُ أَحْسَنُ الْخَالِقِينَ ۝ ﴿المؤمنون : ۱۱-۱۳﴾

## المپیاد سلول های بنیادی و پزشکی بازساختی؛ المپیادی از جنس آینده

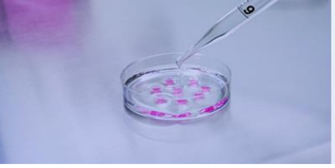
در تبیین مفهوم المپیاد، مفاهیم فراوانی پنهان است. یکی از اهداف بسیار مهم برگزاری این آزمون ها سنجش و اهمیت دادن به میزان عمق نگرش و خلاقیت آزمون دهندگان است. یعنی همان گمشده ای که متأسفانه بنا به اظهار بسیاری از متخصصین و کارآفرینان عصر حاضر، در روند فعلی آموزش مورد اغفال واقع شده است و روند رو به رشد 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 پشتوانه ظهور المپیاد 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 آینده‌پروران کشورمان از بین دانش‌آموزان فرهیخته این مملکت رشد خواهند یافت. ستاد توسعه علوم و فناوری‌های 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 می تواند 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 گرنت 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 بر داشتن 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

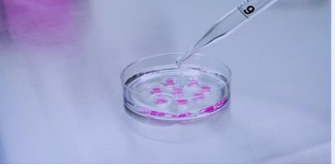
در انتها طبق قاعده «**من لم یشکرالمخلوق لم یشکر الخالق**» وظیفه خویش می دانم که از زحمات تمامی سروران بزرگوارم در وزارت آموزش و پرورش و ستاد توسعه علوم و فناوری سلول های بنیادی – که این مقال جز به همت تک تک ایشان عرصه مجال نمی یافت – تشکر و قدردانی نمایم و به ویژه از معلم اخلاق **جناب آقای دکتر حمیدیه**، 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.

تا چه قبول افتد و 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......................................................................................................................۷

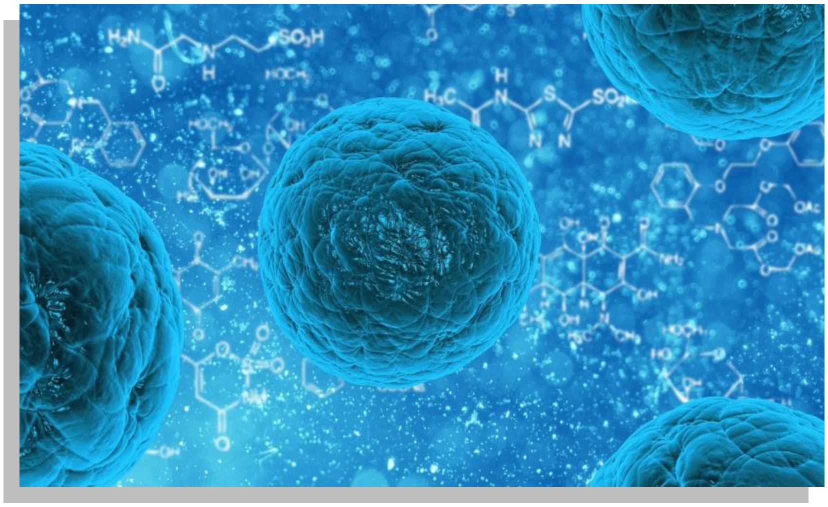
**فصل دوم :** سلول های بنیادی........................................................................................................۵۵

**فصل سوم :** کشت سلول و روش های رنگ آمیزی سلولی.............................................................۶۶

**فصل چهارم :** تجهیزات موجود در آزمایشگاه.......................................................................................۷۸

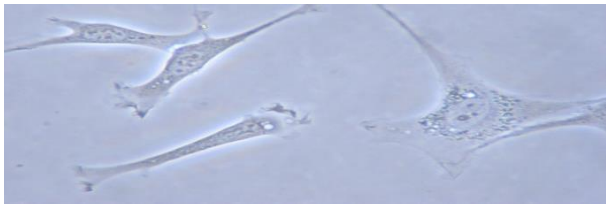
# فصل اول

## کلیات سلولی ۱



## ۱,۱ غشاهای زیستی

در اوایل قرن بیستم تصور می‌رفت که مرز مشخصی بین محفظه‌ی داخل و خارج سلول وجود ندارد و سیتوپلاسم سلول به نحوی خود به خود ختم می شود (شکل۱). پس از شناسایی قابلیت تراوایی سلول نسبت به آب (اسمز) خصوصیّات الکتریکی سطح سلول، فیزیولوژیست‌ها معتقد شدند که سلول پوسته یا مرزی تراوا دارد. بررسی سلول به وسیله میکروسکوپ الکترونی ساختار خاص و منظمی را در اطراف همه‌ی سلول های پروکاریوتی و یوکاریوتی نشان داد که محتوای سلول ها را از محیط خارج جدا می‌ساخت. این ساختار در اطراف اندامک‌های سلول یوکاریوتی نیز مشاهده شد.

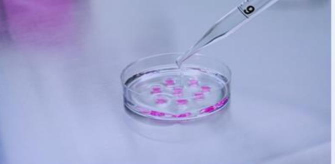


شکل۱- یک سلول فیبروبلاست زنده زیر میکروسکوپ نوری

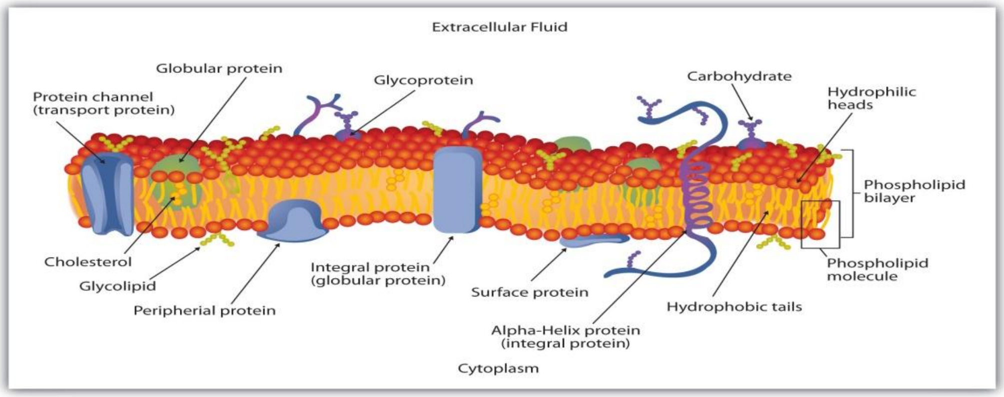
امروزه می‌دانیم که غشای سلول مرزی تراوا برای ورود تمام مولکول‌ها به درون سلول نیست، بلکه با خاصیّت انتخابیِ بسیار دقیق عمل می‌نماید. انتقال مواد غذایی به درون سلول و خارج نمودن مواد زاید از آن، تنظیم غلظت یون‌ها در داخل سلول، دریافت پیام-های محیطی و انتقال پاسخ سلولی به محیط از جمله فعالیّت‌های غشای پلاسمایی می‌باشند.

## ۱,۲ غشای پلاسمایی

اولین مطالعه‌ی مستقیم که ساختار غشای سلول زنده را آشکار ساخت در سال ۱۹۲۵ به وسیله‌ی گورتر و گرندل انجام گرفت. آنها وجود لیپید در غشای گلبول قرمز و نحوه‌ی قرارگیری آن را در غشا نشان دادند. این پژوهشگران پس از دادن گلبول قرمز در آب که منجر به متلاشی شدن آن شد، با استفاده از یک حلّال آلی لیپید آن را استخراج نمودند. می‌دانید که چربی در حلّال آلی حل می‌شود و به این نحو از مولکول‌هایی که در آن حل نمی شوند، جدا می‌شود. در آن زمان پژوهشگران می‌دانستند که فسفولیپیدها روی سطح آب به صورت تک لایه ای پیوسته شناور می‌شوند که قسمت آب دوست آنها در مجاورت با آب، و قسمت آب گریزشان دور از آب و به سمت خارج قرار می گیرد. با اندازه‌گیری سطح آبی که لیپید استخراج شده ازیک گلبول قرمز پوشانید بود، آنها نشان دادند که فسفولیپیده غشای یک گلبول قرمز سطحی معادل با دو برابر سطح سلول را در بر می‌گیرد. گورتر و گرندل نتیجه گرفتند که چون گلبول قرمز فاقد اندامک داخلی است، لیپید موجود در غشای این سلول باید به صورت دو لایه‌ی لیپیدی قرار گرفته باشد. در مطالعه بعدی کشش سطحی مولکول‌های چربی خالص و مولکول‌های چربی استخراج شده از غشای سلول اندازه‌گیری شد که غشای گلبول قرمز تنها از لیپید تشکیل نشده و احتمالاً باید دارای بخش پروتئینی نیز باشد. در حقیقت اگر مقدار کمی پروتئین به لیپید خالص روی سطح آب اضافه شود، کشش سطحی آن کم می‌شود. بر پایه‌ی این مطالعات و مطالعات متنوع دیگر، مدلی سه لایه‌ای برای غشای پلاسمایی ارایه شد که طبق آن غشای سلول از دو لایه‌ی پروتئینی که لایه‌ای لیپیدی را در بر می‌گیرد، ایجاد شده است. فرض بر این بود که لیپید قرار گرفته در وسط دو لایه‌ی پروتئینی، خود دو لایه‌ای است.



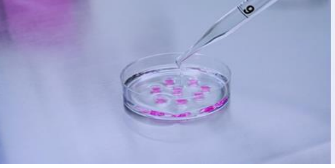
پس از کشف میکروسکوپ الکترونیکی و استفاده از آن برای مطالعه‌ی غشای زیستی، جزئیات ساختاری غشا و اجزای آن مشاهده شد. پیشرفت در روش‌های جداسازی و تخلیص اجزای مختلف سلول و به دنبال آن مطالعات بیو شیمیایی بروی این ساختارها، اطلاعات جامع‌تری در مورد غشاهای زیستی فراهم کرد. مطالعات گوناگون نشان دادند که مدل سه لایه‌ای به شکلی که ارایه شده بود جواب‌گوی بسیاری از فعّالیّت‌های سلول زنده نظیر عبور بسیاری از درشت مولکول‌ها از غشا، نمی باشد. با توجه به انبوه داده‌ها، محققّی به نام سنگر در سال ۱۹۷۲ مدل ساختاری موزاییک سیال را برای غشای پلاسمایی ارایه داد. او ضمن تأیید وجود لیپید و پروتئین در غشای پلاسمایی پیشنهاد جدیدی برای چگونگی قرار گرفتن این درشت مولکول‌ها ارایه داد. طبق مدل سنگر که امروزه نیز مورد تأیید دانشمندان است، غشا اساساً از دو لایه‌ی لیپیدی تشکیل شده است و پروتئین‌های موجود در آن به صورت پراکنده میان دو لایه‌ی لیپیدی جای گرفته‌اند و شکی چون موزاییک به غشا می‌بخشد (شکل۲). تمام غشاهای زیستی یک سطح خارجی و یک سطح داخلی دارند. سطح داخلی غشای پلاسمایی که رو به سیتوپلاسم سلول است، سطح سیتو پلاسمی نیز خوانده می‌شود. سنگر در مدل خود یکی از مهم‌ترین خصوصیّت‌های غشا را که قابلیت تحرک با سیالیّت مولکول‌های سازنده‌ی آن است، نیز معرفی کرد. این جهش از تصویر ساختاری ثابت برای غشای سلول به ساختاری که مولکول‌های آن دائم در حال تحرک هستند، یکی از بزرگ‌ترین تحوّلات در زمینه‌ی زیست‌شناسی سلولی بوده است. صحّت این مدل با روش‌های دیگر آزمایشی که در زیر به آنها اشاره خواهد شد، به دفعات توسط دانشمندان مختلف تأیید شده است.




شکل ۲-ساختار دو لایه‌ی لیپیدی

## ۱,۳ لیپیدهای غشا

همانطور که ذکر شده غشاهای زیستی همه دارای لیپید و پروتئین می‌باشند. مطالعات نشان داده‌اند که بیش از نیمی از جرم لیپیدهای غشای پلاسمایی را چهار نوع مختلف فسفولیپید تشکیل می‌دهد. فسفو لیپیدها مولکول‌هایی دوگانه دوست هستند که سر آنها آب‌دوست و دمشان آب گریز است .گروه فسفات در سر آب دوست و اسید چرب در دم آب گریز آنها قرار می‌گیرد. مجدداً یادآوری می‌شود که به دلیل ویژگی‌های فیزیکو شیمیایی، این مولکول پس از قرار گرفتن در محیط آبی ساختاری دو لایه‌ای تشکیل می دهند که در آن سر آب دوست مولکول‌ها در خارج و در تماس با آب، و دمِ آب گریزشان در مرکز و دور از آب قرار می‌گیرند.



## ۱,۴ پروتئین‌های غشا

پروتئین‌ها در ساختار و فعّالیّت غشاهای زیستی نقش مهمّی دارند. حدود ۵۰ درصد جرم غشا پلاسمایی را پروتئین تشکیل می دهد، اما مقدار نسبی آن در غشاهای پلاسمایی سلول های مختلف و اندامک‌ها بسیار متنوع است. به عنوان مثال، میلین که لایه‌ی محافظ آکسون سلول های عصبی است حدود ۲۵ درصد پروتئین دارد، در حالی که ۷۵ درصد غشای داخلی میتوکندری و کلروپلاست که در تولید و انتقال انرژی نقش دارند از پروتئین تشکیل شده است. علی‌رغم این‌که پروتئین‌ها درصد قابل ملاحظه‌ای از غشاها را تشکیل می‌دهند، تعداد آنها از تعداد لیپیدهای غشا کمتر است. باید توجه داشت که پروتئین‌ها از لیپیدها بزرگ‌تراند و به ازای هر مولکول پروتئین تقریباً ۵۰ مولکول لیپید وجود دارد.

پروتئین‌های غشا به دو گروه تقسیم می شوند، پروتئین‌های سراسری و پروتئین‌های سطحی. پروتئین‌های سراسری مولکول‌هایی دوگانه دوست هستند که در ضخامت غشا قرار می‌گیرند. بخش‌های آب‌دوست آنها در تماس با سطح داخلی و خارجی غشا.

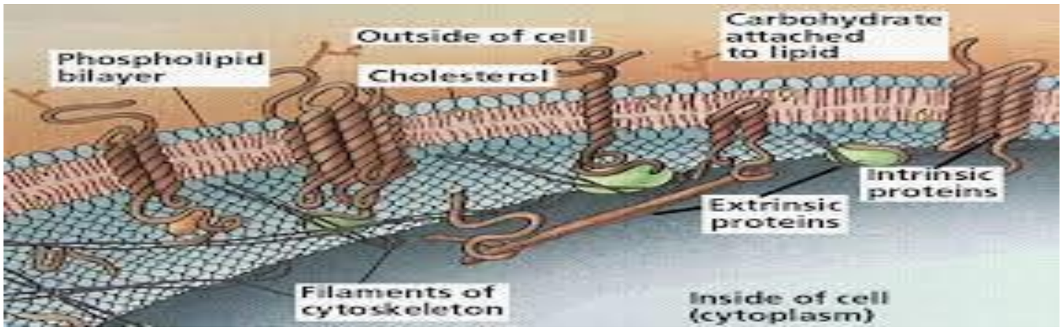
۱) پروتئین سراسری که یک‌بار از عرض غشا عبور می‌کند.

۲) پروتئین سراسری با ۳ مارپیچ آلفا که در غشا سه بار تا خورده است. برخی از پروتئین‌های نوع ۱ و ۲ توسط پیوند کووالان به اسید چرب در سطح داخلی غشا متصل می‌شوند.

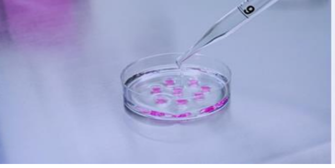
۳) پروتئین سطحی که به یک زنجیره‌ی اسید چرب در سطح داخلی غشا اتصال یافته است.

۴) پروتئین سطحی که به یک فسفولیپید گلیکوزیله شده‌ی غشایی متصل شده است. (گلیکوزیله یعنی درارای گروه های قندی؛ به بیان دیگر وقتی یک مولکول توسط آنزیم های سلولی به واحدهای قند متصل می شود می گویند گلیکوزیله شده است و به این فرایند گلیکوزیلاسیون گویند. گلیکوزیلاسیون اغلب برای عملکرد مولکول ها ضروری است و برخی مولکول های خاص برای انجام عملکردشان باید واحدهای قندی به ساختارشان متصل شود.)

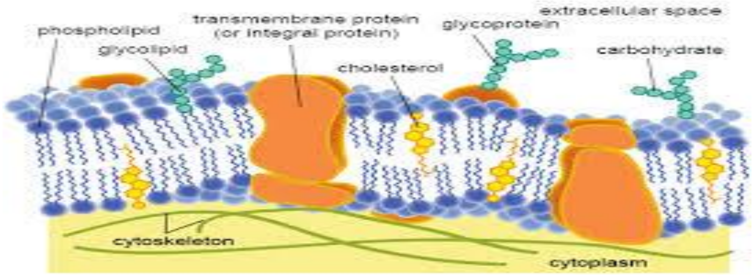
۵) پروتئین سطحی که توسط پیوندهای غیر کووالان به یک پروتئین سراسری متصل شده است. کوچک و دوگانه دوست هستند. انتهای غیر قطبی این مولکول‌ها به انتهای غیر قطبی پروتئین‌های سراسری متصل می‌شوند. علاوه بر این، مولکول‌های دیگر ماده‌ی شوینده به بخش غیر قطبی فسفو لیپیدهای غشا متصل می‌شوند. بخش‌های قطبی مولکول‌های شوینده متصل به پروتئین‌ها یا فسفولیپیدهای غشایی در تماس با محیط آبی قرار می‌گیرند. به این نحو، مولکول‌های پروتئین و لیپید جدا از هم در محیط آبی حل می‌شوند. با حذف مولکول‌های شوینده، پروتئین‌های جدا شده از لیپیدها با یکدیگر تجمع می‌یابند و به صورت رسوب از محلول جدا می‌شوند. انواع پروتئین‌های جدا شده را می‌توان با روش‌های بیوشیمیایی دیگر خالص کرد: یک مورد از استفاده‌ی این روش جداسازی را در قسمت « ترابری مولکول‌های کوچک از غشا» در همین فصل خواهید دید.




شکل ۳- نحوه‌ی قرار گرفتن پروتئین‌های در غشای دو لایه‌ی لیپیدی



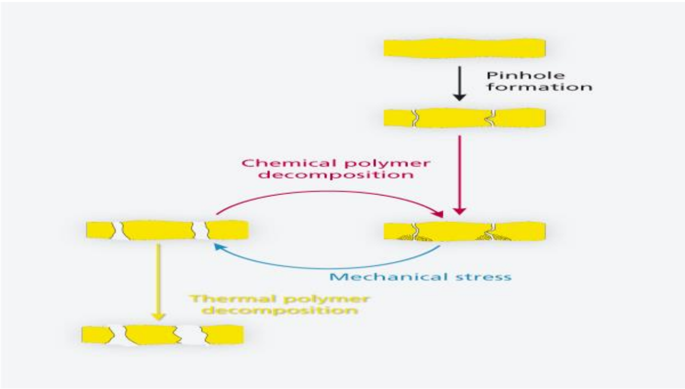
باید دانست که پروتئین های سطحی و سراسری می‌توانند در ترکیب با قند باشند. گلیکو پروتئین‌ها اکثراً در سطح خارجی غشای پلاسمایی و سطح داخلی غشای اندامک‌ها قرار دارند (مقصود از سطح داخلی سطحی است که در تماس با سیتوپلاسم سلول قرار ندارد). الیگو ساکاریدها به لیپیدها، پروتئین‌های سطحی متصل شده‌اند.




شکل ۴-سطح خارجی غشا

## ۱,۵ نامتقارن بودن غشای پلاسمایی

همانطور که مشاهده شد پروتئین‌های مختلف هر کدام به شکلی خاص در غشا جای می‌گیرند. نحوه‌ی جایگیری پروتئین‌ها در سطح داخلی و خارجی یکسان نیست و دو طرف غشا از این لحاظ نامتقارن می‌باشند. عدم تقارن در توزیع پروتئین‌های سطح غشاهای زیستی را می‌توان به کمک روش انجماد و ترک دادن غشا بررسی کرد. در این روش، غشا از وسط شکسته و دو سطح دو لایه‌ی لیپیدی از یکدیگر جدا می‌شوند. سطوح جدا شده را می‌توان برای مشاهده با میکروسکوپ الکترونی یا برای جداسازی پروتئین‌ها استفاده نمود.

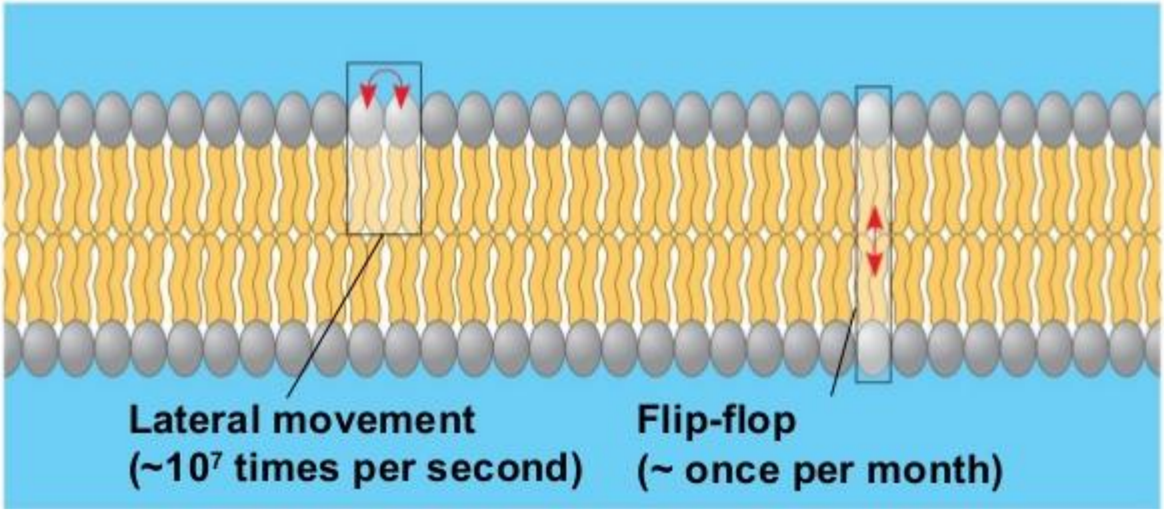



شکل ۵- **روش انجماد و ترک دادن**.

## ۱,۶ سیّالیت غشا

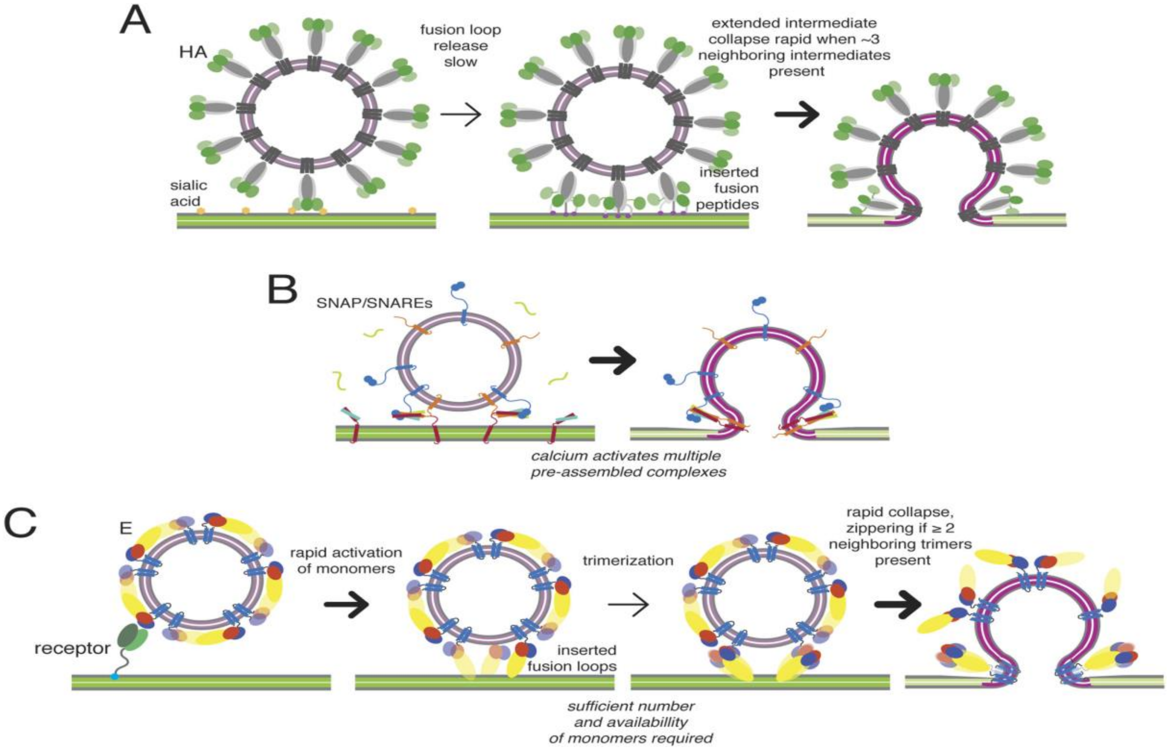
یکی از مهمترین ویژگی‌های غشای زیستی سیّالیت آن است، به این معنی که مولکول‌های تشکیل دهنده‌ی غشا قابلیت تحرک دارند. برای مطالعه‌ی سیّالیت، غشای گلبول قرمز و غشاهای مصنوعی استفاده می‌شوند. برای تهیه‌ی غشای گلبول قرمز، سلول را در محیط‌هایی با غلظت پایین نمک قرار می‌دهند. در این شرایط، سلول در اثر فرآیند اسمز متلاشی می‌شود و غشای آن به صورت پوسته‌هایی که شبح سلولی نام گرفته‌اند جدا می‌شود. تکان دادن این مخلوط منجر به متلاشی شدن شبح های سلولی و تشکیل وزیکول‌هایی شبیه لیپوزوم می‌شود. این وزیکول‌ها و وزیکول‌های حاصل از غشاهای مصنوعی کاربرد فراوانی در مطالعات غشا دارند.

حرکت مولکول‌های فسفو لیپید و پروتئین را در وزیکول یا لیپوزوم می‌توان به وسیله‌ی نشاندار کردن قسمت قطبی این مولکول-ها نشان داد. تشخیص محل مولکول نشاندار شده، پیگیری حرکت آن مولکول را ممکن می‌سازد. نتایج مطالعات مختلف نشان داده‌اند که سرعت حرکت مولکول‌های لیپید از یک نانومتر در ثانیه در سلول حیوانی، تا یک میکرو متر در ثانیه در سلول باکتری است. حرکت لیپیدها ممکن است در جا و به صورت دورانی، یا از نقطه‌ای به نقطه‌ی دیگر به صورت افقی باشد. حرکت مولکول گاهی به صورت عمودی از یک لایه‌ی غشا به لایه‌ی دیگر انجام می‌گیرد که به آن وارونه شدن گویند. این عمل نسبتاً نادر است و ممکن است تنها یک بار در ماه رخ دهد. حرکت پروتئین‌های غشا به دلیل بزرگتر بودن آنها در مقایسه با فسفولیپیدها کندتر است. به عنوان مثال، حرکت یک پروتئین سطح از یک قطب به قطب دیگر یک سلولِ ۲۰ میکرومتری، ۱۰ تا ۶۰ دقیقه طول می‌کشد.




شکل۶- تصویری از نحوه‌ی حرکت مولکول‌های لیپید در غشا.

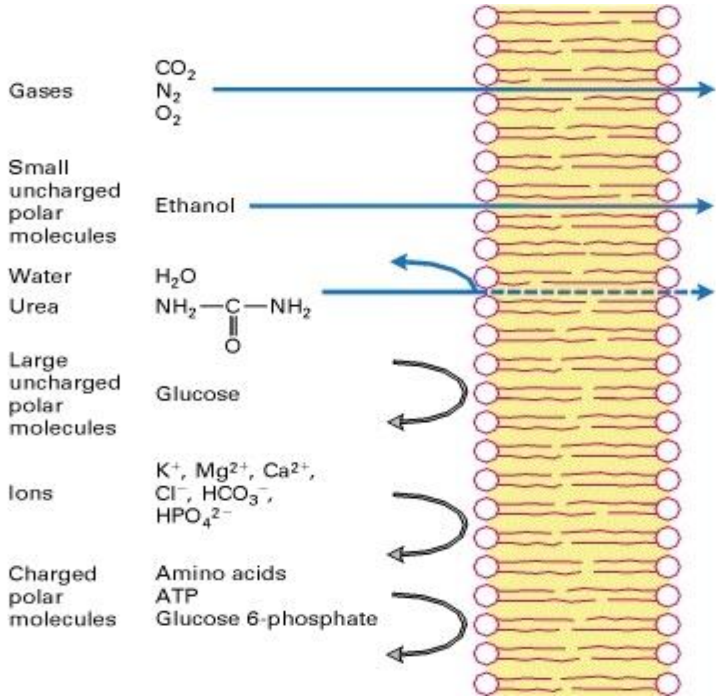
روش هم‌جوشی یا ادغام سلول، روشی دیگر برای نشان دادن سیالیت در غشا است. در این روش، سلول های مختلف در شرایط مناسب آزمایشگاهی با یکدیگر ادغام می‌شوند. فرای در سال ۱۹۷۰ با آزمایش معروفی توانست دو سلول موش و انسان را با هم ادغام کند. قبل از ادغام، غشای هر یک از این دو نوع سلول با رنگ‌های مختلف فلورسانت رنگ‌آمیزی شدند. مشاهده‌ی سلول ها بلافاصله پس از ادغام با میکروسکوپ فلورسانت نشان داد که رنگ هر سلول به شکل نیم‌کره قابل تشخیص بود. با گذشت زمان دو رنگ در سطح سلول پخش و به تدریج درهم ادغام شدند. فرای نتیجه گرفت که پخش رنگ‌ها به علت حرکت مولکول‌های غشا بود. بررسی‌های بعدی نشان داد که سیالیت، ویژه‌ی سلول های ادغام شده نیست و شاخص عمومی غشاها می‌باشد. باید دانست که میزان سیالیت غشاهای مختلف زیستی متفاوت است و به عوامل گوناگون مانند نوع فسفولیپید، مقدار کلسترول و درجه‌ی حرارت محیط بستگی دارد.




شکل ۷- نشان دادن سیالیت غشا با روش هم‌جوشی

## ۱,۷ ترابری مولکول‌های کوچک از غشا

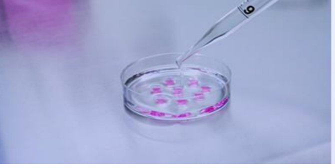
ویژگی‌های ساختاری غشا که در صفحات قبل ارایه شد تعیین کننده‌ی کلیه‌ی اعمالی هستند که توسط غشاهای زیستی انجام می‌گیرند. انتقال مواد و اطلاعات به درون و یا خارج سلول از جمله‌ی این اعمال‌اند. اورتون با استفاده از غشاهای مصنوعی فاقد پروتئین نشان داد که قابلیت نفوذ یک مولکول به درون دو لایه‌ی لیپیدی غشا، به اندازه مولکول و درجه حلالیت آن در لیپید بستگی دارد. هر چه مولکول کوچک‌تر باشد و یا حلالیت آن در لیپید بیشتر باشد، با سرعت بیشتری عبور می‌کند. مولکول‌های کوچک غیر قطبی نظیر اکسیژن با جرم ۳۲ دالتون، به سرعت در غشا حل شده و از آن عبور می‌کنند. مولکول‌های قطبی کوچک بدون بار الکتریکی خالص مثل آب (۱۸ دالتون)، می‌توانند به سرعت از غشا عبور کنند. مولکول‌هایی با جرم مولکولی بیشتر مانند گلیسرول (۹۲ دالتون) با سرعت کمتری عبور می‌کنند و گلوکز که جرم مولکولی آن ۱۸۰ دالتون است به خودی خود از غشا عبور نمی‌کند. مولکول‌هایی که بار الکتریکی خالص دارند نظیر یون‌ها، به هیچ طریقی از دو لایه‌ی لیپیدی خالص فاقد پروتئین عبور نمی‌کنند اما از غشای سیتوپلاسمی که بخش پروتئینی دارد رد می‌شوند. برای تعیین نقش پروتئین‌های غشا در ترابری مولکول-های مختلف، مطالعات جالبی به کمک لیپوزوم‌ها صورت گرفته است. در این مطالعات، پروتئین‌های غشای سلول تخلیص و داخل غشای لیپوزوم قرار داده می شوند و میزان و سرعت انتقال مولکول‌های کوچک نشاندارشده به داخل لیپوزوم اندازه‌گیری می شوند.

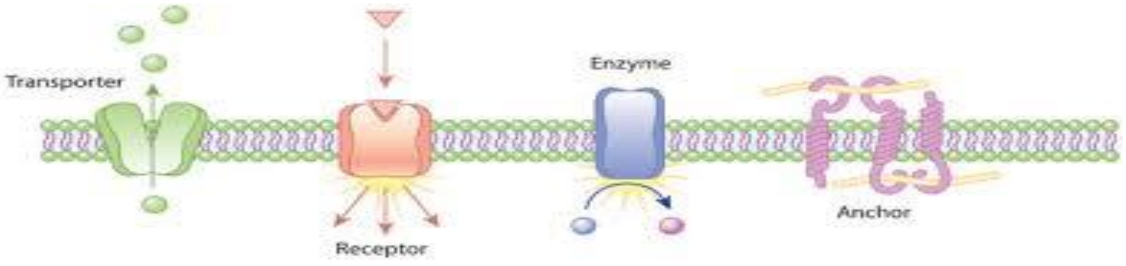



شکل ۸- **قابلیت نفوذ نسبی دو لایه‌ی لیپیدی مصنوعی نسبت به مولکول‌های مختلف**. هر چه مولکول کوچک‌تر باشد و یا کمتر در آب حل شود. سرعت عبور آن از غشا بیشتر است. مولکول‌های بزرگ و یون‌ها از چنین غشایی عبور نمی‌کنند.

این پروتئین‌ها همان پروتئین انتقال دهنده‌ی گلوکز در غشای طبیعی یا پرمئاز گلوکز است. انتقال گلوکز به وسیله‌ی این پروتئین به قدری اختصاصی صورت می‌گیرد که شکل L گلوکز را عبور نمی دهد و تنها شکل D گلوکز را که فرم طبیعی آن است عبور می دهد. عبور سایر قندهای شش کربنی نظیر مانوز و گالاکتوز از غشای لیپوزوم‌هایی که فقط پروتئین پرمئاز گلوکز را داشتند، با سرعت کمتر و تنها زمانی انجام می‌شود که غلظت آنها در محیط بالا باشد. این نتایج عملکرد اختصاصی این پروتئین را بیشتر تائید می کند.انتقال اختصاصی توسط لیپوزوم‌های حاوی یکی نوع پروتئین انتقال دهنده. در این جا پروتئین های سراسر غشای گلبول قرمز به وسیله مواد شوینده حل شده و پروتئین انتقال دهنده گلوکز خالص سازی شده است. این پروتئین سپس در غشای یک لیپوزوم ساخته شده از فسفولیپید قرار گرفته است.

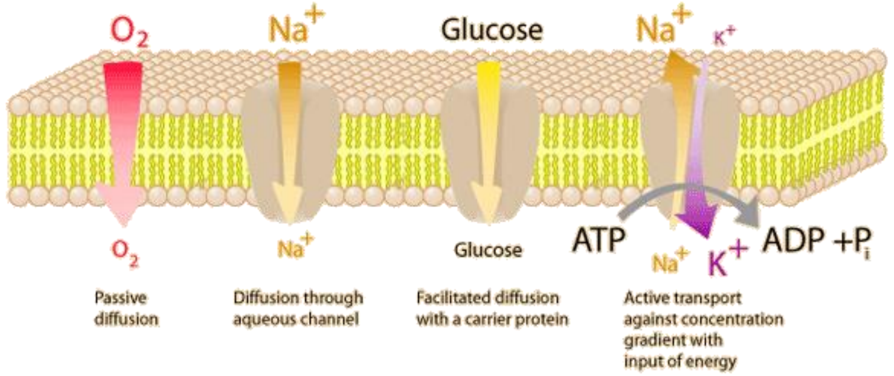
پروتئین‌هایی که انتقال مواد کوچک از غشای سلول را به عهده دارند پروتئین‌های انتقال دهنده نامیده می شوند. به این پروتئین‌ها پرمئاز نیز گویند چون باعث عبور و مرور مواد از غشای سلول می شوند. پرمئازها از پروتئین‌ها در غشا قرار می‌گیرند.این پروتئین‌ها، انتقال مواد را بدون لزوم تماس مستقیم ماده با دو لایه لیپیدی میسر می‌سازند.






شکل ۹- مدلی از یک پروتئین انتقال دهنده که چندین بار در غشای سلول انسانی تا خورده است و عمل انتقال چند دارو را به عهده دارد.

پرمئازهای غشا به دو گروه پروتئین‌های حامل و پروتئین‌های کانالی تقسیم می‌شوند. پروتئین‌های حامل هنگام انتقال مولکول به طور گذرا تغییر شکل یافته و پس از رساندن مولکول به طرف دیگر غشا، آن را رها می‌کنند و به شکل اول خود بر می‌گردند پروتئین‌های کانالی همان‌طور که از نامشان پیداست. کانال‌ها یا منافذ پرآبی ایجاد می‌کنند که در مواقع لزوم باز شده و به مولکول لازم، اجازه‌ی عبور می‌دهند.

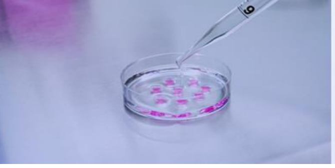



.

شکل۱۰- **تصویر انواع روش‌های انتقال مولکول‌های کوچک از غشای پلاسمایی.** انتقال غیر فعال به صورت‌های انتشار ساده. انتشار تسهیل شده به کمک پروتئین کانالی، انتشار تسهیل شده به کمک پروتئین حامل و انتقال فعال به کمک پروتئین حامل که نیاز به انرژی دارد، دیده می‌شوند. در این شکل نشان داده شده است که انتقال غیرفعال هم به کمک پروتئین‌های حامل و هم پروتئین‌های کانالی صورت می‌گیرد، در حالی که انتقال فعال فقط به کمک پروتئین‌های حامل انجام می‌شود.

انتقال مواد از غشا به دو روش کلی انجام می‌شود، انتقال فعال و انتقال غیرفعال(شکل ۱۰). در انتقال غیر فعال انرژی صرف نمی‌شود در حالی که در انتقال فعال، برای جابجایی مواد به انرژی نیاز است.

انتقال غیر فعال خود از دو طریق انجام می‌شود، انتشار ساده و انتشار تسهیل شده. در انتشار ساده مولکول‌های کوچک آب گریز مانند اکسیژن، و یا آب دوست مثل اتانول پس از حل شدن در دو لایه‌ی فسفولیپیدی غشا، مستقیماً از آن عبور می‌کنند. پروتئین‌های انتقال دهنده در انتقال ساده نقشی ندارند، لذا این روش انتقال اختصاصی نیست. انتشار ساده به غلظت مولکول در دو طرف غشا بستگی دارد و مولکول‌ها از یک طرف غشا که غلظت بالاتری دارند به طرف دیگر می‌روند. این حرکت را انتقال ماده در شیب غلظت آن نیز نامند(شکل ۱۰).



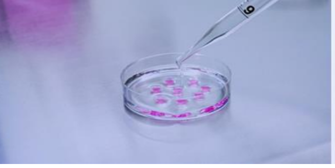
در انتشار تسهیل شده انتقال مولکول‌ها اختصاصی، به وسیله‌ی پروتئین‌های انتقال دهنده و در جهت شیب غلظت صورت می‌گیرد. هر دو گروه پروتئین‌های حامل و کانالی می‌توانند در این نوع انتقال نقش داشته باشند. اگر مولکول فاقد بار الکتریکی باشد، تنها شیب غلظت آن در دو طرف غشا تعیین کننده‌ی جهت انتقال آن است. در صورتی که مولکول دارای بارالکتریکی خالص باشد، مثل یون‌ها، علاوه بر شیب غلظت، پتانسیل غشا نیز در انتقال ماده تأثیر می‌گذارد. پتانسیل غشا، تفاوت بارالکتریکی در دو طرف غشا است. اختلاف غلظت یون‌ها در دو طرف غشا شیب یونی ایجاد می‌کند و در حقیقت میزان پتانسیل الکتریکی غشای سلول به شیب یونی بستگی دارد. ترکیب شیب غلظت و پتانسیل الکترو شیمیایی خاصی را برای هر مولکول ایجاد می‌کند.

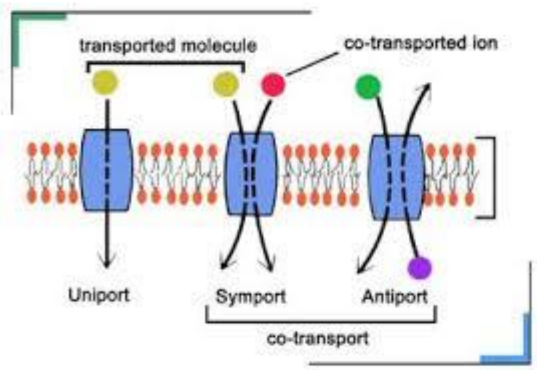
پتانسیل الکتریکی غشا را می‌توان با استفاده از میکرو الکترود اندازه‌گیری کرد. این نوع الکترود قطری به اندازه‌ی یک میکرومتر یا کمتر دارد و می توان آن را از غشا عبور داد. با قرار دادن دو میکرو الکترود یکی در سمت خارجی و دیگر در سمت داخلی غشا، تفاوت بارالکتریکی دو طرف آن را می‌توان اندازه‌گیری کرد. معمولاً اندازه‌گیری پتانسیل غشا هنگام استراحت یا آرامش سلول انجام می‌گیرد. در این زمان هیچ نوع جریان الکتریکی در غشا وجود ندارد. این پتانسیل را پتانسیل الکتریکی آرامش گویند که همیشه عددی منفی است، یعنی داخل سلول نسبت به خارج آن منفی‌تر است. به عنوان مثال، پتانسیل آرامش اندازه‌گیری شده برای غشای سلول های ماهیچه و عصب بین ۵۰ تا ۱۰۰ میلی ولت متغیر است. این پتانسیل ممکن است بسیار ناچیز به نظر آید، اما برای غشایی با ضخامت تنها ۵ نانومتر بسیار قابل ملاحظه است و معادل ولتاژی حدود ۱۰۰۰۰۰ولت در ضخامت یک سانتیمتر است.

## ۱٫۸ انتقال فعال

در انتقال فعال، سلول می‌تواند مولکول خاصی را از محیطی که غلظت آن کمتر است به محیطی که غلظت آن زیاد است، یعنی برخلاف شیب غلظت آن انتقال دهد. این روش نیاز به صرف انرژی دارد و به پمپ کردن نیز مشهور شده است. انتقال فعال معمولاً با استفاده از پروتئین‌های حامل صورت می‌گیرد. انرژی لازم برای انتقال فعال از توأم شدن این واکنش با واکنش انرژی زا در سلول تأمین می‌شود. یکی از واکنش‌های مرسوم انرژی‌زا که با انتقال فعال توأم می‌شود هیدرولیزATP توسط آنزیم ATP آز است. برخی مولکول‌هایATP آز در غشای سلول جای گرفته‌اند. **پمپ سدیم - پتاسیم-ATP آز** یکی از مهمترین مثال‌های پمپ‌هاست که در آن پروتئین های حامل، از انرژی موجود در ATP استفاده می کنند تا یون‌های سدیم و پتاسیم را از غشا عبور دهند.

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 می‌باشد. در نتیجه یون‌های پتاسیم و سدیم باید بر خلاف شیب الکتروشیمیایی خود به ترتیب وارد سلول شده و یا از آن خارج شوند. این فرآیند نیاز به صرف انرژی دارد. در مطالعات انجام شده روی غشای گلبول قرمز در حضور مهار کننده‌یATPآز، انتقال یون سدیم و پتاسیم انجام نگرفت. این آزمایش توأم شدن انتقال فعال این یون‌ها را با هیدرولیز شدنATP نشان می‌دهد. در حقیقت پروتئین‌های حامل یون‌های سدیم و پتاسیم خود فعالیت ATP آزی دارد. در ضمن اختلال در فعالیت پمپ سدیم-پتاسیم در گلبول قرمز و سایر سلول های حیوانی باعث می‌شود که به علت ورود آب، سلول ها متورم و حتی متلاشی شوند. در حقیقت اختلال در فعالیت این پمپ با تغییر در غلظت یون‌ها در داخل سلول و خارج سلول همراه است و بر تعادل فشار اسمزی تأثیر می‌گذارد. بنابراین پمپ سدیم-پتاسیم ATPآز در حفظ فشار اسمزی و در نتیجه حجم سلول، نقش مهمی ایفا می‌کند. پمپ‌های دیگری نیز وجود دارند که در انتقال فعال یون‌های دیگر شرکت دارند و توضیح همه آنها از عهده این کتاب خارج است. اما به عنوان مثال می‌توان پمپ کلسیم را نام برد که در انقباض و انبساط ماهیچه‌ها نقش مهمی دارد. همچنین وجود پمپ پروتونی ($H^+$) در غشای اندامک‌هایی نظیر لیزوزوم و واکوئول در سلول های گیاهی برای پایین نگاه داشتن PH درون این اندامک‌ها ضروری است.






شکل ۱۱- **انتقال مولکول‌ها از غشا. پمپ سدیم- پتاسیم –ATP آز**. این پمپ فعالانه سدیم را به خارج سلول و پتاسیم را به درون آن انتقال می دهد. این عمل بر خلاف شیب الکتروشیمیای این دو یون صورت می‌گیرد. در نتیجه هیدرولیز هر مولکول ATP ، سه یون سدیم به خارج سلول و دو یون پتاسیم به درون سلول منتقل می شوند.

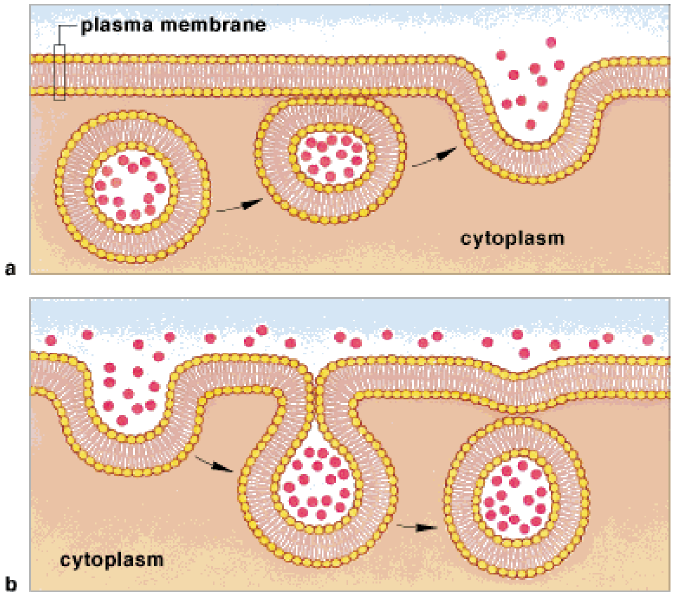
بعضی از پروتئین‌های حامل، یک مولکول را به تنهایی از یک طرف غشا به طرف دیگر می‌برند. پروتئین‌های حامل دیگر می‌توانند دو مولکول متفاوت را همزمان انتقال دهند. انتقال همزمان دو مولکول به دو صورت انجام می‌گیرد. در یک صورت هر دو مولکول با هم به داخل یا خارج سلول می‌روند. در صورت دیگر انتقال همزمان در دو جهت مخالف انجام می‌گیرد، یعنی ضمن خارج شدن یک مولکول، مولکول دیگر وارد سلول می شود.

بعضی از پروتئین‌های حامل، یک مولکول را به تنهایی از یک طرف غشا به طرف دیگر می‌برند. پروتئین‌های حامل دیگر می‌توانند دو مولکول متفاوت را همزمان انتقال دهند. انتقال همزمان دو مولکول به دو شکل انجام می‌گیرد. در شکل اول هر دو مولکول با هم به داخل یا خارج سلول می‌روند. در شکل دوم انتقال همزمان در دو جهت مخالف انجام می‌گیرد، یعنی ضمن خارج شدن یک مولکول، مولکول دیگر وارد سلول می‌شود. 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 وسیله‌ی پروتئین‌های حامل آن با روش انتشار تسهیل شده از خارج به داخل سلول ها وارد می‌شود. نحوه‌ی انتقال گلوکز به داخل سلول های روده و کلیه با نحوه‌ی انتقال آن به اغلب سلول های حیوانی متفاوت است. غلظت گلوکز در محیط روده و لوله‌چه‌های 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 می‌نمایند. بنابراین انتقال گلوکز و سدیم در سلول روده و کلیه موردی از انتقال همزمان دو مولکول در یک جهت است. مثال خوبی برای انتقال همزمان دو مولکول مختلف در جهت‌های مخالف، انتقال فعال یون‌های سدیم و پتاسیم توسط پمپ سدیم-پتاسیم- ATPآز است که قبلاً گفته شد.

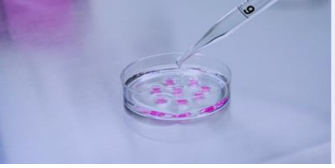
همان‌طور که می‌دانید غلظت مواد غذایی نظیر گلوکز، اسیدهای آمینه و ویتامین‌ها در خون و مایعات بدن موجودات عالی، تنظیم شده است، اما باکتری‌ها در محیط‌های متغیر که غلظت مواد غذایی در آنها معمولاً کم است زندگی می‌کنند. در این شرایط باکتری ها باید مواد مورد نیاز خود را برخلاف شیب غلظت انتقال دهند. بنابراین، سیستم‌های انتقال دهنده ویژه‌ای در باکتری‌ها وجود دارند که انواع مواد غذایی را از محیط جذب می‌کنند. جزییات این سیستم‌های انتقالی در این کتاب ارایه نمی شوند.

## ۱,۹ انتقال ماکرو مولکول‌ها

علاوه بر انتقال مولکول‌های کوچک، غشای سلول برخی از ماکرومولکول‌ها و ذرات بزرگ را نیز به داخل سلول وارد، و یا از آن خارج می‌سازد. نحوه‌ی انتقال ماکرومولکول‌ها از غشای سلول با چگونگی انتقال مولکول‌های کوچک تفاوت دارد. انتقال ماکرومولکول‌ها همیشه توسط کیسه‌های کوچکی از جنس غشا انجام می‌شود که وزیکول نام دارند. در این نوع انتقال، غشای پلاسمایی یا غشای اندامک ماده‌ی خاصی را احاطه کرده و وزیکول ایجاد می شود. این وزیکول‌ها بین غشاها حرکت می‌کنند و پس از رساندن ماده به مقصد، غشای وزیکول در غشای اندامک، غشای پلاسمایی و یا غشای یک وزیکول دیگر ادغام و ماده‌ی منتقل شده رها می‌شود.  مولکول‌های درون وزیکول تا رسیدن به مقصد با سایر قسمت‌های سلولی تماسی ندارند. ادغام غشاها که لازمه‌ی انتقال ماکرومولکول‌هاست به سادگی انجام نمی‌شود و به شرایط خاصی نیاز دارد که مکانیسم آن کاملاً روشن نیست. برای این که دو غشا در هم ادغام شوند ابتدا بایستی به هم نزدیک شوند که خود به صرف انرژی نیاز دارد، زیرا بارهای الکتریکی موجود در سطح غشایی شرایط خاصی را اییجاد می‌کنند که در ادغام غشاها موثراند. خروج مواد توسط وزیکول از سلول را اگزوسیتوز، و ورود آنها را به سلول اندوسیتوز می‌نامند. هر دو فرآیند اگزوسیتوز و اندوسیتوز، انرژی خواه‌اند.




شکل ۱۲- **انتقال ماکرو مولکول‌ها از غشای سلول به روش اگزو سیتوز و اندوسیتوز**. در اگزوسیتوز، وزیکول موجود در ستوپلاسم به غشای پلاسمایی می رود، در آن ادغام می‌شود، و مواد داخل وزیکول به خارج سلول می‌ریزند. در اندوسیتوز، غشای پلاسمایی ایجاد فرورفتگی می‌نماید و پس از در بر گرفتن ماده دو طرف فرو رفتگی بهم می‌رسند و وزیکول ایجاد می‌شود.  این وزیکول سپس ماده را به درون سیتوپلاسم می‌برد.



## ۱,۱۰ اگزوسیتوز

فرآیند اگزوستوز 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 دایمی 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 سلول های ترشح کننده‌ی هیستامین پس از دریافت پیام‌های شیمیایی، هیستامین را از سلول به خارج ترشح می کنند. ترشح هیستامین باعث بروز واکنش‌های حساسیت یا آلرژی نظیر خارش و عطسه می شود.

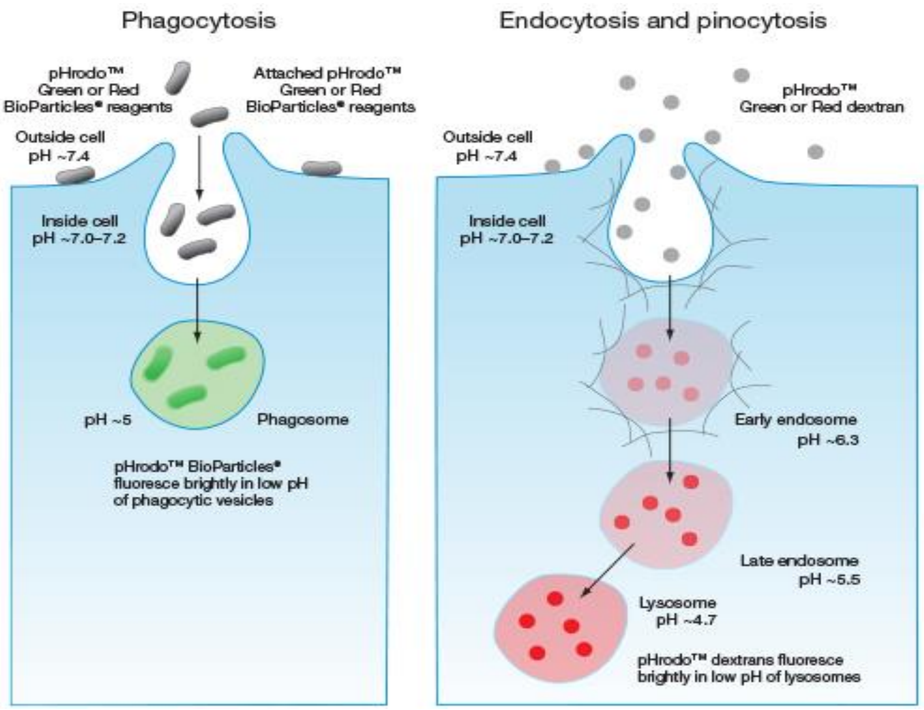
غشای وزیکول‌های حامل مولکول‌ها در اگزوسیتوز از لحاظ جزییات ساختاری با غشای سلول متفاوت می‌باشد. این غشا پس از ادغام با غشای پلاسمایی و خارج کردن محتوای خود به محیط خارج، به وسیله‌ی فرآیند اندوسیتوز مجدداً وارد سیتوزول (به محلول موجود در سیتوپلاسم سیتوزول گفته می شود. در واقع سیتوپلاسم مشتمل است بر سیتوزول و اندامک های سلول) می‌شود و در ساختن وزیکول‌های ترشحی جدید به کار می‌رود. این عمل اهمیت زیادی دارد زیرا در غیر این صورت اندازه‌ی سلول در نتیجه افزایش سطح غشای سیتوپلاسمی، تغییر می‌یافت.

ورود ماکرومولکول‌ها و ذرات بزرگ از محیط خارج به داخل سلول به دو روش صورت می‌گیرد، اندوسیتوز و فاگوسیتوز. اندوسیتوز فرآیندی است که طی آن مایعات، مواد محلول و برخی ماکرومولکول‌های معلق به وسیله‌ی وزیکول‌هایی با قطر حدود ۱۵۰ نانومتر، وارد سلول می‌شوند. اندوسیتوز به دو شکل غیر اختصاصی و اختصاصی انجام می‌گیرد.

در اندوسیتوز غیر اختصاصی، مایع خارج سلول توسط وزیکول‌های کوچک وارد سلول می‌شود. هر مولکول بزرگ یا کوچک موجود در این مایع، می‌تواند به این طریق وارد شود. اندوسیتوز غیر اختصاصی احتمالاً به صورت دایمی در انواع سلول ها انجام می‌شود. در اندوسیتوز اختصاصی، ماکرومولکول‌ها پس از اتصال به گیرنده‌ی خاص خود در سطح سلول به وسیله‌ی وزیکول‌های اندوزومی وارد سلول می‌شوند. اندوسیتوز از طریق گیرنده مکانیزمی برای جذب اختصاصی ماکرومولکول‌هایی که غلظت آنها در مایع خارج سلولی کم است، فراهم می‌سازد. گیرنده‌ها عمدتاً پروتئینی هستند و هر کدام گرایش بالایی برای ماکرومولکول خاصی دارد. مولکولی که به گیرنده متصل می‌شود لیگاند نام دارد. هر لیگاند فقط توسط گیرنده‌ی خاص خود وارد سلول می‌شود.

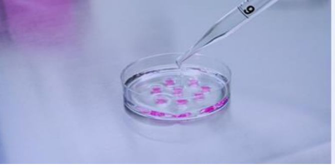
استفاده از روش انجماد و ترک دادن سلول و بررسی غشای پلاسمایی با میکروسکوپ الکترونی، فرورفتگی‌هایی را در سطح خارجی غشا نمایان ساختند. این فرورفتگی تیره‌تر و ضخیم‌تر از بقیه‌ی قسمت‌های غشا دیده می‌شوند و به اینها فرو رفتگی‌های پوشش‌دار گویند. مطالعات متنوعی نشان داده‌اند که فرورفتگی‌های پوشش‌دار محل تشکیل وزیکول‌های اندوزومی هستند. وزیکول‌های اندوزومی حاصل از این فرورفتگی‌ها را وزیکول‌های پوشش‌دار می‌خوانند. خالص سازی و مطالعه‌ی وزیکول‌های پوشش دار نشان داده‌اند که پوشش بیرونی غشای وزیکول، پروتئین‌های خاصی دارد که یکی از مهمترین آنها کلاترین نام دارد.

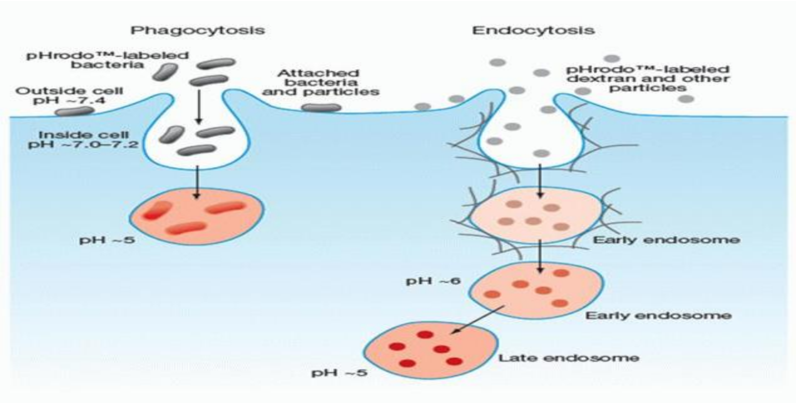
توجه داشته باشید که انتقال مواد به روش اندوسیتوز چه به صورت اختصاصی و چه به صورت غیر اختصاصی، هر دو می‌توانند از محل فرورفتگی‌ها پوشش‌دار انجام شوند. علاوه بر این وزیکول‌های پوشش دار از غشای اندامک‌ها نیز مشتق می‌شوند و ماکرومولکول‌ها را بین اندامکهای مختلف منتقل می‌کنند.




شکل ۱۳- **فرآیندهای فاگوسیتوز و اندوسیتوز.** اندوسیتوز هم به صورت غیر اختصاصی و هم به صورت اختصاصی توسط. گیرنده‌های سطح سلول صورت می‌گیرد.  این شکل دو بعدی رسم شده است، اما در تصویر سه بعدی مولکول ها یا ذرات کاملاً احاطه می‌شوند.

در اندوسیتوز اختصاصی، لیگاند به گیرنده‌های خاص خود متصل و  ترکیب‌های لیگاند- گیرنده که در محل فرو رفتگی‌های پوشش‌دار قرار دارند به داخل سلول منتقل می‌شوند. بیش از ۲۵ گیرنده‌ی مختلف در غشا شناسایی شده‌اند که از طریق فرو رفتگی‌های پوشش‌دار مولکول‌ها را به داخل سلول منتقل می‌کنند. بیشترین مورد مطالعه شده از اندوسیتوز اختصاصی، انتقال کلسترول به داخل سلول حیوانی است. سلول حیوانی برای ساختن غشای جدید به کلسترول نیاز دارد. کلسترول در خون اکثراً در ترکیب لیپوپروتئینی به نام LDL (لیپو پروتئین با چگالی کم) حمل می‌شود. در سطح سلول، گیرنده باری LDL وجود دارند. LDL  به گیرنده خود در سطح سلول متصل می‌شود و به وسیله‌ی وزیکول پوشش‌دار وارد سلول می‌شود. در داخل سلول، پوشش وزیکول جدا می‌شود و وزیکول به لیزوزوم می‌رود. در لیزوزوم کلسترول از گیرنده جدا و برای ساختن غشا جدید به سیتوپلاسم منتقل می‌شود. پوشش وزیکول و گیرنده‌ی لیگاند LDL نهایتاً به غشای پلاسمایی بر می‌گردند. اندوسیتوز LDL به وسیله‌ی گیرنده‌ی خاص آن در سطح سلول. گیرنده‌ی LDL در غشا حرکت می کنند تا در ارتباط با فرو رفتگی پوشش‌دار قرار گیرند. ترکیب- LDL به وسیله‌ی وزیکول‌های پوشش‌دار وارد سیتوپلاسم می‌شود.

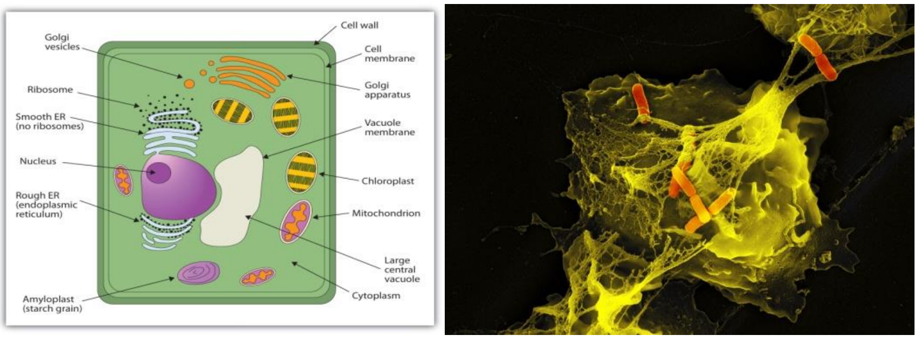





شکل ۱۴- فاگوسیتوز و اندوسیتوز

فاگوسیتوز که ریزه‌خواری یا ذره‌خواری نیز نامیده شده است، باعث انتقال ذرات به داخل سلول می‌شود. در فاگوسیتوز ابتدا غشای پلاسمایی با حرکت به دور ذره، پاهای کاذب تشکیل می‌دهد، ذره را احاطه می‌کند و وزیکولی که فاگوزوم نام دارد، تشکیل می‌دهد. اندازه‌ی فاگوزوم‌ها به اندازه‌ی ذره بلع شده بستگی دارد و عموماً خیلی بزرگتر از وزیکول‌های اندوزومی است. فاگوزوم‌های حاصل معمولاً به لیزوزوم‌ها می‌روند، در غشای آنها ادغام می‌شوند و محتوای خود را برای هضم به درون لیزوزوم‌ها می‌ریزند.

سلول هایی که عملاً فاگوسیتوز را انجام می‌دهند، عبارت اند از تک‌یاخته‌های یوکاریوتی مثل آمیب‌ها و برخی گلبول‌های سفید خونی مانند نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها در پستانداران. در تک‌یاخته‌ها، فاگوسیتوز همچون اندوسیتوز به منظور تغذیه ارگانیسم 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 سلول های صدمه دیده، مثل گلبول‌های قرمز که عمر کوتاهی دارند، از وظایف مهم سلول های ریزه‌خوار در این جانداران است.




شکل ۱۵- تصویر میکروسکوپ الکترونی از یک نوتروفیل که در حال فاگوسیتوز یک باکتری در حال تقسیم است.

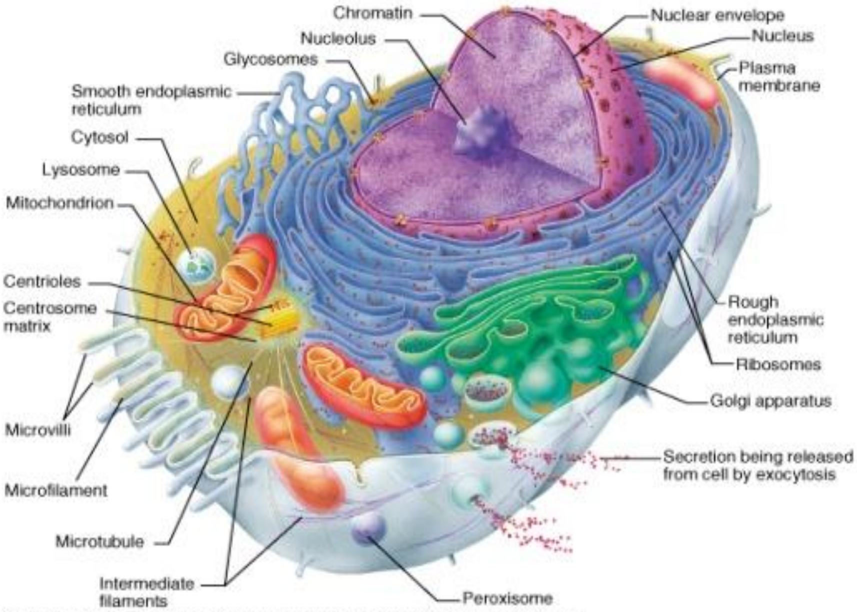
## ۱٫۱۱ اندامک‌ها: هسته، میتوکندری

ساختار درونی سلول پس از شناسایی رنگ‌های مناسب در اواخر قرن نوزدهم تشخیص داده شد. استفاده از این رنگ‌ها تفاوت کافی را برای مشاهده‌ی ساختارهای درونی سلول به وجود آورد (توجه داشته باشید که برای مشاهده ی اندامک های درون سلول، این اندامک ها باید رنگ های متفاوتی داشته باشند که بتوان تفاوت آن ها را از هم تشخیص داد). به دنبال آن با استفاده از روش-های گوناگون جداسازی اندامک‌ها و روش‌های میکروسکوپی پیشرفته‌تر، اجزای سلول با دقت بیشتری مورد مطالعه قرار گرفتند.

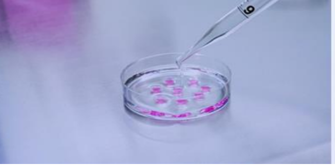
مطالعات نشان دادند که ساختار درونی سلول های یوکاریوتی از سلوهای پروکاریوتی پیچیده‌تر است. علاوه بر هسته، اندامک‌های متمایز دیگر نیز در سیتوپلاسم سلول های یوکاریوتی موجود هستند مانند کلروپلاست و میتوکندری. این سه اندامک در این فصل و دیگر اندامک‌ها در فصل بعدی مورد بررسی قرار می‌گیرند. هسته، میتوکندری و کلروپلاست هر سه توسط دو غشا احاطه شده‌اند. میتوکندری در اغلب سلول های یوکاریوتی موجوداند، در حالی که کلروپلاست فقط در سلول های گیاهی یافت می‌شوند.

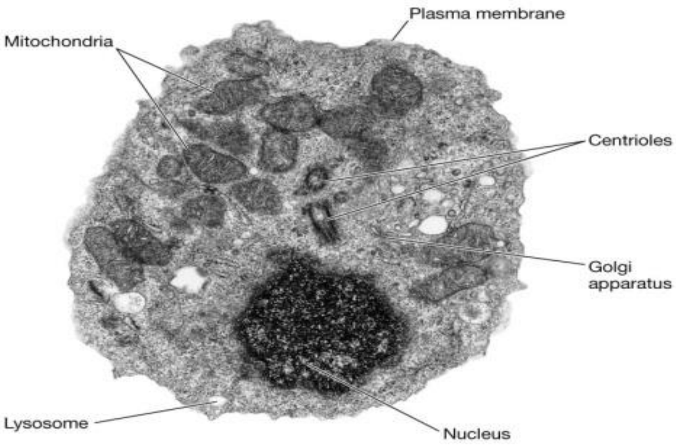
## ۱٫۱۲ هسته

چنانچه می‌دانید جانداران بر اساس وجود یا عدم وجود هسته مشخص در سلول هایشان به دو گروه اصلی یوکاریوت و پروکاریوت طبقه بندی می‌شوند. در سلول یوکاریوتی، هسته معمولاً حدود ۱۰ درصد از حجم سلول را اشغال می‌کند و جایگاه ماده‌ی ژنتیک سلول است. از این رو هسته نقش محوری در تنظیم فعالیت‌های سلول دارد. علاوه بر ماده ژنتیک قسمت‌های مختلف هسته عبارتند از غشای خارجی، غشای داخلی، فضای بین غشایی، نوکلئوپلاسم و ماده‌ی زمینه ای هسته. غشای خارجی هسته با سیتوزول در تماس است و غشای داخلی در تماس با محتویات درون هسته است. غشای خارجی هسته با غشای شبکه‌ی اندوپلاسمی مشابهت دارد و مانند آن، ریبوزوم‌هایی بر روی غشای خارج هسته قرار دارند. در واقع غشای خارجی هسته در امتداد شبکه‌ی اندوپلاسمی است.



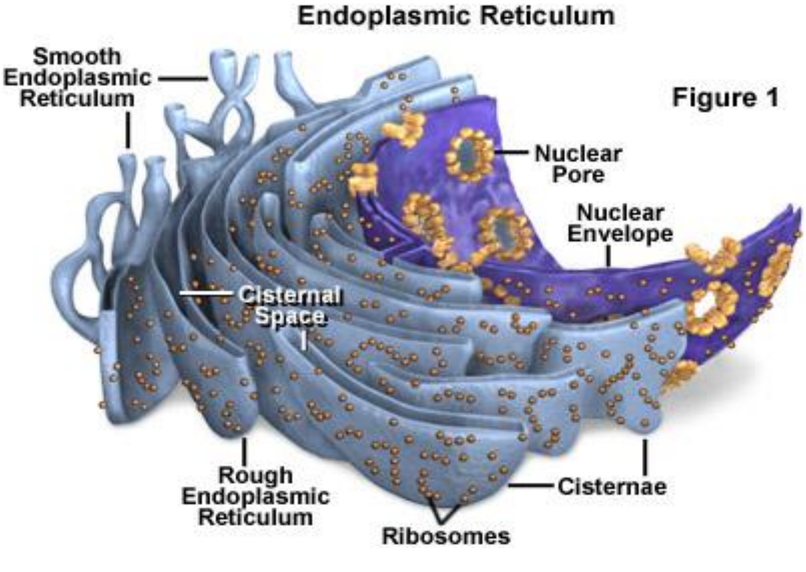

Copyright © 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.



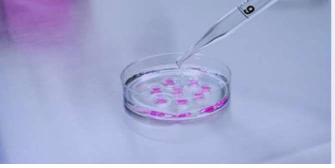



شکل ۱۶- ساختار سلول جانوری
الف- تصویر شماتیک از سلول جانوری
ب- ریزنگار الکترونی از بخشی از سلول جانوری

غشای داخلی هسته دارای پروتئین‌های اختصاصی است که جایگاه اتصال پروتئین‌هایی به نام لامین می‌باشد. پروتئین‌های لامین با کروزوم‌ها و RNAهای هسته‌ای در تماس‌اند. 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 هسته‌ای بوجود می‌آورند. این منافذ ساختارهای پیچیده‌ای هستند که محل تردد مولکول‌ها بین سیتوزول و هسته می‌باشند. مایع درون هسته را نوکلئوپلاسم می‌نامند. نوکلئوپلاسم دارای پروتئین‌های متعددی است که در انجام اعمال منحصر به فرد هسته نقش ایفا می‌کنند. این پروتئین‌ها شامل هیستون‌ها، DNA، RNA پلی‌مرازها، پروتئین‌های تنظیم کننده ژن‌های پردازش کننده‌ی RNA و پروتئین‌های ریبوزومی می‌باشند.




شکل ۱۷- **تصویر سه بعدی از غشای دو لایه که هسته را احاطه می‌کند**. غشای هسته توسط منافذی با سیتوزول در ارتباط است و در امتداد شبکه‌ی اندوپلاسمی می‌باشد.

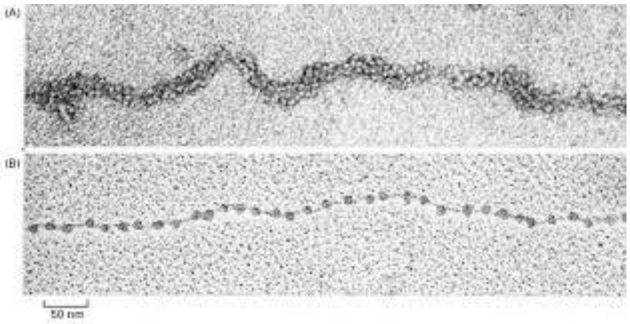


این سوال مطرح است که آیا درون هسته، اسکلت یا ماده‌ی زمینه‌ای مشابه با اسکلت سلولی موجود در سیتوپلاسم وجود دارد یا خیر. پس از استخراج مواد گوناگون از هسته، ماده ای نامحلول باقی می‌ماند. این ماده دارای پروتئین‌هایی است که توانایی اتصال به توالی‌های خاصی از DNA را دارند. دانشمندان باور دارند که ماده‌ی نامحلول، ماده زمینه‌ای یا داربست هسته‌ای است. جزییات 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.

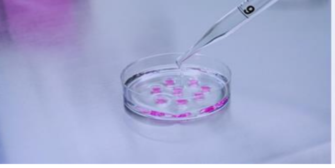
کشف DNA به یک قرن قبل بر می‌گردد. در آن زمان پزشک سوئیسی به نام مایشر گلبول‌های سفید موجود در چرک را تحت تأثیر اسید کلریدریک قرار داد و هسته‌ی آنها را جدا کرد. اضافه کردن محلول قلیایی به هسته‌ی جدا شده باعث تشکیل رسوبی شد و تجزیه‌ی شیمیایی رسوب نشان داد که شامل کربن، هیدروژن، نیتروژن و درصد قابل ملاحظه‌ای فسفر است. وی این ماده را نوکلئین نامید که بعداً با تشخیص اسیدی بودن آن به اسید نوکلئیک تغییر یافت.

همزمان با مطالعات مایشر، فلمینگ با استفاده از میکروسکوپ نوری و رنگ آمیزی سلول ها، اجسام رشته‌ای شکلی را در هسته مشاهده نمود و آنها را کروماتین نامید. کروم به زبان لاتین به معنی رنگ است. به زودی زاکاریاس دریافت که واکنش کروماتین نسبت به محلول‌های اسیدی و قلیایی مشابه نوکلئین است. او نتیجه‌گیری کرد که که نوکلئین و کروماتین از مواد مشابه درست شده‌اند. وی تا حدوی درست فکر می‌کرد زیرا کروماتین دارای DNA متصل به پروتئین است.

امروزه کروماتین به ساختاری متشکل از DNA و پروتئین که در دوره‌ی اینترفاز چرخه سلولی موجود است، گفته می شود. کروماتین شکل فعال ماده‌ی ژنتیک است، به این معنی که فرآیندهای همانند سازی و رونویسی در دوره‌ی اینترفاز بر روی کروماتین انجام می‌گیرند. کروماتین رشته‌های بسیار باریکی است که فقط با میکروسکوپ الکترونیکی قابل مشاهده می‌باشد. طول DNA تخلیص شده از کروماتین به مراتب بیشتر از قطر هسته است و از این رو برای قرار گرفتن در آن می‌باید پیچ و تاب‌هایی بخورد تا فشرده‌تر شود. این فشردگی در چندین مرحله انجام می‌گیرد و حداکثر فشردگی در زمان تقسیم سلول اتفاق می‌افتد که منجر به تشکیل کروموزوم‌های قابل مشاهده با میکروسکوپ نوری می‌شود.



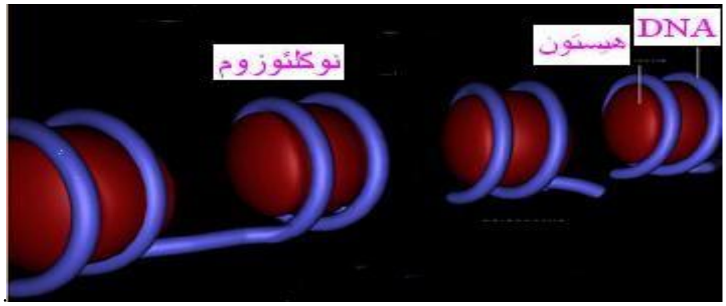

شکل ۱۸- **ریزنگار الکترونی از نوکلئوزوم**. دانه‌ها نوکلئوزوم‌ها هستند و رشته‌ی باریک بین آنها DNA است. نوکلئوزوم‌ها به شکل دانه‌های تسبیح مشاهده می‌شوند.



همان‌طور که قبلاً اشاره شد بیش از ۵۰ درصد جرم کروماتین را پروتئین‌ها تشکیل می دهند. هیستون‌ها که بخش اعظم این پروتئین‌ها هستند در ایجاد فشردگی کروماتین نقش مهمی دارند. پنج نوع پروتئین هیستون به نام های H1، H2A، H2B، H3 و H4 وجود دارند. این پروتئین ها جرم مولکولی کم و بارالکتریکی مثبت دارند. توالی آمینو اسیدها در هیستون‌ها بیش از هر گروه دیگر پروتئین‌ها طی تکامل حفظ شده است. به عنوان مثال تفاوت هیستون $H_4$ در گاو و نخود فقط در دو اسیدآمینه از ۱۰۲ اسیدآمینه می‌باشد. حفظ توالی اسیدهای‌آمینه در سلسله‌ی تکامل جانداران نشان دهنده‌ی اهمیت این پروتئین ها برای بقای سلول است. آنزیم RNA پلی مراز و پروتئین‌های تنظیم کننده‌ی بیان ژن‌ها از دیگر پروتئین‌های موجود در کروماتین هستند.

## ۱,۱۳ نوکلئوزوم

برای پی بردن به ساختار کروماتین پژوهشگران آن را تحت تأثیر آنزیم‌های تجزیه‌کننده‌ی DNA قرار دادند. محصول بدست آمده از این تجزه واحدهایی یکسان متشکل از DNA و پروتئین بودند. در ضمن در مطالعه دیگری، کروماتینی که مقداری از پروتئین‌های آن طی تیمارهای خاص برداشته شده بود، زیر میکروسکوپ الکترونیکی مشاهده شد و تصویر معروف دانه‌های تسبیح به دست آمد. در بررسی‌هایی که پس از این تحقیقات صورت گرفت مشخص شد که واحدهای حاصل از تجزیه‌ی آنزیمی کروماتین، همان دانه‌های تسبیح تصویر فوق‌الذکر بودند. اکنون می‌دانیم که هر یک از این دانه‌ها که نوکلئوزوم نامیده شده‌اند از DNA پیچیده به دور ترکیب هیستونی تشکیل شده است و در حقیقت این اولین مرحله از مراحل فشردگی DNA در هسته ی سلول است. در اینجا تجزیه بر روی کروماتینی که به شکل دانه‌های بند کشیده درآمده است انجام می‌گیرد. در اثر تجزیه با نوکلئاز، DNA رابط بین نوکلئوزم‌ها تجزیه و دانه‌های نوکلئوزومی حاصل می‌شوند. ضخامت دانه‌ها ۵۵ انگستروم و قطر آنها ۱۱۰ انگستروم است. مولکول DNA در هر نوکلئوزوم حدود دو دور به دور ترکیب پروتئینی می‌پیچد و در محلول‌هایی با غلظت زیاد نمک، بخش DNA نوکلئوزوم از ترکیب پروتئینی جدا می‌شود. طول DNA که ترکیب پروتئینی را احاطه می‌کند ۱۴۶ جفت نوکلئوتید است و ترکیب پروتئینی از ۸ مولکول هیستون تشکیل شده است (از هیستون های H2A، H2B، H3 و H4 هرکدام دو تا). هیستون H1 نیز در کروماتین در مجاورت دانه‌های نوکلئوزومی وجود دارد که در این شکل نشان داده نشده است

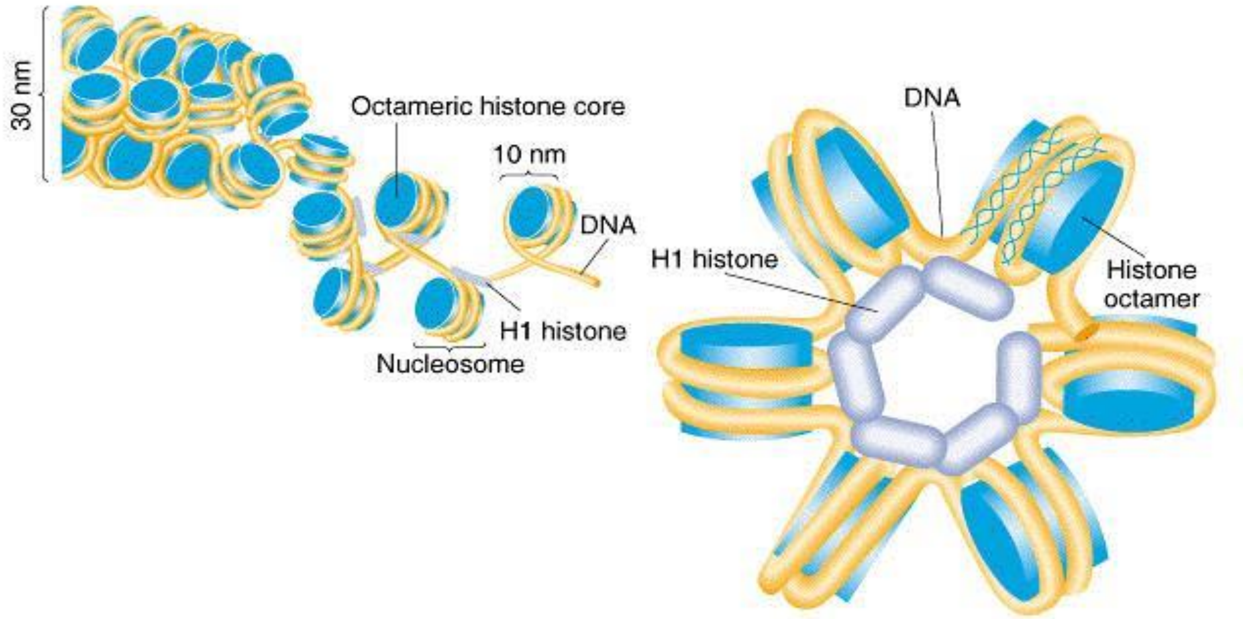



شکل ۱۹- بررسی ساختار نوکلئوزوم با تجزیه آنزیمی کروماتین

رشته‌ی DNA در فواصل منظم حدود دو بار به دور ترکیب پروتئین‌های هیستونی می‌پیچد و نوکلئوزوم را ایجاد می‌کند. طول DNA در هر نوکلئوزوم ۱۴۶ جفت نوکلئوتید و فاصله بین دو نوکلئوزوم مجاور حدود ۶۰ جفت نوکلئوتید است. در حقیقت آنزیم-های تجزیه کننده DNA در فواصل بین نوکلئوزوم‌ها تأثیر می‌گذارد و باعث تشکیل واحدهای یکسان فوق الذکر می‌شوند. DNA موجود در نوکلئوزوم‌ها به علت ارتباط با پروتئین‌ها از اثر آنزیمی محفوظ می‌ماند.

پیچش DNA به دور ترکیب هیستونی باعث فشردگی DNA به میزان ۶ برابر می‌شود، یعنی ۶ میکرون از مارپیچ DNA به طول یک میکرون رشته‌ی نوکلئوزومی در می‌آید. البته فشردگی DNA در کروماتین از حد ذکر شده نیز بیشتر می‌شود که جزییات آن شناخته نشده است .حداکثر فشردگی در DNA در دوره‌ی تقسیم سلولی ایجاد می‌شود، زمانی که کروماتین به شکل کروموزوم دیده می‌شود.

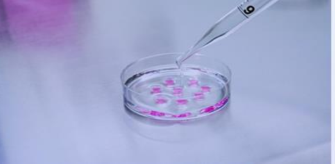
قبل از پایان بحث درباره کروماتین، اشاره به هستک لازم به نظر می‌رسد. هستک اولین ساختار هسته بود که با میکروسکوپ نوری در اغلب سلول های گیاهی و جانوری در قرن نوزدهم مشاهده شد. سال‌ها برداشت های مختلف در مورد نقش هستک در سلول وجود داشت، اما اکنون می‌دانیم که این ساختار محل تجمع ژن‌های رمزگردان RNA های ریبوزومی و تشکیل ریبوزوم‌ها می‌باشد.  توضیح بیشتر در مورد هستک در اینجا لازم به نظر نمی‌رسد.



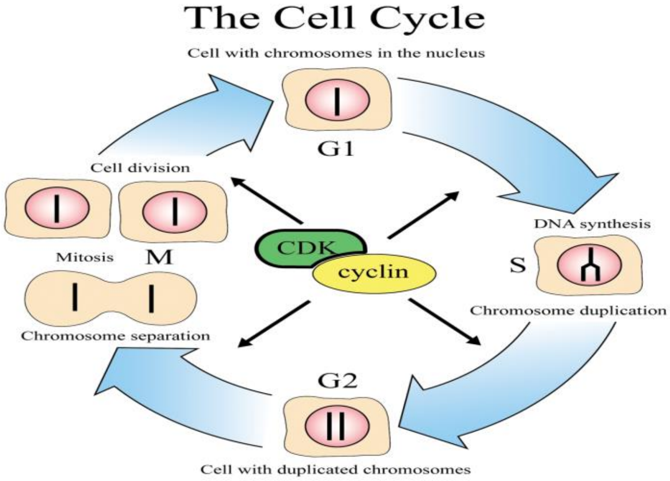

شکل ۲۰- **طرحی برای مرحله‌ی فشردگی کروماتین بعد از پیچش DNA به دور ترکیب پروتئین در نوکلئوزوم**. طبق این طرح فشردگی بیشتر DNA در اثر پیچش فنر مانند رشته‌ی حاوی نوکلئوزوم‌ها حاصل می‌شود.

## ۱٫۱۴ هسته‌زایی

تکثیر سلول ها با مضاعف شدن محتویات آنها و سپس تقسیم آنها به دو سلول صورت می‌گیرد. در حیوانات و گیاهان عالی پس از رسیدن به بلوغ، باز هم تقسیم سلولی انجام می‌شود تا سلول های جدید جایگزین سلول های صدمه دیده و از بین رفته یا سلول های پیر که دیگر کارایی لازم را ندارند، شوند. یک انسان بالغ در هر ثانیه چندین میلیون سلول جدید می‌سازد. در تقسیم سلول مضاعف شدن هسته از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. وقایعی که در هسته رخ می‌دهند مشخص کننده‌ی مرحله‌ی میتوز (یا میوز در سلول های جنسی) و اینترفاز در چرخه سلولی می باشند.



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. دوره‌ی تقسیم همان دوره‌ی میتوز (یا میوز برای سلول های جنسی) است و معمولاً بخش کوچکی از چرخه ی سلولی را تشکیل می‌دهد. فاصله‌ی بین دو تا چرخه سلولی را اینترفاز می گویند.




شکل ٢١- چرخه‌ی سلول یوکاریوتی

فرآیند متابولیسمی، ژنتیک و رشد سلول اغلب در دوره‌ی اینترفاز رخ می‌دهند. این دوره بخش اعظم چرخه سلول را در اکثر سلول ها تشکیل می‌دهد. در آستانه تقسیم سلول، کروماتین متراکم شده، به صورت کروموزم در آمده، و در نهایت کروموزوم‌ها طی روند میتوز یا میوز بین دو سلول دختر تقسیم می‌شوند.

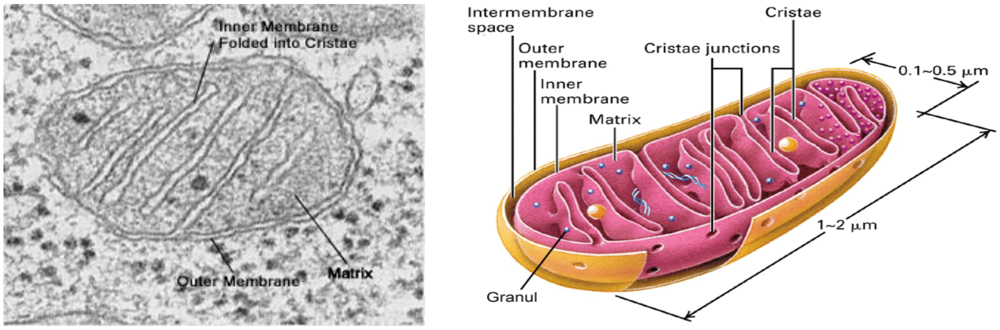
هنگام تقسیم هسته در اکثر جانداران، غشای هسته ناپدید شده و پس از تقسیم هسته مجدداً ظاهر می‌شود. بررسی‌های انجام شده با میکروسکوپ الکترونی نشان داده‌اند که همزمان با به وجود آمدن کروموزوم ها، غشای هسته به وزیکول‌های کوچکی که از شبکه‌ی اندوپلاسمی قابل تمیز دادن نمی‌باشند تجزیه می‌شود. فسفریله شدن پروتئین‌های لامین در این امر نقش ایفا می‌کند. تخریب و تشکیل مجدد غشای هسته طی چرخه‌ی سلولی. در اوایل میتوز لامین‌ها فسفریله می‌شوند و غشای هسته به وزیکول-های کوچک تبدیل می‌شود. در اواخر میتوز، مجدداً غشایی کروموزوم‌ها را در بر می‌گیرد. زمان و چگونگی تشکیل منافذ در غشای هسته نا معلوم است.

پس از رسیدن کروموزم‌ها 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 می کنند. 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 می شوند. نحوه‌ی اثر پروتئین‌های لامین بر تجزیه و تشکیل مجدد غشای هسته مشخص نیست. پس از تقسیم هسته، سیتوپلاسم و محتویات آن نیز تقسیم می شوند و به این ترتیب دو سلول دختر حاصل می‌شوند.

## ۱٫۱۵ میتوکندری

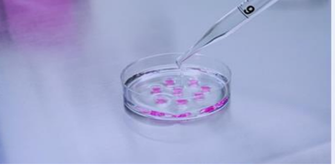
میتوکندری اولین بار در  قرن نوزدهم مشاهده شد، ولی پیشرفت واقعی در فهم عمل آن پس از ابداع روش‌های جداسازی بخش-های مختلف سلول ها صورت گرفت. بیشتر بررسی‌های بیوشیمیایی بر روی میتوکندری‌های سالم خالص شده از سلول های کبدی انجام گرفت. هر سلول کبدی دارای ۱۰۰۰ تا ۲۰۰۰ میتوکندری است.

میتوکندری‌ها تقریباً ۲۵ درصد از حجم سیتوپلاسم اغلب سلول های 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 ۲۲ یک میتوکندری را نشان می دهد. به تیغه‌های غشای داخلی میتوکندری توجه کنید.




شکل ۲۲- ساختار میتوکندری.

میتوکندری ها شبیه به باکتری های میله‌ای شکل هستند، قطری بین ۰/۵ تا یک میکرومتر و طولی حدود ۱ تا ۲ میکرو متر دارند. این اندامک پس از هسته، واکوئل و کلروپلاست بزرگترین ساختار داخلی سلول است. میتوکندری دارای دو غشای داخلی و خارجی، فضای بین غشایی و ماده‌ی زمینه است. تخلیص قسمت های مختلف میتوکندری امکان بررسی پروتئین ها و سایر ماکرومولکول های آنها را میسر ساخت. ضمناً این امکان به وجود آمد که اعمال و واکنش‌های گوناگون میتوکندری به قسمت های خاصی از آن نسبت داده شوند. مشخص‌ترین ویژگی‌های ساختاری غشای داخلی میتوکندری، تاخوردگی متعددی به نام تیغه است. این تیغه ها باعث افزایش قابل توجهی در سطح غشا می شوند، که اهمیت زیادی در واکنش‌های تنفسی دارد. ضمناً این تیغه‌ها در سلول های 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 سلول های ماهیچه‌ای قلب و اسکلتی سه برابر تیغه‌های میتوکندری‌های سلول های کبدی می‌باشد. این به علت آن است که سلول های ماهیچه‌ی قلب و اسکلت نیاز بیشتری به ATP دارند. در ضمن با گرفتن تصویرهای پشت سرهم از سلول های زنده، مشخص شده است که میتوکندری‌ها در مکان‌هایی که مصرف ATP در آنجا زیاد است متراکم‌اند.  به عنوان مثال، آنها در اطراف تاژک اسپرم با تراکم بالا دیده می‌شوند. غشای داخلی پروتئین‌هایی با سه نوع عملکرد دارد. این پروتئین‌ها عبارتند از پروتئین‌هایی که واکنش‌های اکسایشی زنجیره‌ی تنفسی را انجام می‌دهند، مجموعه‌ی آنزیمی که در تشکیل ATP در ماده زمینه نقش دارد و پروتئین‌های ناقل که عبور متابولیت‌ها را به داخل ماده‌ی زمینه و از ماده زمینه به خارج تنظیم می‌کنند. فضای بین غشای خارجی و داخلی فضای بین غشایی نام دارد. در فضای بین غشایی آنزیم‌های متعددی وجود دارند که پیش‌سازهای لازم برای همانندسازی ژنوم میتوکندری را تأمین می‌کنند. ماتریکس یا ماده‌ی زمینه‌ی میتوکندری حاوی مخلوط بسیار غلیظی از صدها آنزیم است که برخی



از آنها در تبادلات انرژی درسلول نقش دارند. ماده‌ی زمینه همچنین دارای چندین نسخه مشابه از ژنوم میتوکندری، ریبوزوم‌های میتوکندری، tRNAها و مولکول های دیگر که در بیان ژن‌های میتوکندری نقش دارند، می‌باشد.

## ۱،۱۶ 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 سازیDNA، 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، DNAپلی مراز، RNA پلی مراز و tRNAهای خاص میتوکندری وجود دارند. DNA میتوکندری دراغلب موجودات حلقوی است، در حالی که در پارامسیوم و جلبک سبز DNA میتوکندری خطی می باشد. میتوکندری ها معمولاً نسخه های متعددی از مولکول‌های DNA یکسان دارند. جایگاه DNA در ماده‌ی زمینه میتوکندری و بعضی مواقع چسبیده به غشای داخلی میتوکندری است. ژنوم میتوکندری سلول های اغلب جانوران از ۱۵-۲۰ هزار جفت نوکلئوتید تشکیل شده است و در پستانداران حدود $۱۰^{-۵}$ برابر کوچکتر از ژنوم هسته‌ای است. ژنوم میتوکندری سلول های گیاهی ۱۰-۱۵۰ بار بزرگتر از ژنوم میتوکندری در سلول های جانوری است. از جمله محصولاتی که توسط DNA میتوکندری رمز می-شوند، RNA های ریبوزومی میتوکندری، tRNA ها و برخی از پروتئین های مسیر تنفس می‌باشند. ضمناً بسیاری از پروتئین هایی که در میتوکندری فعالیت دارند در هسته رمز می‌شوند و پس از ساخته شدن بر روی ریبوزوم‌های سیتوزول وارد اندامک می-شوند.

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 مندل پیروی نمی‌کند و نحوه‌ی انتقال آنها به صورت توارث مادری یا توارث سیتوپلاسمی است. این نوع وراثت تنها از طریق سیتوپلاسم فراوان سلول های 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 پیچش صدف در حلزون است. در گیاهان عالی نیز DNA میتوکندری منحصراً به طریق تک والدی و از تخمک به ارث می‌رسد نه از گرده.

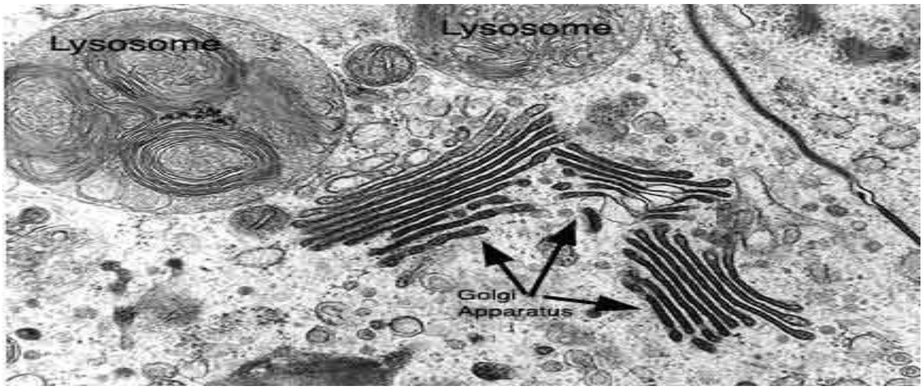
## ۱،۱۷ قسم بندی

همان‌طور که قبلاً ذکر شد، غشای درون سلولی، اندامک‌های سلول را احاطه و آنها را از سیتوزول متمایز می‌سازد. وجود غشاهای درون سلولی سطح بزرگتری را برای انجام واکنش‌های زیستی فراهم می‌کنند. به علاوه غشا اندامک‌های متفاوت با داشتن ساختار و آنزیم‌های خاص خود، اندامک‌ها را برای انجام فعالیت‌های مختلف زیستی مناسب می‌سازند. در سلول یوکاریوتی، ماکرومولکول‌هایی نظیر پروتئین، لیپید و اسیدهای نوکلئیک پس از ساخته شدن به بخش‌های متفاوت سلول توزیع می‌شوند و در جایگاه مناسب خود قرار می‌گیرند. چگونگی این توزیع، موضوع مبحث قسم‌بندی در زیست‌شناسی سلول است.

پروتئین‌ها نقش اساسی در تعیین فعالیت بخش‌های گوناگون سلول را دارند و لذا قسم‌بندی این ماکرومولکولها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در هر سلول پستانداران حدود ۱۰ میلیارد $(۱۰^{۱۰})$ مولکول پروتئین موجود است که حدوداً ۱۰۰۰۰ نوع پروتئین

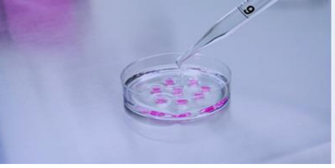
تشکیل می‌دهند. اغلب این پروتئین‌ها در سیتوزول ساخته می‌شوند و سپس هر مولکول به محل خاص خود منتقل می‌شود. چگونگی حرکت پروتئین‌ها درشبکه‌ی اعجاب‌آور غشاهای درون سلولی را می‌توان به کمک آزمایش‌های خاصی نشان داد. در این سیستم‌های آزمایش که در دهه‌ی ۱۹۶۰ توسعه یافتند، ابتدا پروتئین‌ها با رادیو ایزوتوپ‌ها نشاندار می‌شوند و سپس با دنبال کردن مولکول‌های نشاندار شده، سیر حرکت و جابجایی آنها تعیین می‌شوند. اولین آزمایش از این نوع در سلول های ترشحی لوزالمعده انجام گرفت. این سلول ها که برای ترشح آنزیم‌های گوارشی تخصصی یافته‌اند، آنزیم‌های خود را در جواب به پیام‌های خارج سلولی رها می‌سازند. مطالعات مشابه در سلول های مختلف نشان دادند که پروتئین‌ها پس از ساخته شدن در سیتوزول، یکی از دو مسیر زیر را انتخاب می نمایند.

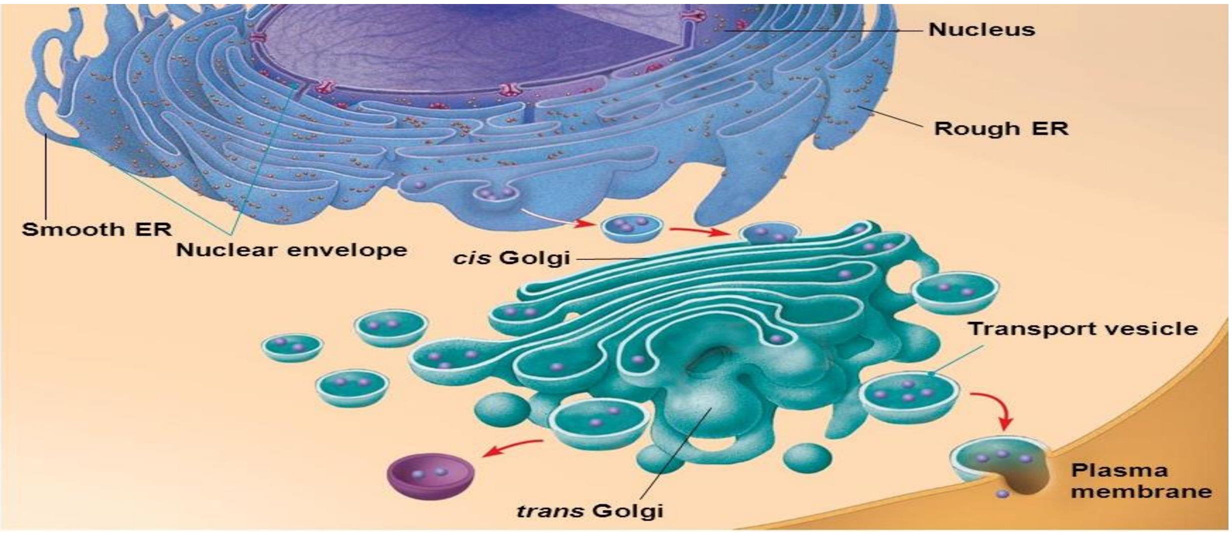
در یکی از این مسیرها، پروتئین‌های ساخته شده وارد شبکه‌ی اندوپلاسمی می‌شوند و از آنجا به دستگاه گلژی می‌روند که تعیین کننده‌ی مسیر بعدی این مولکول‌هاست. برخی از پروتئین‌ها از گلژی به لیزوزوم می‌رسند و تعدادی به غشای سلول می‌روند. پروتئین‌هایی که به غشای پلاسمایی می‌رسند، در غشا قرار می‌گیرند یا ترشح می‌شوند. ترشح آنزیم‌های گوارشی از سلول لوزالمعده به این طریق انجام می‌شود. در مسیر دیگر پروتئین‌هایی که در سیتوزول ساخته می‌شوند یا در همان جا باقی می‌مانند و یا مستقیماً به هسته، میتوکندری، کلروپلاست یا پراکسی زوم می‌روند.




شکل ۲۳- **ریزنگار الکترونی از شبکه‌ی اندوپلاسمی در سلول کبد موش.** علاوه بر شبکه‌های اندوپلاسمی خشن و صاف، میتوکندری(M)، پراکسی‌زوم(P) و دانه‌های گلیکوژن نیز در این تصویر مشاهده می‌شوند.

چگونگی انتقال لیپیدها پس از ساخته شدن در شبکه اندوپلاسمی صاف به غشا یا اندامک مقصد، به خوبی شناخته نشده است. لیپیدها پس از ساخته شدن در شبکه اندوپلاسمی صاف باید به تمام غشاهای سلولی بروند. در نتیجه‌ی مطالعات متنوع در سلول های متفاوت، سه روش برای انتقال لیپیدها پیشنهاد شده است. در پیشنهاد اول، لیپید ساخته شده در شبکه اندوپلاسمی صاف وارد وزیکول‌های انتقالی می‌شود و به وسیله‌ی آنها به مقصد خود می‌رسد. در روش دوم فسفولیپیدها به وسیله‌ی پروتئین‌های خاصی به غشای مقصد حمل می‌شوند. توجه کنید که پروتئین‌ها انتقال دهنده‌ی فسفولیپیدها انواع گوناگون دارند و هر کدام نوع خاصی از فسفولیپیدها را تشخیص و انتقال می‌دهد. در روش سوم، لیپیدهای ساخته شده در شبکه اندوپلاسمی صاف وارد این شبکه می‌شوند و ضمن گذشتن از آن و شبکه‌ی گلژی به مولکول‌های قندی اتصال می‌یابند. این ماکرومولکول‌ها سپس به وسیله وزیکول‌های انتقالی به غشای مقصد می‌روند.

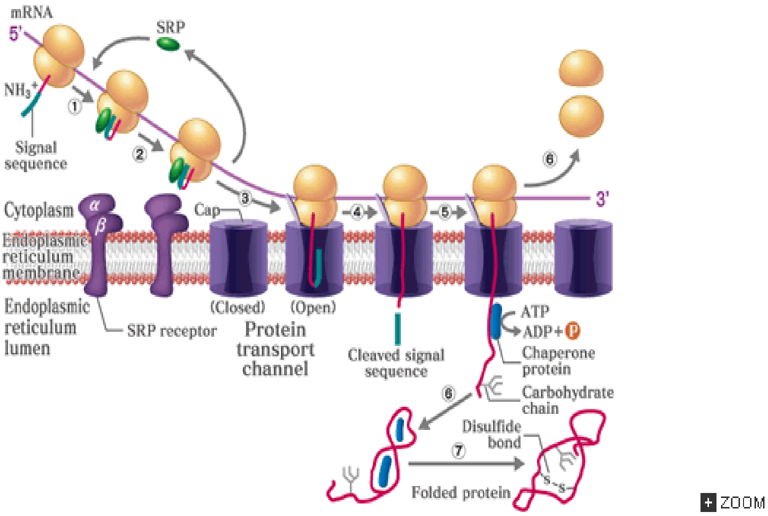





شکل ۲۴- **انتقال و توزیع فسفولیپیدها به وسیله‌ی پروتئین انتقال دهنده‌ی فسفولیپیدها.** انتقال مولکول لیپیدی از شبکه اندوپلاسمی به غشای میتوکندری نشان داده شده است.

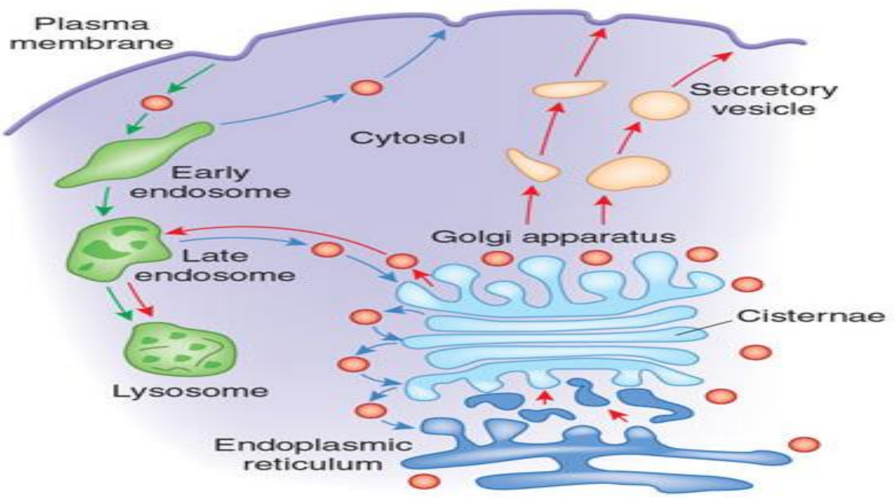
پروتئین هایی که از مسیر شبکه‌ی اندوپلاسمی عبور می‌کنند، روی ریبوزوم‌های چسبیده به شبکه‌ی اندوپلاسمی خشن ساخته می‌شوند و معمولاً همزمان با سنتز پروتئین، انتقال به فضای درونی شبکه‌ی اندوپلاسمی صورت می‌گیرد. پروتئین‌های ساخته شده روی شبکه‌ی اندوپلاسمی خشن در انتهای آمینو خود توالی خاصی از اسیدهای آمینه دارند که به آن پپتید نشانه گویند. این پپتید، در انتقال پروتئینی که روی شبکه‌ی اندوپلاسمی خشن ساخته می‌شود به شبکه‌ی اندوپلاسمی نقش ایفا می‌کند. پپتید نشانه که از ۱۶ تا ۳۰ اسید آمینه تشکیل شده و آبگریز است، اولین بخش پروتئین است که ساخته می‌شوند.

پپتید نشانه در غشای شبکه اندوپلاسمی باقی می‌ماند تا بقیه‌ی پروتئین ساخته شود و وارد فضای درونی شبکه اندوپلاسمی گردد. پس از انتقال کامل مولکول، پپتید نشانه به وسیله‌ی آنزیم خاصی از بقیه مولکول پروتئینی قطع می‌شود. خواهید دید که انتقال اکثر پروتئین‌ها به مقصدهای مختلف در سلول به وسیله‌ی توالی‌های نشانه انجام می‌گیرند.




شکل ۲۵- انتقال پروتئین از غشای شبکه‌ی اندوپلاسمی

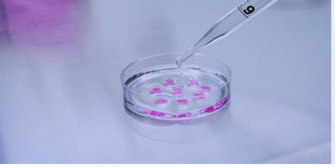
بسیاری از پروتئین ها پس از ورود به فضای درونی شبکه ی اندوپلاسمی تغییراتی می‌یابند و به الیگوساکاریدها متصل می‌شوند. پروتئین‌ها اگر در شبکه‌ی اندوپلاسمی باقی نمانند، به دستگاه گلژی می‌روند. انتقال به دستگاه گلژی به وسیله‌ی وزیکول‌هایی از جنس غشای شبکه اندوپلاسمی است. در حقیقت بخشی از غشای شبکه‌ی اندوپلاسمی پس از احاطه کردن پروتئین‌ها به صورت اگزو سیتوز، از شبکه اندوپلاسمی خارج می‌شود و به دستگاه گلژی می‌رود. وزیکول‌ها پس از رسیدن به دستگاه گلژی با غشای آن ادغام می‌شوند و مولکول پروتئین را در آن رها می‌سازند.

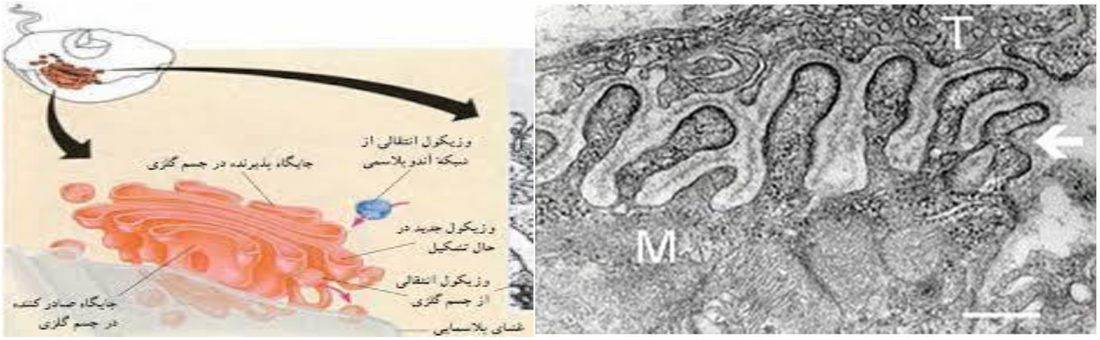



شکل ۲۶- مسیر انتقال پروتئین‌های ترشحی در سلول لوزالعمده‌ی موش

## ۱٫۱۸ دستگاه گلژی

دستگاه گلژی برای اولین بار توسط گلژی در سال ۱۸۹۸ پس از رنگ‌آمیزی 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 می‌باشند و محل ورود ماکرومولکول‌ها از شبکه‌ی اندوپلاسمی به دستگاه گلژی است. سطح ترانس رو به غشای سیتو پلاسمی است و ماکرومولکول‌ها از این سطح خارج می‌شوند. بخش بین سطوح سیس و ترانس را بخش میانی گلژی نامند. مولکول ها 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. 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.

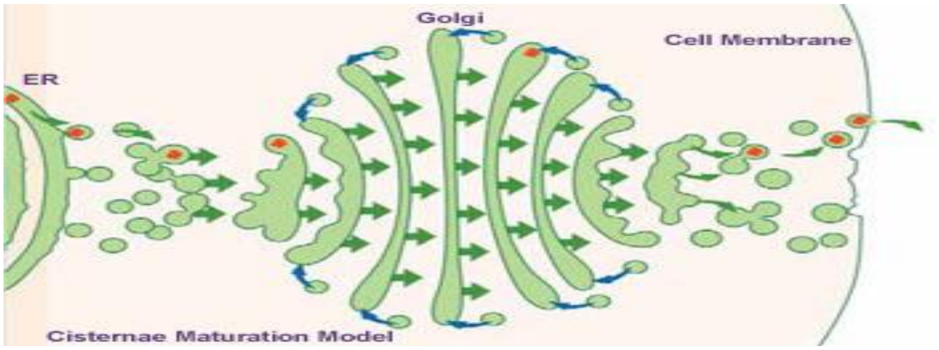





الف- ریز نگار الکترونی دستگاه گلژی. ب- تصویر شماتیک از دستگاه

شکل ۲۷- دستگاه گلژی.

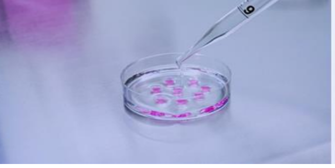
دستگاه گلژی را مأمور راهنمایی یا پلیس سلول نام نهاده‌اند. زیرا پس از ایجاد تغییر در ماکرومولکول‌ها، آنها را به مقصد نهایی هدایت می‌کند. حرکت ماکرومولکول‌ها بین سطوح مختلف دستگاه گلژی به کمک وزیکول‌های انتقال دهنده صورت می‌گیرد که از غشای یک سطح جوانه می‌زند و با غشای آن ادغام می‌شوند.

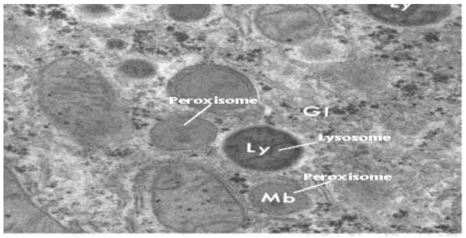



شکل ۲۸- **مسیرانتقال پروتئین‌ها از شبکه‌ی اندوپلاسمی به دستگاه گلژی**. انتقال بین سطوح مختلف گلژی و از گلژی به غشای سلول و لیزوزوم نشان داده شده است. انتقال در همه‌ی سطوح از طریق کیسه‌ها یا وزیکول‌های ترشحی صورت می‌گیرد.

## ۱,۱۹ لیزوزوم‌ها

لیزوزوم‌ها که در سال ۱۹۴۵ شناسایی شدند، اندامک‌های کوچک حاوی آنزیم‌های تجزیه‌کننده‌ی ماکرومولکول‌ها می باشند. لیزوزوم‌ها به وسیله‌ی روش‌های رنگ‌آمیزی اختصاصی برای آنزیم‌هایشان از سایر بخش‌های سلول متمایز می‌شوند و در اکثر سلول های یوکاریوتی یافت می‌شوند.






شکل ۲۹- **ریزنگار الکترونی لیزوزوم‌ها با روش رنگ‌آمیزی اختصاصی برای آنزیم اسید فسفاتاز که در لیزوزوم وجود دارد، رنگ شده‌اند**. ذرات بزرگتر لیزوزوم هستند و ذرات کوچک‌تر که با پیکان مشخص شده‌اند، احتمالاً وزیکول‌های ترشحی هستند که از دستگاه گلژی به لیزوزوم رسیده‌اند.

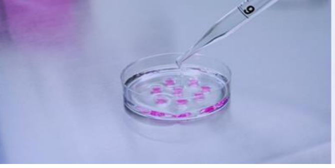
مطالعات بیوشیمایی نشان داده‌اند که حدود ۴۰ آنزیم تجزیه کننده در لیزوزوم‌ها وجود دارند که پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها و کربوهیدرات‌ها را تجزیه می‌کنند. تمام این آنزیم‌ها در محیط اسیدی فعال هستند و به همین دلیل PH اسیدی به وسیله پمپ پروتونی ($H^+$) که در غشای لیزوزوم وجود دارد حفظ می‌شود. این 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.

## ۱,۲۰ انتقال پروتئین و RNA از غشای هسته

غشای هسته در سلول های یوکاریوتی از مخمر تا انسان، منافذی دارد که کانال‌هایی برای عبور ماکرومولکول‌ها می‌باشند. هسته تنها اندامکی است که عبور مولکول‌ها از غشای آن به وسیله‌ی کانال صورت می‌گیرد. همان‌طور که قبلاً ذکر شد، انتقال ماکرومولکول به سایر اندامک‌ها به وسیله وزیکول‌های انتقال دهنده انجام می‌گیرد. برای تعیین اندازه‌ی منافذ هسته، مولکول‌های نشاندار شده با اندازه های مختلف به درون سیتوزول تزریق می‌شوند و ورود آنها به درون هسته دنبال می‌شود. این آزمایش‌ها نشان داده‌اند که مولکول‌های کوچک با جرم مولکولی حدود ۵۰۰۰ دالتون با سرعت جرم مولکولی ۱۷۰۰۰ دالتون پس از ۲ دقیقه در داخل هسته مشاهده می‌شوند. مولکول‌های ۴۴۰۰۰ دالتونی پس از ۳۰ دقیقه به داخل هسته نمی‌رسند و بالاخره آنهایی که ۶۰۰۰۰ دالتون جرم دارند به سختی وارد می‌شوند یا اصلاً وارد نمی‌شوند. به دنبال آزمایش‌های ذکر شده، اندازه‌ی منافذ هسته حدود ۹ نانومتر محاسبه شد. طول کانال از خارج هسته به داخل ۱۵ نانومتر است که به وسیله‌ی میکروسکوپ الکترونی قابل مشاهده است هسته‌ی سلول های پستانداران حدود سه تا چهار هزار منفذ دارد.

با توجه به ابعاد ارایه شده چگونه ممکن است پروتئین‌هایی نظیر DNA و RNA پلی‌مراز که جرم مولکولی زیر واحدهای آنها به ۲۰۰۰۰۰ دالتون می‌رسد از سیتوزول به درون هسته منتقل شوند؟ از طرف دیگر چرا پروتئین‌های کوچک موجود در سیتوزول وارد هسته نمی‌شوند؟ بررسی‌ها نشان داده‌اند که تمام پروتئین‌هایی که از سیتوزول به هسته می‌روند، پپتیدهای نشانه‌ای متشکل از ۴ تا ۸ اسید آمینه با بارالکتریکی مثبت دارند. این نشانه به وسیله‌ی پروتئین‌های موجود در منافذ هسته شناسایی می‌شوند و سپس منافذ هسته مانند دیافراگم عمل می‌کنند و به اندازه‌ی کافی باز می‌شوند تا مولکول‌ها از آنها عبور بگذرند. این انتقال به صورت فعال، یعنی با استفاده از انرژی ذخیره شده در ATP انجام می‌شود.

برخلاف پروتئین‌های ذکر شده که از سیتوزول به هسته انتقال می‌یابند، ریبوزوم‌ها و مولکول‌های RNA که داخل هسته ساخته می‌شوند و در ترکیب با پروتئین‌ها هستند، باید به سیتوزول بروند. ابعاد این ماکرومولکول‌ها نیز چندین برابر اندازه‌ی منافذ هسته است. انتقال ریبونوکلئو پروتئین‌ها و ریبوزوم‌ها نیز به صورت فعالی و از منافذ هسته انجام می‌گیرد. منافذ هسته دارای گیرنده‌های خاصی برای انتقال این ماکرومولکول‌ها می‌باشند. بنابراین برخی پروتئین‌های انتقال دهنده در غشای هسته پروتئین-



های هسته را از سیتوزول به داخل هسته هدایت می‌کنند و پروتئین‌های دیگر ماکرومولکول‌ها را در جهت عکس و از هسته به سیتوزول می‌برند.  چگونگی این انتقال به درستی شناسایی نشده است.

جالب است که بسیاری از پروتئین‌هایی که از سیتوزول وارد اندامک می‌شوند، زیر واحدهایی از ترکیباتی هستند که سایر زیر واحدهایشان در اندامک ساخته می‌شوند. این زیر واحدها نهایتاً بایستی بهم برسند تا ترکیب کامل ایجاد شود. چگونگی تنظیم همزمان ساختن زیرواحدها در خارج و داخل اندامک شناسایی نشده است.

## ۱,۲۱ پراکسی زوم‌ها

پراکسی زوم‌ها اندامک‌های کوچکی هستند که در سال ۱۹۶۵ شناسایی شدند. روش های 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 سلول های 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 سلول های آنها اکسیده و خنثی می- شوند. 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 رش گیاه جوان لازم است، به عهده دارد. تبدیل لیپید به قند فقط در گلی اکسی زوم‌های دانه‌های گیاهی صورت می‌گیرد و چنین فرآیندی در سلول های 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. جزییات نحوه انتقال این پروتئین‌ها به اندامک شناسایی نشده‌اند. به نظر می‌رسد که پروتئین‌هایی وارد پراکسی‌رزوم می‌شوند نیز دارای توالی ویژه‌ای هستند که توسط گیرنده‌ای در سطح غشای آن شناسایی می‌شود.

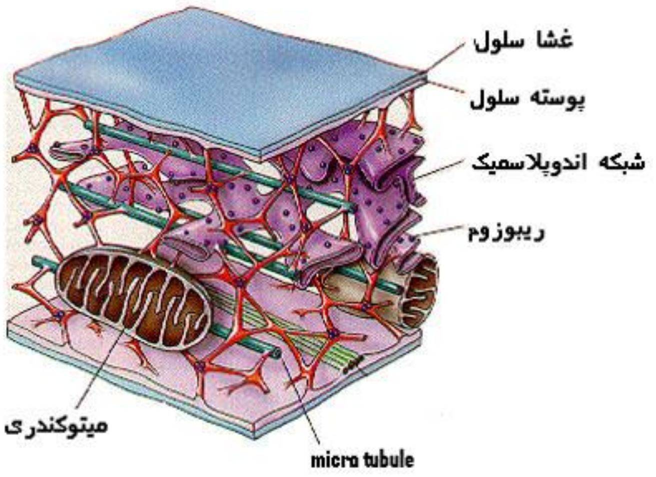
## ۱,۲۲ اسکلت سلولی

در ابتدا تصور می‌شد که سیتوزول سلول های یوکاریوتی معجون یکنواخت و متجانسی است که در آن اندامک‌ها غوطه ور هستند. در سال ۱۹۲۸ دانشمندی به نام کالتزوف ادعا کرد که سیتوزول هر سلول از ترکیبات مایع و اسکلت سخت به وجود آمده است که اسکلت سخت، شکل سلول را می‌سازد. به نظر او رشته های سازنده این اسکلت بسیار نازک بودند و به همین دلیل به وسیله میکروسکوپ نوری دیده نمی‌شدند.

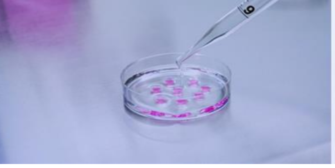
امروزه مشخص شده است که اشکال متنوع سلول های یوکاریوتی و نیز حرکات هماهنگ و منظم آنها به دلیل وجود اسکلت سلولی است. به اسکلت سلولی ماهیچه‌ی سلولی نیز گفته می‌شود زیرا که مسئول حرکاتی مثل خزیدن سلول، حرکت آمیبی،

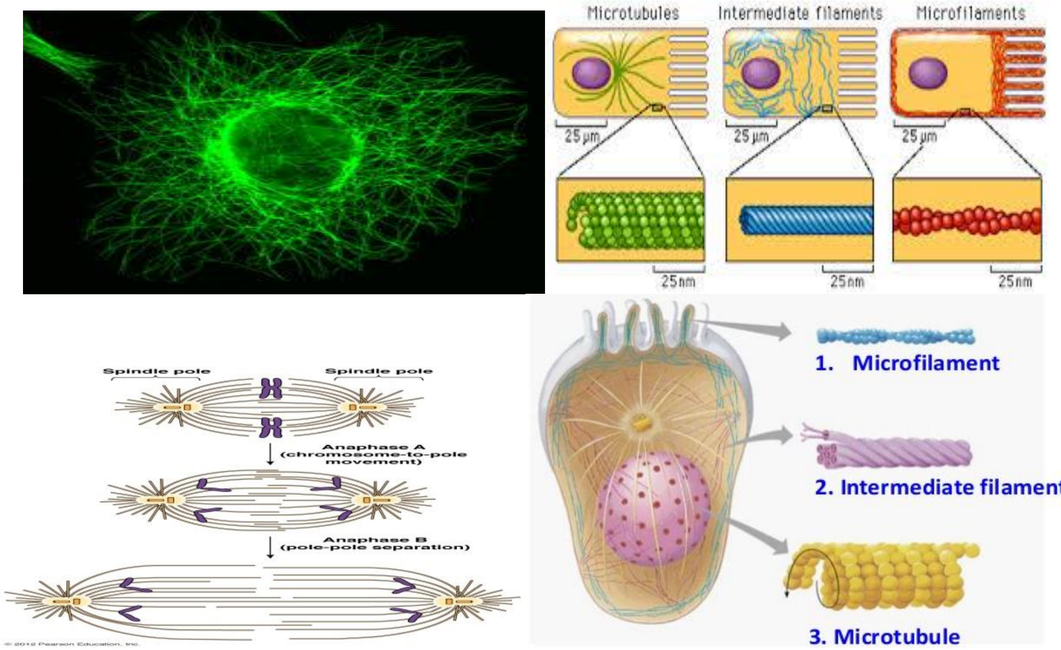
حرکت تاژه‌ها و مژه‌ها، انقباض سلولی و حرکت کروموزوم‌ها در تقسیم میتوز می‌باشد. به علاوه اسکلت سلولی جابجایی اندامک‌ها را در سیتوپلاسم امکان پذیر می‌سازد.

درسال‌های اخیر، تنها با بهره‌گیری از روش‌های پیشرفته میکروسکوپ‌های نوری و الکترونی مشاهده‌ی اسکلت سلولی ممکن شده است. تصاویر به دست آمده نشان داده‌اند که اسکلت سلولی شبکه‌ی سه بعدی در هم پیچیده‌ای متشکل از رشته‌هاست که این رشته‌ها یکدیگر را در جهات و نقاط مختلف به صورت شطرنج قطع می‌کنند. دانشمندان توانسته‌اند با جداسازی اسکلت سلولی از سایر محتویات سیتوزول نشان دهند که این ساختار از سه نوع رشته‌های پروتئینی تشکیل شده است، ریز لوله‌چه‌ها، ریزرشته‌ها و رشته‌های حد واسط. هر نوع رشته‌ی پروتئینی از زیر واحدهای متفاوتی تشکیل شده است و دارای پروتئین‌های ضمیمه نیز می باشد. پروتئین‌های ضمیمه سرنوشت رشته‌ها را تعیین می‌کنند. بعضی از این پروتئین‌ها رشته‌های مختلف را به یکدیگر متصل می‌کنند، بعضی رشته‌ها را به سایر ساختارهای سلولی مثل غشای پلاسمایی وصل می‌کنند، دسته‌ی دیگر تعیین کننده‌ی تجمع رشته‌ها در نقاط خاصی از سلول هستند و بعضی باعث حرکت مژه‌ها می‌شوند.




شکل ۳۰- **ساختار اسکلت سلولی**. الف- طرح شماتیک اسکلت سلولی. ریزلوله چه‌ها به رنگ صورتی، ریزرشته‌ها به رنگ آبی و رشته‌های حد واسط به رنگ زرد نمایان شده اند. ب- تصویر میکروسکوپ فلورسانت از سلولی که رشته‌های پروتئینی اسکلت آن پس از واکنش با آنتی-بادی فلورسانت به رنگ سبز دیده می‌شوند. هسته پس از رنگ‌آمیزی DNA با ماده‌ی فلورسانت به رنگ‌آبی دیده می‌شود.

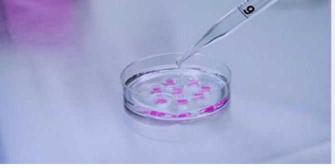


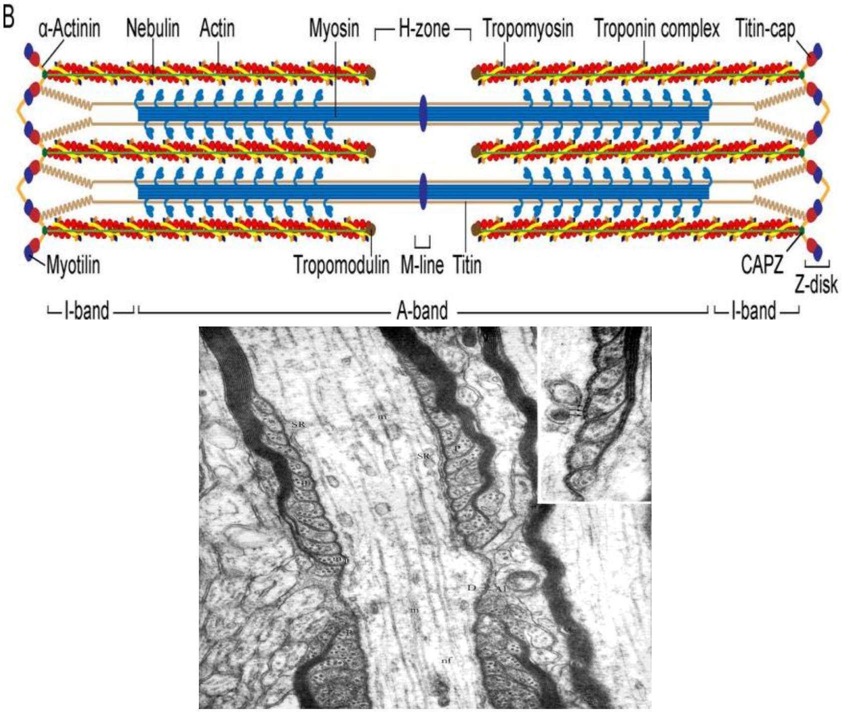



**شکل ۳۱- انواع رشته‌های پروتئین در اسکلت سلولی.** تصویر میکروسکوپ الکترونی و طرح شماتیک انواع رشته‌های پروتئینی ارایه شده‌اند. شکل شماتیک سلول ها، با تأکید بر موقعیت هر رشته در طرف راست تصاویر میکروسکوپ الکترونی نمایان است. جسم قهوه‌ای رنگ در این شکل ها هسته است. الف-ریز رشته‌ها (رشته های اکتین) با قطر ۵ تا ۹ نانومتر، ساختارهای رشته‌ای هستند که از پروتئین کروی اکتین به وجود آمده‌اند. این رشته‌ها به صورت دستجات و شبکه‌های دو بعدی و سه بعدی وجود دارند ولی عمدتاً در زیر غشا مجتمع می‌شوند و باعث استحکام آن می‌گردند. ب-ریزلوله‌چه‌ها لوله‌های بلند و توخالی به قطر خارجی ۲۵ نانومتر هستند و از پروتئین توبولین ساخته شده‌اند. ریز لوله‌چه‌ها دوک میتوز را می سازند و چنانچه در شکل دیده می شود یک سر آنها به سانتروزوم منتهی می‌گردد. ج- رشته‌های حد واسط به شکل طناب و به قطر ۱۰ نانومتر هستند. پروتئین های تشکیل دهنده‌ی این رشته‌ها بر حسب نوع رشته متفاوت هستند. یک نوع رشته‌ی حد واسط شبکه‌ای را در زیر غشای داخل هسته به وجود می‌آورد. انواع دیگر از یک طرف سلول به طرف دیگر کشیده می‌شوند. این رشته‌ها همچنین با ایجاد اتصال بین سلول ها باعث پایداری لایه‌های سولی می‌شوند.

## ۱,۲۳ ریز لوله‌چه‌ها

ریزلوله‌چه‌ها ساختارهایی هستند که در سیتوزول تمام سلول های یوکاریوتی از آمیب گرفته تا سلول گیاهان و جانوران عالی وجود دارند. جزییات ساختاری ریزلوله چه‌ها در سلول های موجودات مختلف به طور شگفت‌آوری یکسان است. ریزلوله چه‌ها رشته‌های بلند و توخالی هستند که درازای آنها به حداکثر ۲۰۰ میکرومتر می‌رسد، قطر خارجی آنها ۲۵ نانومتر و قطر داخلی‌شان ۱۵ نانومتر می‌باشد. همان‌طور که در شکل می‌بینید هر ریزلوله چه از ۱۳ رشته به نام پیش‌رشته تشکیل شده است که به موازات محور طولی ریزلوله‌چه‌ها قرار گرفته‌اند. تشابه ردیف اسیدهای آمینه این دو توبولین حدود ۵۰ درصد است. در واقع واحد تشکیل دهنده‌ی پیش رشته‌های دایمر βα است و این دایمر نیز اصطلاحاً توبولین خوانده می‌شود. در هر پیش رشته، توبولین‌ها به صورت پشت سرهم یعنی βα.....βα......βα.....βα قرار گرفته‌اند. سلول های عصبی که غنی از ریزلوله‌چه‌ها هستند منبع عمده این پروتئین‌ها در تحقیقات می‌باشند.

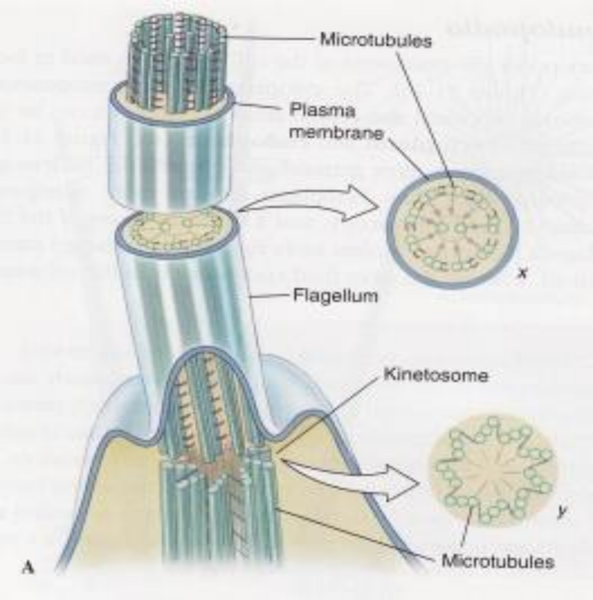





شکل ۳۲- طرح سه بعدی از ساختار یک ریزلوله‌چه

ضمن خالص سازی ریزلوله‌چه‌ها از عصاره‌ی سلول های مغز، پژوهشگران متوجه شدند که همیشه پروتئین های دیگری در اتصال به زیر واحدها βα وجود دارند. این پروتئین‌ها را پروتئین‌های ضمیمه‌ی ریزلوله‌چه‌ها نامیدند. تنوع ریزلوله‌چه‌ها عمدتاً به دلیل وجود پروتئین‌های ضمیمه‌ی متفاوت در آنهاست و این پروتئین‌های ضمیمه هستند که خصوصیات ویژه‌ی یک ریزلوله‌چه را تعیین می‌کنند.

یک خصوصیت کلیدی اغلب ریزلوله‌چه‌ها قطبیت آنهاست. در شرایط دورن شیشه، دراز یا کوتاه با اضافه یا حذف شدن توبولین-ها در دو انتهای ریزلوله‌چه‌ها صورت می‌گیرد. در اغلب موارد سرعت این فرآیند در یکی از دو انتها بیشتر و حدوداً دو برابر انتهای دیگر است. این عدم تساوی نشان می‌دهد که دو انتهای ریز لوله‌چه‌ها یکسان نیستند، یعنی ریز لوله‌چه‌ها دارای قطبیت هستند. انتهایی که فعال‌تر است مثبت(+) و انتهای دیگر(-) خوانده می شود. این نکته مهم است که همیشه توبولین آزاد در سلول وجود دارد و دراز شدن ریزلوله‌چه‌ها با اضافه شدن توبولین‌های آزاد به آنها صورت می‌گیرد و کوتاه شدن ریزلوله‌چه‌ها با آزاد شدن توبولین‌ها همراه است.




شکل۳۳- ساختار ریزلوله چه

اکنون که کلیاتی درباره‌ی ریزلوله‌چه‌های سلول می‌دانیم، می‌توانیم نقش برخی از ساختارهای سلولی را که از ریزلوله‌چه تشکیل شده‌اند مورد بررسی قرار دهیم. ریزلوله‌چه های اسکلت سلولی که در ترابری مواد نقش دارند، دوک میتوز، تاژه و مژه مثال‌هایی از این گونه ساختارها هستند.

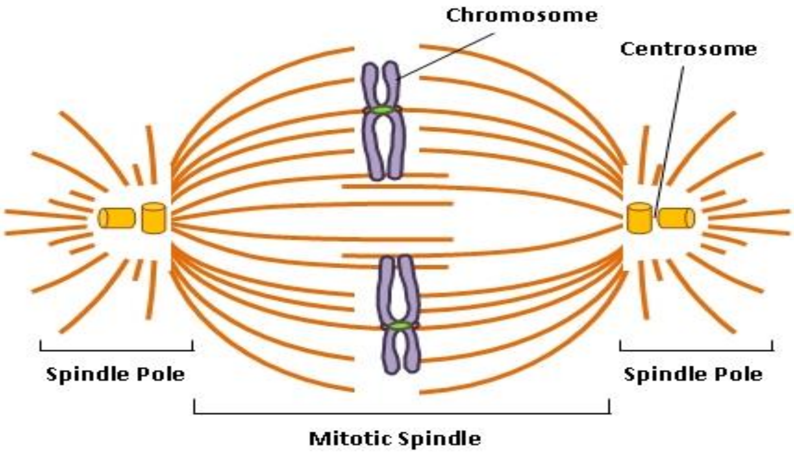
## ۱,۲۴ ترابری درون سلولی

ذرات پروتئینی و وزیکول‌ها مرتباً در داخل سلول جابجا می‌شوند و چندین میکرومتر را طی می کنند تا به مقصد برسند. از آنجایی که به تنهایی باعث این نقل و انتقال با سرعت و جهت خاص شود، زیست‌شناسان از دیرباز عقیده داشته‌اند که ریزلوله‌چه‌ها در این امر نقش اساسی دارند. ترابری با دخالت ریزلوله‌چه‌ها نیاز به انرژی دارد که در اثر هیدرولیز ATP تأمین می‌گردد. برای بررسی ترابری پروتئین در سلول های عصبی، اسیدهای آمینه نشاندار شده با مواد رادیو اکتیو به عصب سیاتیک تزریق شدند. سپس عصب سیاتیک در فواصل زمانی معین قطعه قطعه و میزان پروتئین‌های نشاندار در هر قطعه اندازه‌گیری شد. نتایج این آزمایش نشان داد که پروتئین‌ها پس از ساخته شدن در پیکر سلول به اکسون منقل می‌شوند و در طول آن حرکت می‌کنند.

سرعت انتقال انواع پروتئین‌ها متفاوت است. پروتئین‌هایی که در داخل ریزکیسه‌ها حمل می‌شوند با سرعت ۲۵۰ میلی متر در روز حرکت می‌کنند. پروتئین‌های اسکلت سلولی آهسته‌تر و با سرعت حدود ۱ میلی‌متر در روز حرکت می‌نمایند. با استفاده از روش‌های میکروسکوپی و عکس‌برداری، حرکت اندامک در سلول های عصبی ماهی مرکب مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که اندامک‌های اکسون را در دو جهت و با سرعت حدود ۱۵۰ میلی متر در روز طی می‌کنند. توجه کنید که ریزکیسه‌های حاوی پروتئین و اندامک‌ها که سریعاً جابه‌جا می‌شوند در کنار ریزلوله‌چه‌ها و در ارتباط با آنها حرکت می‌کنند. در حقیقت ریز لوله‌چه‌ها مسیر حرکت آنها را تعیین می‌کنند. اندامک‌ها در امتداد ریزلوله‌چه‌ها که با صرف انرژی همراه است، با وساطت پروتئین‌هایی به نام پروتئین‌های حرکتی امکان‌پذیر است. پروتئین‌های حرکتی در حقیقت موتورهای مولکولی هستند. هر پروتئین حرکتی از یک انتها به ریزلوله‌چه و از انتهای دیگر به ریزکیسه یا اندامک متصل می‌شود و حرکت را در دو جهت امکان‌پذیر می‌سازد.

## ۱,۲۵ دوک میتوز

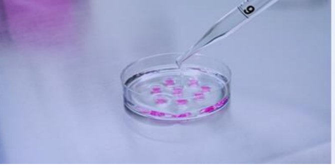
اولین رخداد قابل مشاهده در شروع میتوز تکثیر سانتریول و مهاجرت دو سانتریول جدید به دو جایگاه مقابل در سلول است که نهایتاً محل دو قطب دوک خواهد بود. سانتریول معمولاً به عنوان محل پلیمریزه شدن ریزلوله‌چه‌ها در دوره‌ی اینترفاز چرخه‌ی سلولی معرفی می‌شود. به نظر می‌رسد که تشکیل ریزلوله‌چه‌ها در ناحیه‌ای بی شکل در نزدیکی سانتریول‌ها صورت می‌گیرد (اصطلاح سانتروزوم به سانتریول و نواحی اطراف آن گفته می شود). جالب است که در سلول گیاهی عالی سانتریول وجود ندارد. با این حال ریزلوله‌چه‌ها در آنها تشکیل می‌شوند. در هر حال پس از تعیین محل در قطب، دوک میتوز که نقش آن توزیع کروموزوم-های همانند سازی شده بین دو سلول دختر است تشکیل می‌شود. مطالعات میکرسکوپی الکترونی عبوری نشان داده است که دوک میتوز از سه نوع رشته تشکیل شده است که همگی ماهیت ریزلوله‌چه دارند. رشته‌های کینتوکوری، رشته‌های قطبی و رشته‌های ستاره‌ای. رشته‌های کینتوکوری رشته‌هایی هستند که از قطب منشأ می‌گیرند و هر کدام با یکی از کروموزوم‌ها اتصال برقرار می-کند. می‌دانید که در شروع میتوز کروماتیدهای حاصل از همانند سازی، جفت و در محل سانترومر متصل‌اند.




شکل ۳۴- دوک میتوز

تعریف کیندتوکوری کینتوکوری به کروماتید از طریق این ترکیب پروتئینی صورت می‌گیرد. رشته‌های قطبی رشته‌هایی هستند که از قطب‌های مقابل به طرف صفحه‌ی میانی دوک کشیده می‌شوند. رشته‌های قطبی دو قطب مقابل در ناحیه‌ی صفحه‌ی میانی در کنار یکدگیر قرار می‌گیرند. رشته‌های ستاره‌ای رشته‌های نسبتاً کوتاهی 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، سانتریول‌های تکثیر شده تفکیک می‌شوند و به دو قطب سلول می‌روند و اسکلت سلولی دستخوش تغییراتی می‌شود. تعدادی از ریزلوله‌چه‌های بلند مرحله‌ی اینترفاز تخریب می-شوند 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 کروموزوم-



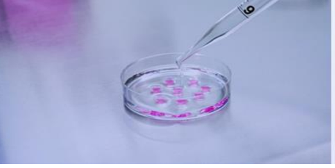
های متراکم شده را می‌توان مشاهده نمود که بدون داشتن جهت خاصی بین دو قطب دوک در حرکت هستند و اتصال ریزلوله‌چه آنها را از این حالت خارج می‌کند. یکی از کینتوکورها به ریزلوله‌چه‌ای که ازیک قطب می‌آید متصل می‌شود و کینتوکور دیگر به ریزلوله‌چه‌ای که از قطب مقابل می‌آید می‌چسبد. در نظر داشته باشید، ریزلوله‌چه‌هایی 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.

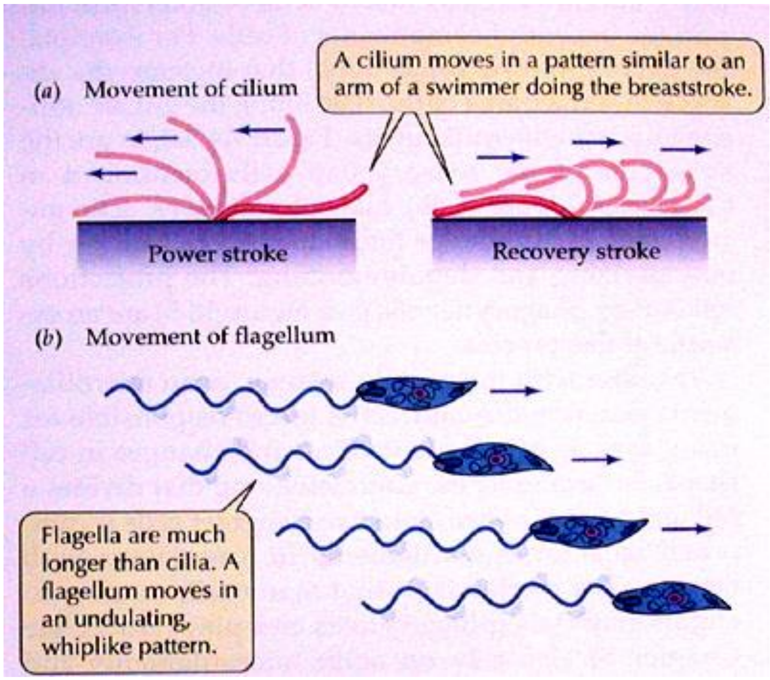
دور شدن دو قطب دوک از یکدیگر مستلزم طویل شدن ریزلوله‌چه‌های قطبی در انتهای(+) آنهاست. بخش‌های طویل شده‌ی ریزلوله‌چه‌های قطبی متقابل، در ناحیه‌ی استوایی دوک در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند. تحقیقات نشان داده که سر خوردن این ریزلوله‌چه‌ها از کنار هم نیرویی به وجود می‌آورد که باعث طویل شدن دوک و دور شدن قطب‌ها از یکدیگر و در نتیجه تقسیم کروموزم‌ها 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 ریزلوله‌چه‌ها از طریق هیدرولیزATP تأمین می شود.

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 سلول انجام نمی‌گیرد. در حقیقت این ماده باعث توقف سلول ها 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.

## ۱٫۲۶ مژه‌ها و تاژه‌ها

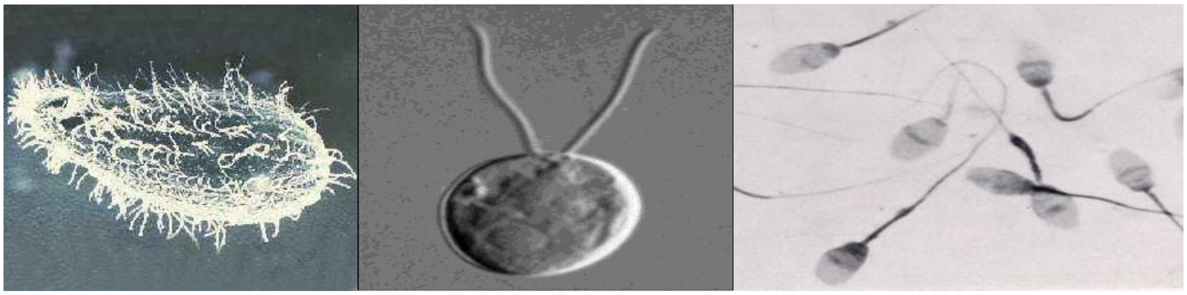
مژه‌ها و تاژه‌ها زواید متحرک خارج سلولی بر روی سطح بسیار از سلول های یوکاریوتی هستند. ساختار مژه‌ها و تاژه‌ها بسیار شبیه است، هر دو از ریزلوله‌چه‌ها تشکیل شده‌اند و قطرشان حدود ۰/۲۵ میکرومتر است. طول تاژه بلندتر از مژه و تعداد آن یک یا دو در هر سلول می‌باشد. تعداد مژه‌ها بیشتر است و اغلب بخش وسیعی از سطح سلول را می‌پوشانند. حرکت تاژه موجی و حرکت مژه تازیانه‌ای است.



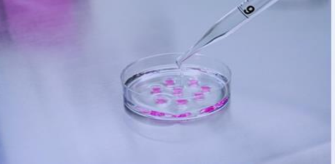



**شکل ۳۵- حرکت تاژه و مژه.** الف) حرکت تاژه در اسپرم از جسم سلول شروع می‌شود و به نوک آن پیش می‌رود. به این ترتیب سلول به جلو رانده می‌شود. ب) حرکت تازیانه‌ای مژه در دو جهت رفت و برگشت صورت می‌گیرد.

سلول های اسپرم از تاژه برای حرکت استفاده می‌کنند، اما در تک‌یاخته‌های گیاهی تاژه‌دار مثل کلامیدوموناس، تاژه علاوه بر حرکت در به دام انداخت ذرات غذایی نیز نقش دارد. در تک یاخته‌های جانوری مژه‌دار مثل پارامسی، حرکت و به دام انداختن مواد غذایی به عهده‌ی مژه‌ها است. در پستانداران، سطح مجاری تنفسی مثل بینی، نای و نایژه با بیش از ۱۰۷ مژه در هر میلی‌متر مربع پوشیده شده است. ذرات گرد و غباری که در ترشحات مخاطی این بافت‌ها گرفتار می‌شوند، توسط این مژه‌ها به خارج رانده می‌شوند. حرکات جارو مانند مژه‌ها در مجرای تخمدان و رحم نیز باعث جابجایی تخمک‌ها و مواد مخاطی می‌گردد. همان‌طور که گفته شد تاژه و مژه هر دو از ریزلوله‌چه‌ها تشکیل شده‌اند. به مجموعه‌ی ریزلوله‌چه‌ها در این دو ساختار اکسونیم گفته می‌شود. اکسونیم به وسیله‌ی امتداد غشای پلاسمایی پوشیده می‌شود و در محل اتصال آن به سلول جسم پایه‌ای قرار دارد که خود متشکل از ریزلوله‌چه‌ها است.



**شکل ۳۶- 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.



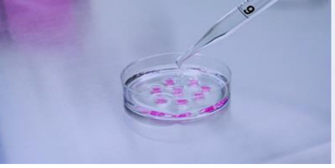
نحوه‌ی قرار گرفتن ریز لوله‌چه‌ها در جسم پایه‌ای با نحوه‌ی قرار گرفتن آنها در تاژه و مژه یکسان نیست. به نظر می‌رسد که جسم پایه‌ای درتشکیل ریزلوله‌چه‌های تاژه و مژه نقش داشته باشد. در مرکز هر اکسونیم دو ریزلوله‌چه واحد قرار دارند و نه جفت ریزلوله‌چه‌ی پیرامونی دور تا دور این دو را احاطه می‌کنند. به ریزلوله‌چه‌های پیرامونی پروتوئین‌های ضمیمه‌ی مختلفی به شکل زایده متصل شده‌اند. نقش عمده‌ی این زواید پروتوئینی برقراری ارتباط بین ریزلوله‌چه‌هاست. یک از زواید پروتوئینی داینئین نام دارد که ریزلوله‌چه‌های پیرامونی مجاور را به یکدیگر متصل می‌کند و در حرکت مژه‌ها و تاژه‌ها دخالت دارد. به نظر می‌رسد که حرکت مژه و تاژه‌ها 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 تاژه 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 تاژه تأیید می‌کند. به عنوان مثال در بعضی از این جهش یافته‌ها که فاقد داینئین بودند، با وجود تاژه، تحرک مشاهده نمیشد. عقیمی ارثی در مردان نیز می‌تواند به دلیل نقص در تاژه‌ی 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 و گیاهان تا انواع سلول های حیوانات عالی وجود دارند. مژه‌ها از نظر اندازه و جزییات ساختاری به طور شگفت‌انگیزی در انواع سلول ها 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.

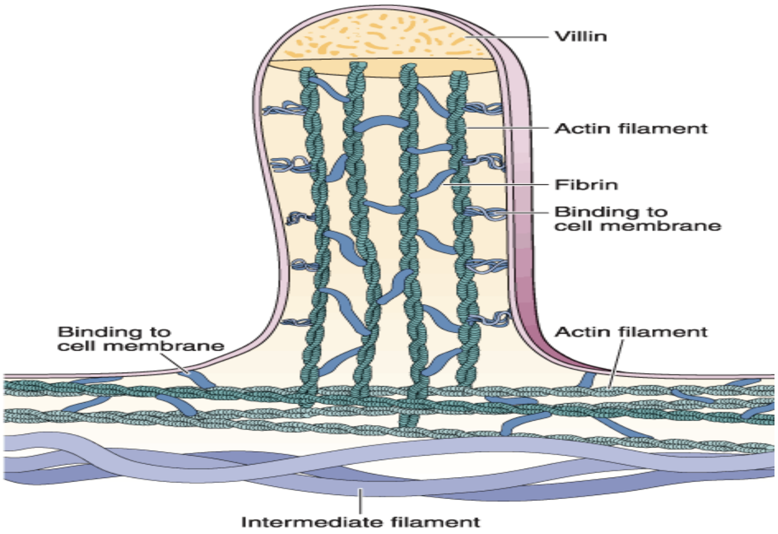
## ۱,۲۷  ریزرشته‌ها

ریزرشته‌ها که رشته‌های اکتین نیز خوانده می‌شوند زنجیره‌هایی به قطر هفت نانومتر هستند که در تمام سلول های یوکاریوتی به وفور یافت می‌شوند. رشته‌های اکتین از واحدهای پروتوئینی کروی به نام اکتین تشکیل شده‌اند که به صورت منظم به دنبال یکدیگر قرارگرفته‌اند. رشته‌های اکتین نیز مانند ریزلوله‌ها قطبی هستند و سریع اضافه و حذف شدن زیرواحدها در انتهای(+) بیشتر از انتهای (-) است. اکتین دستجات و شبکه‌های اکتینی را ایجاد می‌کنند. این رشته‌ها مانند ریزلوله‌چه‌ها در سلول های مختلف ساختار مشابه دارند و تنوع آنها به دلیل وجود پروتوئین‌های ضمیمه‌ی آنهاست. یکی از مهمترین پروتوئین‌های ضمیمه میوزین است که به نقش آن در ادامه‌ی بحث خواهیم پرداخت. در اینجا اهمیت اکتین و نقش آن را در انجام وظایف متنوع سلولی، با ذکر مثال-های زیر بیان می‌کنیم.

## ۱,۲۸  ریزپرزهای سلول های پوششی روده

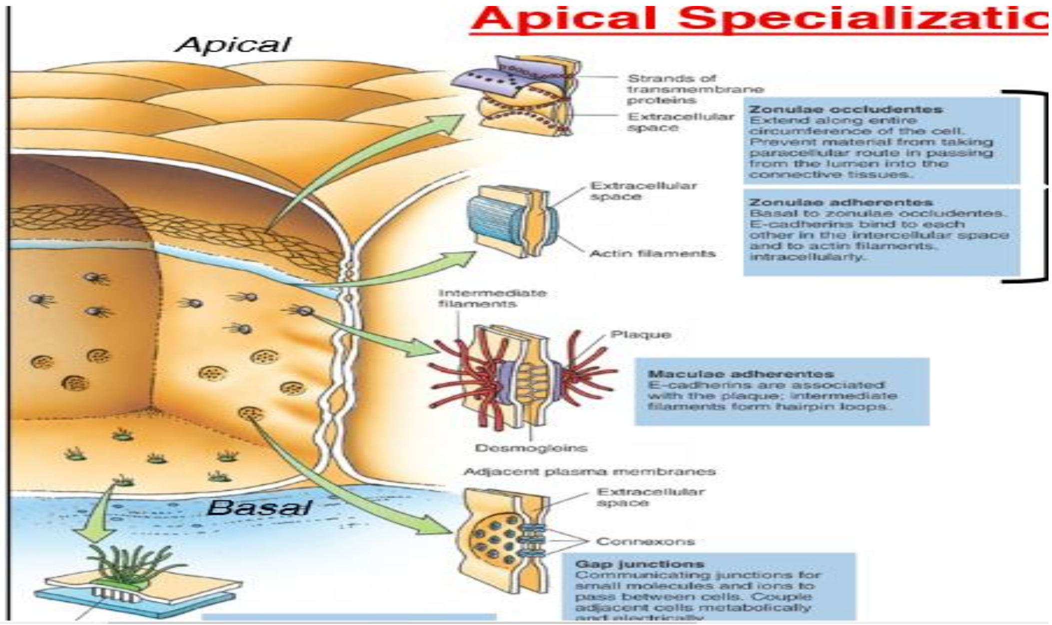
ریزپرزهای سلول های روده مثالی مناسب برای مطالعه‌ی رشته‌های اکتین و سایر پروتوئین‌های اسکلت سلولی هستند، زیرا به راحتی می‌توان آنها را از سلول ها جدا کرد. رشته‌های اکتین در ریزپرزهای سلول های پوششی روده آرایش بسیار منظمی دارند و به صورت دستجات اکتینی قرار گرفته‌اند. اتصال پروتوئین‌های ضمیمه به این دستجات از یک‌سو و غشای پلاسمایی از سوی دیگر باعث می‌شود که غشای پلاسمایی در ریزپرزها به شکل کشیده و مستحکم در آید.






شکل ۳۷- اتصال رشته‌های اکتین به یکدیگر و به غشای پلاسمایی به وسیله‌ی پروتئین‌های ضمیمه‌ی مختلف در ریزپرزهای روده‌ای

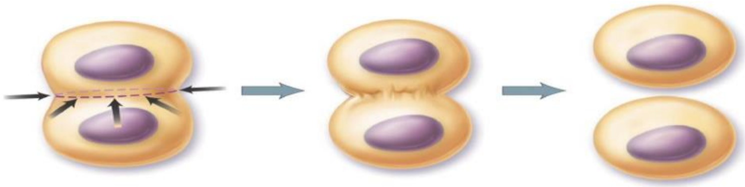
در سلول های پوششی روده، رشته‌های اکتین به دو صورت در زیر ریزپرزها قرار گرفته‌اند، یکی شبکه‌ی انتهایی و دیگری کمربند اتصال. در شبکه‌ی انتهایی، تعداد زیادی پروتئین‌های ضمیمه دستجات اکتینی خارج شده از ریزپرزهای مجاور را به یکدیگر متصل می‌کنند. در حقیقت این شبکه به صورت شطرنجی سیتوزول را قطع می‌کند. وجود شبکه‌ی انتهایی در ریزپرزها باعث استحکام غشای پلاسمایی در این نواحی می‌شود. در کمربند اتصال، رشته‌های اکتین دور تا دور غشای پلاسمایی را به موازات شبکه‌ی انتهایی احاطه می‌کنند. نقش کمربند اتصال وصل کردن سلول های مجاور به یکدیگر می‌باشد.




شکل ۳۸- شبکه‌ی انتهایی و کمربند اتصال دستجاتی از رشته‌های اکتین

## ۱,۲۹ تقسیم سیتوپلاسم

هنگام تقسیم سلول های حیوانی اولین نشانه در تفکیک سیتوپلاسم سلول های دختر، ایجاد شکاف در غشای پلاسمایی است که در امتداد صفحه‌ی استوایی دوک و عمود بر محور طولی آن رخ می‌دهد. این شکاف در اثر انقباض حلقه‌ی انقباضی ایجاد می‌گردد. ساختار حلقه‌ی انقباضی از رشته‌های اکتین و میوزین تشکیل شده است. رشته‌های اکتین و میوزین توسط پروتئین‌هایی به سطح داخل غشای پلاسمایی متصل شده‌اند. در اثر سُر خوردن رشه‌های اکتین و میوزین در کنار هم، شبیه آنچه در ماهیچه اتفاق می-افتد، نیرویی در حلقه‌ی انقباضی به وجود می‌آید که سبب بهم فشرده شدن قسمت میانه‌ی سلول در امتداد خط میانی دوک می-شود. از آنجایی که هنگام تقسیم سلول و عمیق‌تر شدن شکاف حلقه‌ی انقباضی ضخیم‌تر نمی‌شود، گفته می‌شود که در این رشته-های اکتین مرتباً تجزیه می‌شوند. دپلیمریزه شدن رشته‌های اکتین باعث تنگ شدن حلقه‌ی انقباضی، عمیق شدن شکاف و در نهایت تفکیک سلول های دختر می‌شود.

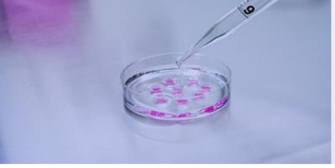



**شکل ۳۹- تقسیم سیتوپلاسم**. طرحی از حلقه انقباضی.

## ۱,۳۰ زمینه‌ی خارج سلولی و ارتباطات بین سلولی

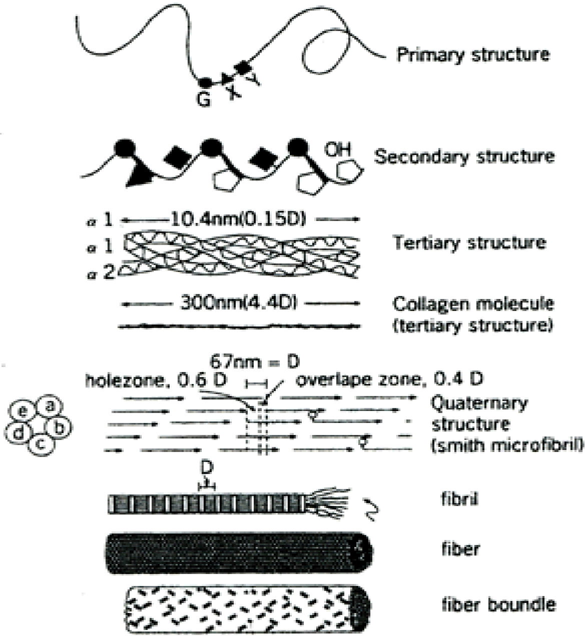
در موجودات پر سلولی اغلب بافت‌هایی تشکیل شده‌اند که به یکدیگر چسبیده‌اند و با هم ارتباط برقرار می‌نمایند. سلول های هم نوع یا مشابه به طور اختصاصی و محکم به یکدیگر متصل می‌شوند و این اتصالات را دستجاتی از مولکول‌های موجود در سطح سلول ها امکان‌پذیر می‌سازند. بعضی از سلول ها می‌توانند به سلول های غیر هم نوع نیز بچسبند که خواهیم دید این نوع ارتباط، در تمایز بافت‌ها اهمیت حیاتی دارند.

سلول ها همچنین به شبکه‌ای مرکب از پروتئین‌ها و قندهای مترشحه به نام زمینه‌ی خارج سلولی که فضاهای بین سلولی را پر می‌کند متصل می‌شوند. زمینه‌ی خارج سلولی تنها یک شبکه نیست که سلول ها را احاطه می‌کند و آنها را در جای خود نگاه می-دارد. 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. بنابراین چنین ساختاری می‌تواند به عنوان مخزن دایمی پیام‌هایی باشد که سلول های چسبیده به آن دریافت می‌نمایند. سلول ها برای اینکه تمایز یابند احتیاج به زمینه‌ی سلولی دارند. ریخت‌زایی بافت‌ها که مرحله‌ی نهایی شکل گیری یک موجود زنده است در اثر حرکت و تغییر آرایش سلول ها 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. برخلاف سلول های حیوانی، سلول های گیاهی در مراحل رشد حرکت نمی‌کنند، بنابراین در این فصل تأکید بر ارتباطات سلول های حیوانی با یکدیگر و با زمینه‌ی اطرافشان خواهد بود.



## ۱,۳۱  مولکول های کلاژن

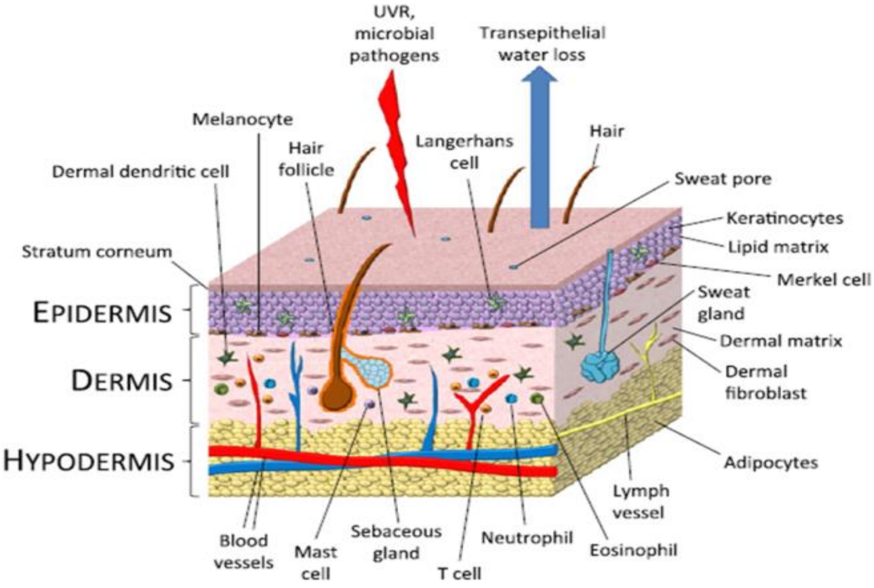
تمام مولکول‌های کلاژن مارپیچ سه پلی پپتیدی است. حداقل 16 نوع کلاژن در انسان شناسایی شده‌اند که هر کدام در بافت خاصی وجود دارد. تنوع این کلاژن‌ها به دلیل تفاوت در ماهیت پلی‌پپتیدی‌های تشکیل دهنده‌ی آنها است. از کنار هم قرار گرفتن مارپیچ‌های کلاژن، رشته‌های کلاژن به وجود می‌آیند. نحوه‌ی قرار گرفتن مارپیچ‌ها به نحوی است که انتهای مولکول‌های مجاور روی هم قرار می‌گیرند. این نحوه‌ی قرار گرفتن مارپیچ‌ها باعث می‌شود که رشته‌های کلاژن قابلیت کشش زیادی داشته باشند. دستجات متراکم این رشته‌ها در تاندون که ماهیچه را به استخوان متصل می کند، وجود دارند و با قابلیت کشش خود می‌توانند نیروهای زیادی را متحمل شوند. پلی پپتیدهای کلاژن پس  از ساخته شدن بر روی شبکه‌ی اندوپلاسمی خشن، هیدروکسیله و گلیکوزیله می‌شوند و در همین اندامک به شکل مارپیچ سه پلی پپتیدی در می‌آیند. در مرحله‌ی بعد اضافه شدن گروه‌های قندی دیگر به این ساختار در دستگاه گلژی صورت می‌گیرد و باعث استحکام ساختمان مارپیچ سه‌تایی کلاژن می‌شود. کلاژن به این شکل طی اگزوسیتوز، از جسم گلژی به بیرون سلول هدایت می‌شود. بنابراین مراحل بعدی تکامل ساختاری کلاژن در خارج سلول صورت می‌گیرد.




**شکل۴۰- رشته‌های کلاژن.** الف- مراحل ساخته شدن مولکول کلاژن (مارپیچ سه پپتیدی و تشکیل کلاژن رشته‌ای). در کلاژن رشته‌های مولکول‌های کلاژن‌ها به دنبال و در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند. اتصال بین مولکول‌های کلاژن با پیوندهای کووالان بین انتهای آمینو(N) و انتهای کربن(C ) مولکول مجاور برقرار می‌گردد و باعث پایداری می‌شود. پیوندها با خطوط قرمز نشان داده شده‌اند. خارج سلول مارپیچ سه تایی  به دنبال و درکنار یکدیگر قرار می‌گیرند.

انواع کلاژن بخش عمده‌ی ماده‌ی زمینه‌ای بافت پیوندی غضروف و استخوان را تشکیل می‌دهند. بیشتر سلول های پوششی و سایر دستجات منظم سلولی مثل ماهیچه بر روی زمینه‌ی نازکی به نام غشای پایه‌ای قرار گرفته‌اند. این غشا شبکه‌ی دو بعدی از

رشته‌های کلاژن است و در حقیقت محل اتصال سلول های اپیتلیال و یا اندوتلیال به بافت پیوندی نرم زیرین آنهاست. غشای پایه‌ای از یک طرف با پروتئین‌های چسبنده غشای پلاسمایی سلول ها و از طرف دیگر با رشته‌های کلاژن بافت پیوندی نرم اتصال برقرار می‌کند. بافت پیوندی نرم واجد تعداد زیادی سلول از جمله فیبروبلاست‌هاست که زمینه‌ی خارج سلولی را می‌سازند وجود پروتئین‌هایی مثل کلاژن و الاستین در زمینه‌ی سلولی این بافت موجب شکل‌گیری، استحکام و انعطاف‌پذیری آن می شود. 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 سلول ها در سطح بدن می‌رسانند، در بافت پیوندی نرم وجود دارند. نقش عمده‌ی زمینه‌ی سلولی در این بافت، تسهیل انتشار اکسیژن و مواد غذایی به سلول های سطحی(اپیتلیوم) و غده‌هاست. بافت پیوندی سخت در اعضایی 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 ۴۱- نمای شماتیک یک مقطع از پوست.** سلول های اپیدرم بر روی غشای پایه‌ای نازکی مستقر شده اند. غشای پایه‌ای با لایه‌ی ضخیم بافت پیوندی نرم ارتباط برقرار می‌کند. بافت پیوندی نرم از مقدار زیادی رشته کلاژن و سلول های مختلف تشکیل شده است.

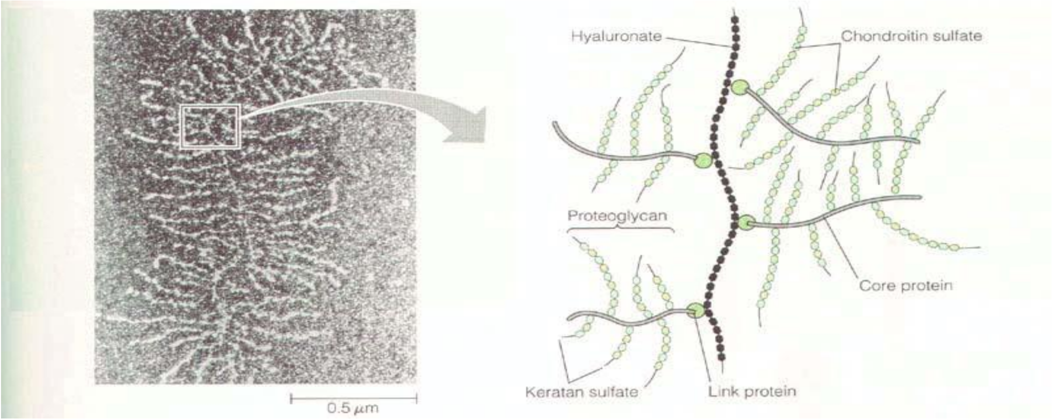
## ۱٫۳۲ اسید هیالورونیک

اسید هیالورونیک یکی دیگر از انواع مولکول‌های تشکیل دهنده‌ی زمینه‌ی خارج سلولی است. این ترکیب در بافت غضروف، و در بافت‌هایی که سلول ها در آن مهاجرت می‌کنند مانند بافت‌های در حال ترمیم و بافت‌های جنینی، جزء اصلی زمینه را تشکیل می‌دهد. سلول های مهاجر سلول هایی 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 حجیم شدن و ایجاد مقاومت در مقابل فشردگی است.

اسیدهای هیالورونیک در سطح بسیاری از سلول های مهاجر نیز وجود دارد. اسید هیالورونیک به دلیل داشتن طبیعت شل، آبکی و متخلخل، مانع از چسبیدن سلول ها به یکدیگر می‌شود و به آنها آزادی حرکت می‌دهد. کاهش در مقدار اسید هیالورونیک باعث توقف حرکت سلول ها و چسبیدن آنها به یکدیگر می‌شود. عملکرهای 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.

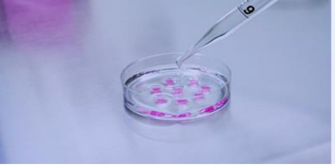
## ۱,۳۳ سایر مولکول ها

پروتئوگلیکان‌ها و گلیکوپروتئین‌ها هر دو ماکروملکوهایی 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. 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.




**شکل ۴۲- یک مجموعه از پروتئوگلیکان‌ها.** الف- تصویر سمت چپ میکروسکوپ الکترونی از یک مجموعه‌ی پروتئوگلیکان‌ها در غضروف و تصویر سمت راست طرح شماتیک از این مجموعه پروتئوگلیکان‌ها. مونومرهای پروتئوگلیکان توسط پروتئین‌های اتصالی در فواصل معین به دو طرف یک رشته‌ی اسیدهیالورونیک متصل شده‌اند.

هر دو این گلیکوپروتئین‌ها دارای جایگاه اتصال به گیرنده های سلولی و اجزای زمینه‌ی سلولی می‌باشند، بنابراین سلول ها را به زمینه‌ی اطرافشان متصل می کنند. یک مثال از نقش این ترکیبات در مهاجرت و تمایز سلول ها، طویل شدن اکسون‌ها است. طویل شدن و حرکت انشعاب اکسونی نورون‌ها 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، دایماً 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.

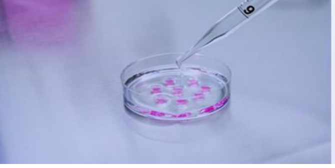
فیبرونکتین علاوه بر نقشی که در اتصال سلول ها به زمینه دارد، در تمایز سلول های جنینی و ترمیم زخم‌ها نیز دخالت دارد. فیبرونکتین‌ها به همراه کلاژن‌ها و پروتئوگلیکان‌ها زمینه‌ای با فشردگی کم به وجود می‌آورند و در نتیجه حرکت سلول ها از میان آن به آسانی صورت می‌گیرد. فیبرونکتین‌ها باعث سهولت در مهاجرت ماکروفاژها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

## ۱٫۳۴ پروتئین‌های اتصال سلول به سلول

یک ویژگی مهم بسیاری از بافت‌ها این است که سلول های مشابه در آنها به یکدیگر می‌چسبند، مثل سلول های اپیتلیال که سطح داخلی روده‌ی کوچک را فرش می‌کنند. در یک آزمایش، انواع بافت‌ها به سلول های تک و مجزا تفکیک شدند. سلول های حاصل از بافت های گوناگون مخلوط شدند و فرصت لازم برای تجمع مجدد به آنها داده شد. مشاهده شد که سلول های هم نوع، مانند سلول های کبدی، کلیه و شبکیه اکثراً یکدیگر را پیدا کردند و به طور اختصاصی به هم چسبیدند. سلول های هم نوع گونه‌-های مختلف جانداران نیز با یکدیگر اتصال برقرار می‌کنند. علت این اتصالات، وجود مولکول‌های ویژه بر سطح سلول های انواع بافت‌هاست. تعدادی از این پروتئین‌های اتصالی شناخته شده‌اند. یک سلول ممکن است بیش از یک نوع مولکول اتصالی بر سطح خود داشته باشد.

## ۱٫۳۵ نقش اتصال سلولی در تمایز و ریخت‌زایی

برقراری اتصال بین سلول ها و جدایی آنها، از مراحل ضروری در تمایز و ریخت‌زایی بافت است. مولکول‌هایی که در اتصال سلول ها شرکت می‌کنند اغلب گلیکوپروتئین‌های ساختاری غشای پلاسمایی هستند. طی تمایز سلول ها، تغییرات در میزان و طبیعت گلیکوپروتئین هاست که بر اتصال سلول ها به یکدیگر و جابجایی آنها تاثیر می‌گذارد. نقش کلیدی گلیکوپروتئین در مثال زیر ارایه می‌شود. پس از لقاح و هم جوشی هسته‌های اسپرم و تخمک، تخم چندین بار تقسیم می‌شود و توده‌ای از سلول های بهم چسبیده به نام مورولا به وجود می‌آورد. در این مرحله، گلیکو پروتئین اتصالی که عمدتاً تولید می‌شود اوومورولین است. سپس در اثر تمایز سلول های این ساختار، لایه‌های جنینی یعنی اکتودرم، مزودرم و اندودرم به وجود می‌آیند. مثلاً سلول های مزودرم اوومورولین را از دست می‌دهند و از لایه‌ی سلول های اکتودرم دور می‌شوند. در این حالت نیز سلول ها اوومورولین را از دست می‌دهند ولی مولکول دیگری به نام کادهرین N تولید می‌کنند. سلول های بخشی از اکتودرم که سلول های تاج عصبی را به وجود می‌آورند نیز اوومورولین را از دست می‌دهند و کادهرین N تولید می‌کنند. ولی تولید این مولکول توسط سلول های تاج عصبی در این مرحله موقتی است. زمانی که این سلول ها شروع به جابجایی می‌کنند، کادهرین N را از دست می‌دهند. وقتی این سلول ها به مقصد نهایی رسیدند، دوباره کادهرین N را تولید می‌کنند. به نظر می‌رسد که تولید مجدد این مولکول اتصالی همزمان با تجمع این سلول ها و تشکیل گانگلیون و تمایز نهایی آنها صورت می‌گیرد.



## ۱،۳۶ تعامل و همکاری سلول و زمینه‌ی سلولی طی رشد و تمایز

برای اینکه سلول های تمایز پیدا کنند و انواع بافت‌ها را به وجود آورند، حداقل دو نوع سلول که از لایه‌های مختلف جنینی مشتق می‌شوند باید با یکدیگر اندرکنش نمایند. این اندرکنش‌ها را القاء می‌گویند. سلول های مشتق‌شده از مزودرم می‌توانند سلول های اپیتلیال مجاور را القاء نمایند و باعث تمایز آنها شوند. القاء باعث به وجود آمدن پروتئین‌های ویژه در یک یا هر دو سلول شرکت کننده می‌شود. با این که بسیاری از جزییات اندرکنش‌های بین دو نوع سلول شناخته نشده‌اند، ولی زمینه‌ی سلولی که توسط این سلول ها تولید می‌شود نقش اساسی در فرآیندهای القایی بازی می‌کند. پوست و دستگاه عصبی به عنوان مثال ذکر خواهد شد.

پوست از لایه‌ی خارجی به نام اپیدرم و لایه‌ی داخلی به نام درم تشکیل شده است. اپیدرم از لایه ی اکتودرم جنینی و درم از لایه‌ی مزودرم جنینی مشتق می‌شوند. اپیدرم غشای پایه‌ای را می‌سازد و خود بر روی آن مستقر می‌گردد، در صورتی که مزودرم زمینه‌ی سلولی درم را به وجود می‌آورد که واجد کلاژن‌های رشته‌ای می‌باشد. ضمایم پوست مثل مو، فلس، پر و دندان همگی در نتیجه‌ی تولید تنظیم شده‌ی  پروتئین‌های خاص اپیدرم مثل کراتین به وجود می‌آیند. ویژگی‌های ضمایم سطحی پوست که در اپیدرم‌ها ساخته می‌شوند، توسط درم که در زیر آن واقع شده است تعیین می‌شوند. برای مثال، پرهایی که روی بال‌ها و قسمت بالای پاهای مرغ وجود دارند با یکدیگر متفاوت هستند. همچنین در ناحیه‌ی پایین پاهای مرغ به جای پر، پوست فلس مانند وجود دارد. اگر در مرحله‌ی جنینی سلول های درم جابجا شوند، مثلاً سلول های درم پاها جایگزین سلول های درم بال‌ها شوند، در بال ها پرهایی شبیه آنچه در پاها وجود دارد ظاهر می‌شوند. اگر این جایگزینی در مورد سلول های اپیدرم صورت گیرد، تغییری مشاهده نمی شود. بنابراین لایه‌ی درم تعیین کننده‌ی نوع ضمایم سطحی پوست است نه اپیدرم. به نظر می‌رسد که انواع زمینه-های سلولی که توسط سلول های تمایز یافته‌ی درم تولید می‌شوند و هورمون‌های رشد که توسط همین سلول ها ترشح می‌شوند، در تمایز سلول ها اپیدرم نقش حیاتی دارند.

عملکرد صحیح دستگاه عصبی بستگی به تماس‌های متعدد و درهم پیچیده‌ای دارد که طی تمایز، بین انواع سلول های عصبی ایجاد می‌شوند. تماس بین دو سلول عصبی را سیناپس می‌گویند در دستگاه عصبی سطحی، اعصاب حرکتی باید به طرز صحیح با ماهیچه‌ها ارتباط برقرار نمایند تا بتوانند حرکات بدن را تنظیم کنند. به راستی رشته‌های عصبی چگونه می‌دانند که به طرف کدام بافت حرکت کنند  و با آن ارتباط برقرار نمایند؟ جواب به این سوال در حقیقت چگونگی ساخته شدن دستگاه عصبی را روشن می-سازد. تماس سلول های عصبی با سایر سلول ها از طریق اکسون آنها صورت می‌گیرد. این ساختار طی تمایز از پیکر سلول عصبی منشعب می‌شود و به طرف سلول هایی که باید با آنها تماس برقرار کند پیش می‌رود. اکسون‌های در حال پیشروی، مرتباً گیرنده های سطحی خود را تغییر می‌دهند تا بتوانند در امتداد انواع زمینه‌ها که توسط سلول های مختلف تولید می‌شوند، حرکت کنند. آزمایش‌ها در جنین جوجه نشان داده‌اند که انتخاب مسیر توسط اکسون یک سلول عصبی به محل قرار گرفتن و انشعاب آن از طناب نخاعی بستگی ندارد، بلکه مولکول‌های اتصالی موجود بر سطح اکسون، آن را در مسیر معین هدایت می‌کنند. بنابراین اگر اکسون‌ها در جهت خاصی هدایت می‌گردند، به این دلیل است که بخش پیشرو آنها با ترکیبات زمینه‌ی سلولی در طول مسیر اتصال برقرار می‌کند.

## ۱،۳۷ مسیرهای انتقال پیام در سلول ها

به منظور تغییر در محیط پیرامونی سلول ها باید بتوانند پیام ها را دریافت کرده و نیز به آن ها پاسخ دهند. سلول های بدن قادرند به تحریکات مختلف شیمیایی، فیزیکی، مکانیکی و الکتریکی پاسخ دهند. سلول های منفرد اغلب بسیاری پیام ها را بصورت همزمان دریافت می کنند و می توانند با تجمیع این پیام ها عملکرد خود را با تغییر بیان ژن ها، تولید پروتئین ها، تغییر شکل

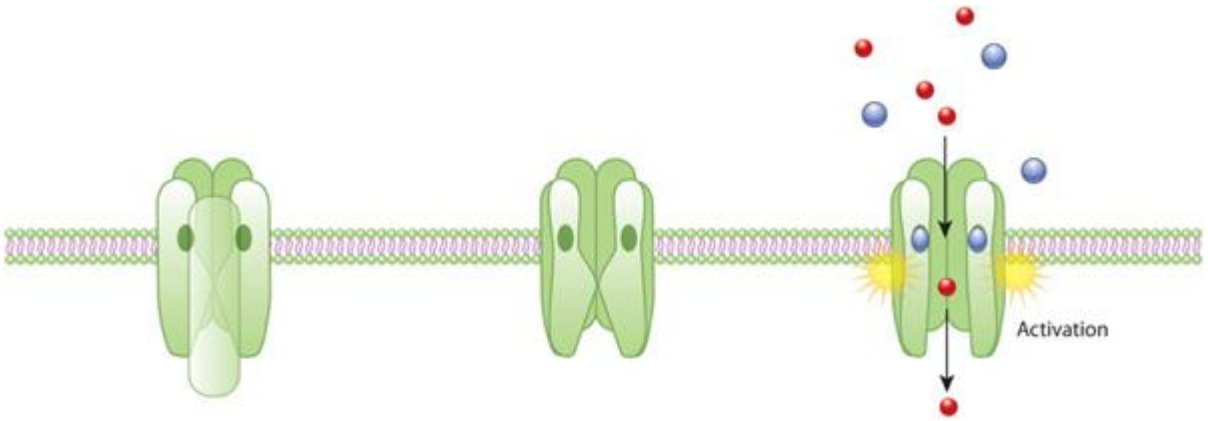
ظاهری سلول و . . .  تنظیم کنند. سلول ها فقط هدف پیام ها نیستند بلکه خود نیز با تولید پیام هایی عملکرد دیگر سلول ها را تنظیم می کنند و یا تغییراتی در محیط پیرامون خود ایجاد می کنند.

بیشتر پیام هایی که سلول ها دریافت می کنند شیمیایی هستند. فاکتورهای رشد، هورمون ها، اجزای محیط خارج سلولی مثال هایی از انواع پیام های شیمیایی هستند که سلول ها دریافت می کنند. این پیام ها ممکن است در محل تولید خود اثر کنند یا توسط مایعات بدن و گردش خون به نواحی دورتر بدن برده شوند و در آنجا موثر باشند. مثلاً نوروترانسمیترها مولکول های شیمیایی هستند که در فاصله ی بسیار کمی بین دو نورون (سلول های ویژه ی سیستم عصبی) و یا یک نورون و یک سلول عضلانی جابجا شده و بین محل تولید و مصرف آن ها در بدن غالباً فاصله ی بسیار کمی وجود دارد. از طرف دیگر هورمون FSH در مغز تولید شده و محل عملکرد آن سیستم تناسلی انسان است. برخی سلول ها به محرک های مکانیکی پاسخ می دهند. مثلاً سلول های حسی پوست فشار لمس را احساس می کنند و سلول های دیگری در گوش حرکت امواج صوتی را تشخیص می دهند.

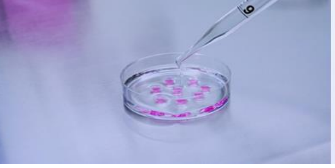
## ۱,۳۸ سلول ها چگونه پیام ها را دریافت می کنند؟

سلول ها پروتئین های ویژه ای بنام گیرنده دارند که به مولکول های پیام رسان متصل شده و پیام دریافتی از مولکول پیام رسان را با به راه اندازی آبشاری از واکنش های مولکولی در سلول ها، به درون سلول منتقل می کنند. گیرنده های پروتئینی سطح سلول برای مولکول های ویژه ای اختصاصی هستند و در صورت عدم وجود آن مولکول خاص یا مولکولی که به لحاظ فضایی بسیار شبیه مولکول مورد نظر باشد، تحریک نمی شوند.

گیرنده ها دارای یک قسمت بیرون سلولی هستند که در سطح خارجی غشای پلاسمایی قرار دارد و یک قسمت درون سلولی دارند که با پروتئین ها و دیگر مولکول های درون سلول در ارتباط است. گیرنده های غشایی به سه گروه تقسیم می شوند: گیرنده های جفت شونده با پروتئین G، کانال های یونی و گیرنده های متصل به آنزیم ها. نام این گیرنده ها وابسته به مکانیسمی است که توسط آن این گیرنده ها پیام های دریافتی را به درون سلول منتقل می کنند. یعنی از طریق باز شدن کانال ورود یون های خاص به سلول، فعال شدن پروتئین G و یا فعال شدن آنزیمی خاص. از آن جا که گیرنده ی غشایی پیام های خارج سلولی را به فعالیت های مولکولی درون سلولی متصل می کنند، به مولکول های مختلف اجازه می دهند که بدون ورود به سلول فعالیت سلول را تحت تاثیر قرار دهند. این مسئله بسیار مهم است چرا که اغلب مولکول های زیستی که پیام ها را منتقل می کنند برای عبور از غشا بسیار بزرگ هستند و یا بار الکتریکی آن ها اجازه ی عبور آن ها را از غشا نمی دهد.




شکل ۴۴- فعال شدن کانال عبور یون ها



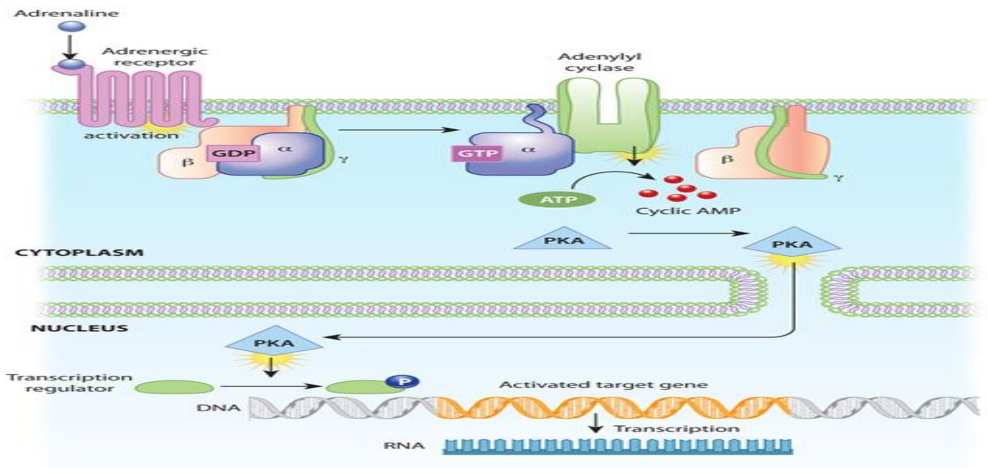
یک گیرنده ی استیل کولین به صورت یک دروازه در غشای پلاسمایی ایفای نقش می کند. این دروازه یک کانال آبی است و در نتیجه برخی مواد محلول در آب را از خود عبور می دهد. توجه داشته باشید که کانال ها بدلیل ساختار خاص بیوشیمیایی که دارند بسیار انتخابی عمل می کنند و تنها یون ها یا مولکول های خاصی را از خود عبور می دهند. این دروازه پیش از رسیدن و اتصال به پیام مورد نظر که در اینجا مولکول استیل کولین است، بسته باقی می ماند. بعد از اتصال مولکول استیل کولین به این گیرنده، این دروازه باز شده و اجازه ی عبور یون ها و ورود آن ها به سلول را می دهد. لازم به ذکر است که این گیرنده فقط به استیل کولین متصل می شود و نسبت به سایر مولکول های پیام رسان واکنشی ندارد. اغلب گیرنده ها فقط با یک مولکول پیام رسان واکنش می دهند چرا که در ساختارشان محلی قرار دارد که مختص به آن مولکول پیام رسان است و مثل قفل و کلید فقط با همان مولکول پیام رسان واکنش می دهد.

البته برخی گیرنده ها هم روی غشای پلاسمایی قرار ندارند بلکه در درون سیتوپلاسم سلول و یا حتی در درون هسته ی سلول هستند و مولکول های انتقال پیام برای فعال کردن آن ها باید از غشای سلولی عبور کنند. مولکول های فعال کننده ی این گیرنده ها بدلیل اندازه ی بسیار کوچک یا ماهیت شیمیایی (جنس لیپیدی آن ها که اجازه ی گذشتن از غشای لیپیدی را به مولکول می دهد) از غشای پلاسمایی گذشته و به گیرنده می رسند. گاز اکسید نیتروژن بدلیل اندازه ی کوچک و هورمون های استروئیدی بدلیل ماهیت لیپیدی ساختارشان در این دسته قرار می گیرند. به منظور تغییر در محیط پیرامونی سلول ها باید قادر به دریافت پیام های باشند که در خارج سلول ها تولید می شوند.

وقتی یک پروتئین گیرنده، پیامی را دریافت می کند، دچار تغییر شکل فضایی شده که این تغییر شکل یک سری از واکنش های بیوشیمیایی را در درون سلول به راه می اندازد. این مسیرهای پیام رسانی درون سلولی که همچنین آبشار انتقال پیام نامیده می شوند، پیام دریافتی را تا چند برابر تقویت می کنند. به بیان دیگر وقتی یک گیرنده ی منفرد سطح سلولی فعال می شود، با تغییر شکل فضایی چند مولکول متصل به خود را فعال می کند. هرکدام از این مولکول های فعال شده چند مولکول دیگر را فعال می کنند و به همین ترتیب یک پیام ضعیف تا چندین برابر در سلول تقویت می شود. اما این اتفاق تا چه زمانی ادامه دارد؟ تا فعال شدن یک سیستم کنترلی که بعد از تغییر فعالیت سلول در اثر پیام رسیده وظیفه ی پایان دادن پیام را به عهده دارد.

به زبان ساده تر مراحل دریافت و پاسخ گویی سلول به پیام به ترتیب به شرح ذیل است: رسیدن یک مولکول پیام رسان به گیرنده ی سطح سلولی ویژه ی آن پیام، تغییر شکل فضایی مولکول گیرنده و فعال کردن پروتئین های زیر مجموعه و یا باز شدن یک کانال انتقال یون ها در سطح سلول، تقویت شدن پیام در یک آبشار مولکولی، تغییر فعالیت سلول در اثر تغییر در بیان ژن ها مثل کم و زیاد شدن بیان ژن ها یا روشن و خاموش شدن ژن های خاص، فعال شدن سیستم های کنترل کننده ای که وظیفه ی خاموش کردن پیام را به عهده دارند. این سیستم های کنترل کننده باعث می شوند که پیام های رسیده به سلول اثرات بیش از اندازه ای روی سلول ها نداشته باشند. توجه کنید که بسیاری از سرطان ها می تواند در اثر مختل شدن همین سیستم های کنترلی ایجاد شود. یعنی سلول ها با پیام خاصی که دریافت می کنند شروع به تکثیر می کنند اما سیستم کنترلی که تقسیم آن ها را پایان دهد وجود ندارد.

فعال شدن یک گیرنده می تواند سبب آغاز تولید مولکول های خاصی بنام پیام برهای ثانویه شود که مسئول به راه اندازی آبشارهای مولکولی گفته شده هستند. برای مثال فعال شدن گیرنده های خاصی که متصل به آنزیم آدنیلیل سیکلاز هستند منجر به فعالیت این آنزیم و تبدیل ATP به AMP حلقوی می شوند که یک پیام بر ثانویه ی عمومی است و در بسیاری از مسیرهای پیام رسانی نقش دارد. این ماده اولین پیام بر ثانویه ای بود که شناخته شد. AMP های تولید شده آنزیمی بنام پروتئین کیناز A را فعال می کنند که بسیاری از پروتئین ها را با اتصال گروه فسفات به آن ها فسفریله می کند. پروتئین ها در اثر فسفریله شدن دچار تغییر شکل فضایی شده و فعال می شوند و اقداماتی که به عهده ی آن ها است انجام می دهند



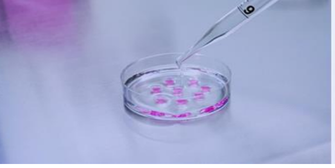

شکل۴۵- مسیر انتقال پیامی که AMP حلقوی در آن نقش دارد.

اتصال آدرنالین به یکی از گیرنده هایش در سطح سلول متصل می شود که آبشار مولکولی را درون سلول به راه می اندازد. این آبشار وقتی آغاز می شود که آدنیلیل سیکلاز که یک آنزیم متصل به غشا است توسط مولکول پروتئین G متصل به گیرنده فعال شود. بعد از اتصال آدرنالین به گیرنده، گیرنده دچار تغییر شکل فضایی شده که باعث می شود مولکول GDP موجود در ساختار پروتئین G با یک مولکول GTP تعویض شود. در این صورت یکی از سه زیرواحد پروتئین G از دو زیرواحد دیگر جدا شده و به آدنیلیل سیکلاز متصل گشته و آن را فعال می کند. در نهایت با فعال شدن آنزیم پروتئین کیناز A، این آنزیم پروتئین های هدفش را با افزودن یک گروه فسفات فسفریله کرده و فعال می کند. فعال شدن این پروتئین ها منجر به تغییر در رونویسی بعضی ژن ها و در نهایت تغییر در رفتار سلول می شود. مثلاً سلول را وادار به مهاجرت، افزایش یا کاهش تقسیم سلولی، افزایش یا کاهش میزان ساخت برخی اندامک ها می کند. توجه داشته باشید که در این آبشار تعداد زیادی مولکول دخالت دارند که در این جا برای فهم ساده تر تعداد کمی از آن ها نشان داده شده اند. در این جا مکانیسم کنترلی پایان دهنده ی پیام، فعال شدن آنزیم فسفودی استراز است که AMP حلقوی را می شکند و آبشار مولکولی را متوقف می کند.

مثال های دیگر پیام برهای ثانویه شامل دی آسیل گلیسرول، و IP3 هستند که هر دو توسط آنزیم فسفولیپاز تولید می شوند. آنزیم فسفولیپاز نیز یک پروتئین غشایی است. IP3 باعث افزایش غلظت کلسیم داخل سلولی می شود که خود کلسیم نیز یک پیام بر ثانویه است. کلسیم و دی آسیل گلیسرول باعث فعال شدن آنزیم پروتئین کیناز C می شوند که مانند مثال قبل دسته ای از پروتئین ها را فسفریله می کند و آبشار انتقال پیام را تقویت و هدایت می کند. تفاوت مسیرهای مختلف در نوع گیرنده، پیام بر ثانویه، مولکول های هدف (دسته ای از پروتئین ها که در اثر فعال شدن مسیر فسفریله می شوند) و در نهایت نوع پاسخی است که سلول به آن ها می دهد.

## ۱,۳۹ انواع حالت های پیام رسانی

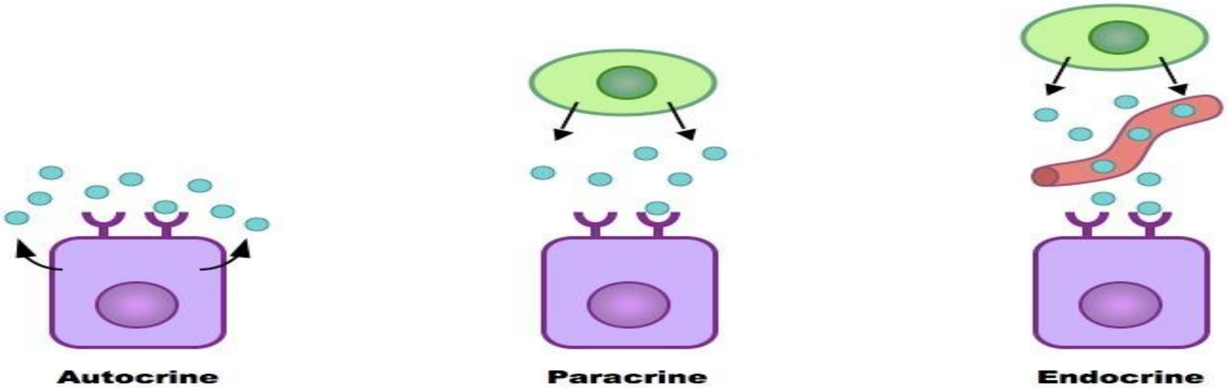
مسیرهای پیام رسانی مختلف شیمیایی در ارگانیسم های چند سلولی غالباً به سه گروه تقسیم بندی می شوند: اندوکرین، پاراکرین و اتوکرین. در پیام رسانی اندوکرین مولکول های پیام رسان که هورمون نامیده می شوند، از منبعی از سلول ها ترشح شده و در محل دیگری از بدن که با منبع ترشح هورمون فاصله دارد تاثیر می گذارد. مثالی از این نوع پیام رسانی افزایش جذب گلوکز در سلول ها توسط انسولین است. انسولین هورمونی است که توسط سلول های بتای پانکراس تولید شده و در خون ترشح



می شود، و با جریان خون به تمام بدن می رسد و روی کانال های گلوکز که گیرنده ی انسولین هستند تاثیر گذاشته و آن ها را باز می کنند و موجب ورود گلوکز به سلول های بدن می شوند.

پیام رسانی پاراکرین مربوط است به انتقال پیام بین سلول هایی که در همسایگی هم قرار دارند. این مسیر پیام رسانی در طی تکوین موجودات زنده اهمیت زیادی دارد. سلول ها توسط این شیوه ی پیام رسانی رفتار سلول های اطراف خود را تنظیم می کنند. همچنین انتقال پیام بین سلول های عصبی هم مثالی از این نوع پیام رسانی است. مولکول های پیام رسان که در سیستم عصبی نوروترانسمیتر نامیده می شوند توسط نورون ها تولید شده و در فضای کمی که بین دو نورون وجود دارد ترشح می شوند. این پیام ها به نورون دیگر رسیده و به گیرنده ی خود متصل می شوند و پیام را از یک نورون به نورون دیگر منتقل می کنند.

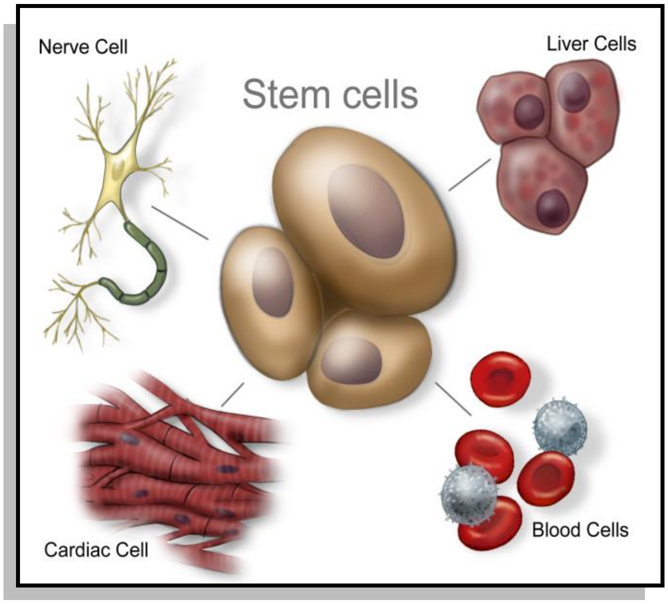
در پیام رسانی اتوکرین یک سلول به پیام هایی که خود تولید کرده پاسخ می دهد. توجه کنید که گاهی بعضی مسیرها حتماً باید توسط محرک خاصی فعال شوند امکان فعال سازی آنها از درون سلول وجود ندارد. سلول ها به عنوان واحدهای هوشمند می توانند این کار را برای خود انجام دهند و در صورت نیاز با تولید یک مولکول پیام رسان و پاسخ دادن به آن رفتار خود را تنظیم نمایند. مثالی از این نوع پیام رسانی در سیستم ایمنی رخ می دهد. سلول های T سیستم ایمنی به نابود کردن ارگانیسم های مهاجم آسیب رسان به بدن کمک می کنند و در صورت تشخیص حضور آن ها فاکتورهای رشدی را تولید کرده که خود به آن ها پاسخ می دهند. در نتیجه وقتی یک سلول T با عامل مهاجم برخورد می کند پیام رشد به خودش ارسال می کند و در نتیجه دریافت این پیام که خودش تولید کرده تعداد این سلول ها افزایش می یابد تا نابودی عامل مهاجم سریعتر انجام شود. اینکه سلول ها به چه پیام هایی پاسخ دهند و پاسخ آن ها به صورت باشد و همچنین شدت پاسخ سلول به پیام بستگی به نوع و تعداد مولکول های گیرنده ای دارد که روی سطح سلول حضور دارند یعنی اگر سلولی گیرنده ی پیامی را نداشته باشد به آن هیچ پاسخی نخواهد داد. از طرف دیگر ممکن است پاسخ دو سلول متفاوت به یک پیام یکسان با توجه به تفاوت گیرنده های آن ها یا تعداد این گیرنده ها متفاوت باشد. در واقع نوع گیرنده ها مشخص می کند که چه سلولی هدف چه پیامی قرار گیرد و چه پاسخی به پیام رسیده بدهد.




شکل ۴۶- تصویر شماتیکی از انواع پیام رسانی های شیمیایی در سلول های زنده. در اتوکرین سلول به پیام تولید شده توسط خودش پاسخ می دهد. پیام رسانی پاراکرین با استفاده از فاصله ی کم بین سلول ها و بدون نیاز به جریان خون رخ می دهد و پیام رسانی اندکرین با آزاد شدن مولکول های پیام(هورمون ها) در خون و تحویل آن ها به سلول های سرتاسر بدن انجام میشود.

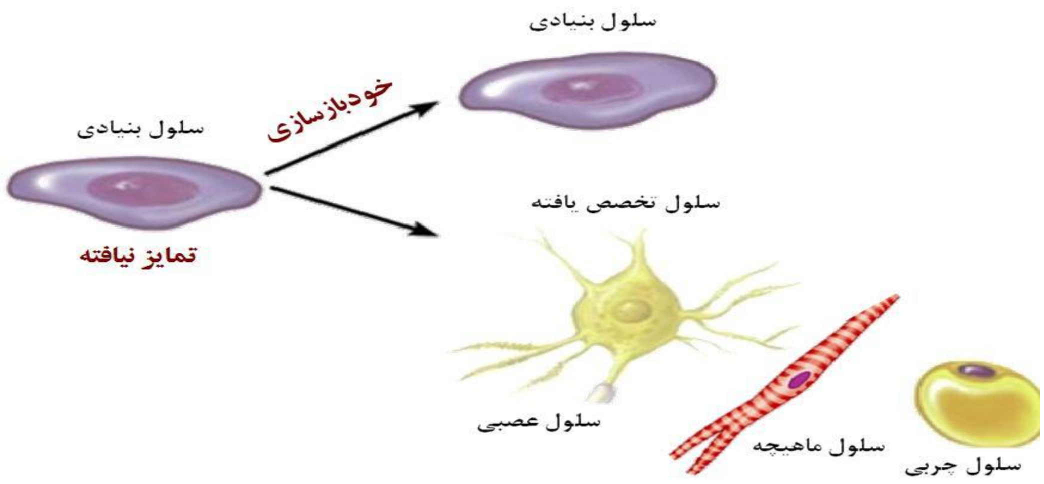
# فصل دوم

## سلول های بنیادی ۲

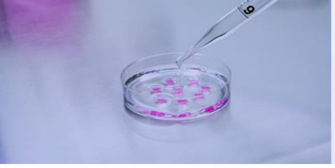


سلول بنیادی نامی کلی است و به گروهی از سلول های بدن گفته می شوند که دارای چند ویژگی مهم می باشند:

۱. این سلول ها تخصص نیافته هستند.
۲. مجدداً در بدن از طریق تقسیم سلولی خود را تولید و تکثیرمی کنند.
۳. عمری طولانی دارند.
۴. در شرایط آزمایشگاهی، می توان آنها را به سلول هایی متخصص با اعمال و فعالیت مشخص تبدیل کرد. به عبارتی در محیط کشت و در مجاورت عوامل مغذی خاصی با دست کاری یک سلول بنیادی در حالت پایه، در سلول ژن هایی را فعال نموده و سلول بنیادی مجبور به ایجاد عواملی پروتئینی در داخل و سطح خود می شود و در نهایت به یک سلول مشخص تبدیل می شود. سلول های بنیادی تقریبا 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 تمایز در بازسازی و ترمیم بافت های مختلف بدن بدنبال آسیب و جراحت 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 ۴۷-تمایز سلول های بنیادی**



سلول های بنیادی تهیه کننده سلول های جدید هستند. وقتی که سلول های بنیادی تقسیم میشوند، می توانند سلول های مانند خودشان تولید کنند و یا میتوانند سلول های دیگری از نوع دیگر تولید کنند. برای مثال سلول های بنیادی پوست میتوانند سلول های بنیادی پوست بیشتری بسازند یا میتوانند 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 میروند. زمانی که این اتفاق میافتد، سلول های بنیادی فعال می شوند. سلول های بنیادی مسئول ترمیم کردن بافتهای 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 میدارند و باعث جلوگیری از پیری زودرس ما میشوند.

بر اساس توان تمایزی و برگشت پذیری آنها، سلول ها را می توان به انواع زیر تقسیم کرد:

۱- همه توان (totipotent): سلول هایی هستند که می توانند همه سلول ها اعم از سلول های جنین و بافت های خارج جنینی را تولید کنند. بافت های خارج جنینی بافت هایی هستند که طی تبدیل سلول تخم به جنین پر سلولی بوجود آمده ولی در ساختار بدن جنین مشارکت نمی کنند بلکه وظیفه ی آنها اغلب اتصال جنین به بدن مادر است.

۲- پر توان(pluripotent): سلول هایی هستند که میتوانند غالب یا همه سلول های فرد را بسازند، ولی قادر به ایجاد بافت های خارج جنینی نیستند. سلول های بدست آمده از توده سلولی داخلی (ICM) جنین در مرحله بلاستوسیست و سلول های که از گنادهای جنینی بدست میآیند و به آنها سلول های زاینده جنینی گفته میشوند و سلول های کارسینومای جنینی و مشتق از تراتوکارسینوما نیز جزو این دسته اند.

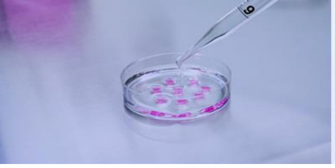
۳- چند توان (multipotent): تعداد محدودتری از انواع سلول ها را ایجاد می کنند. این سلول ها توان تولید همه ی ۲۰۰ نوع سلول شناخته شده در بدن انسان را ندارند بلکه هرکدام قادر به تولید تعداد مشخصی از سلول ها هستند. از جمله این سلول ها می توان سلول های بنیادی مغز استخوان انسان را نام برد.

## ۲,۱ انواع سلول های بنیادی

سلول های بنیادی را به لحاظ منشا بدست آمدن به گروه هایی می توان تقسیم کرد. طبق یک تقسیم بندی، سلول های بنیادی دارای دو منشا جنینی و بزرگسال هستند. سلول های بنیادی جنینی را می توان در مرحله تشکیل بلاستوسیست از توده ی درونی جنینی سلول ها را جدا کرده و در آزمایشگاه کشت می کنند.

دسته دیگر، سلول های بنیادی بزرگسالان هستند که در بسیاری از بافت های تخصصی بدن از جمله مغز، مغز استخوان، کبد، پوست، لوله گوارش، قرنیه و شبکیه چشم و حتی پالپ عاج دندان نیز یافت می شوند. در اغلب بافت های افراد بزرگسال، سلول های بنیادی وجود دارند که وظیفه آن ها جایگزینی مداوم سلول های از بین رفته با سلول های تازه و جوان است . بافت هایی مانند پوست، عضله، روده و مغز استخوان از جمله بافت هایی هستند که دارای سلول های بنیادی ویژه بافت و یا سلول های بنیادی بزرگسالان هستند . در مغز استخوان، روزانه میلیارد ها سلول خونی توسط سلول های بنیادی خون ساز تولید می شوند. سلول های بنیادی بزرگسالان ویژه بافت هستند، به این معنی که این سلول ها قادرند به انواع سلول های موجود در آن بافت تبدیل شوند و به خودی خود قادر نیستند به سلول های موجود در خارج از آن بافت تبدیل شوند. هر چند مطالعات نشان می دهند که بافت هایی همانند قلب نیز دارای سلول های بنیادی هستند ولی عملکرد و نوع آن ها کاملا مشخص نشده است.

اصطلاح سلول های بزرگسالان طیف کاربردی وسیعی از سلول های بنیادی به دست آمده از بافت های جفت، خون بند ناف تا مغز استخوان را شامل می شود.

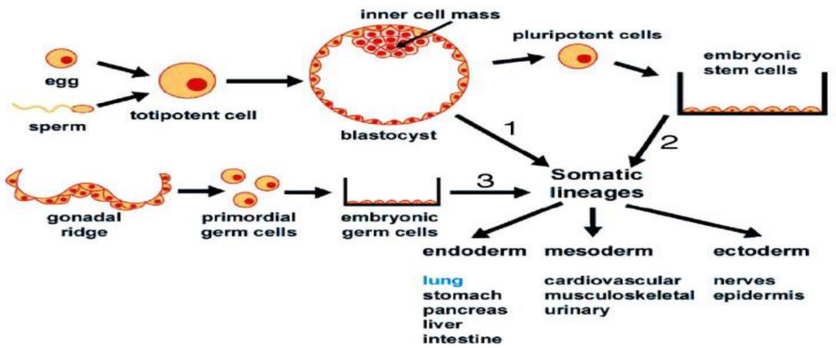


در پزشکی امروزه تنها در چند بیماری محدود از سلول های بنیادی ویژه بافت به صورت گسترده ای استفاده می شود. این موارد شامل استفاده از سلول های بنیادی خون ساز مغز استخوان و خون بند ناف برای درمان سرطان ها، سلول های بنیادی پوست برای درمان سوختگی ها و سلول های بنیادی لیمبال برای درمان نقص سلول های لیمبال قرنیه 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.

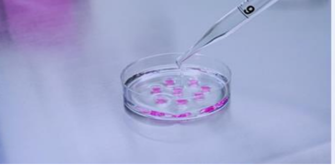
## ۲,۲ سلول های بنیادی جنینی (Embryonic stem cell)

برای اولین بار در سال ۱۹۸۱، سلول های بنیادی جنینی موشی، توسط دو دانشمند به نام های مارتین و اوانس در محیط آزمایشگاه از بلاستوسیست در حال رشد جدا شدند. سلول های بنیادی جنینی به طور اختصاصی قادر به تشکیل هر سه لایه جنینی در محیط آزمایشگاه بودند آنها همچنین قادر بودند در محیط کشت به صورت تمایز نیافته تحت تقسیمات متقارن تکثیر شده و یک جمعیت سلولی هموژن (خالص) را ایجاد کرده و همچنان خصوصیات ژنتیکی خود را حتی در کشت طولانی مدت در محیط آزمایشگاهی حفظ کنند. سلول های بنیادی جنینی خود براساس پتانسیل تمایزی و زمان جداسازی از بلاستوسیست، به چند گروه تقسیم میشوند:

۱. سلول های بنیادی جنینی جداشده از جنین اولیه در مرحله (۴-۲ روزهای اولیه گاسترولاسیون) همه توان بوده و قادر به تشکیل هر نوع سلول یا اندام خارج جنینی مثل جفت و حتی جنین کامل می باشند.
۲. سلول های بنیادی جنینی گرفته شده از جنین مسن تر، در مرحله بلاستوسیست (روز 7 -5 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 جنین کامل را ایجاد نمایند.
۳. سلول های بنیادی مسن تر از مرحله قبل چند توان بوده که قادر به ایجاد انواع سلول های بافتی می باشند.



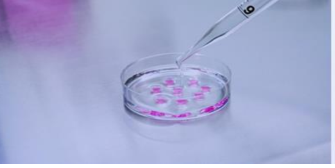

**شکل ۴۸- تصویر شماتیک از محل سلول های بنیادی جنینی در بلاستوسیست اولیه.** سلول های بنیادی جنینی از توده سلولی داخلی جدا شده‌اند و آنها قادر به تشکیل هر سه لایه جنینی می باشند.



سلول های بنیادی جنینی همراه با منشاشان تعریف می شوند. این سلول ها از مرحله بلاستوسیست جنین 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 جنینی انسانی در سال ۱۹۹۸ توسط تامسون و همکارانش گزارش شد. علاوه بر این مطالعه سلول های کارسینومای جنینی موشی و انسانی به تولید و رشد سلول های بنیادی جنینی کمک نموده است.  تا کنون تنها از سه گونه از پستانداران سلول های بنیادی جنینی 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 جنینی، 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 جنینی بدست امده 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 جنینی و سلول های زاینده جنینی گونه های دیگر صورت گرفته است. علاوه بر این تا کنون از گونه های دیگر نیز سلول های بنیادی جنینی تهیه شده است که از ان 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 جنینی سایر گونه ها غیر از موش گزارش نشده است. در حقیقت منشا سلول های بنیادی جنینی مشخص نیست و معلوم نیست که آیا سلول های بنیادی جنینی، سلول هایی در توده سلولی داخلی بلاستوسیست هستند و یا آنکه همان توده سلولی داخلی بلاستوسیست تحت شرایط آزمایشگاهی تبدیل به سلول های بنیادی جنینی می شوند.  به هر حال برای اهداف تحقیقاتی، تعریف یک سلول بنیادی جنینی، بیش از سلول بنیادی با توان تقسیم زیاد مشتق از جنین است که می تواند تقریبا به تمام سلول های بدن تمایز یابد.  بنابراین بیان نکات با اهمیت و خاص در تعریف سلول های بنیادی جنینی ضروری است.  بر اساس تعریف اسمیت که مطالعات فراوانی بر سلول های بنیادی جنینی موشی دارد، مشخصات زیر را برای تعریف سلول های بنیادی جنینی 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 کاریوتایپ طبیعی کروموزومی بوده و این حالت را نیز حفظ نماید.
۴. سلول های بنیادی جنینی پرتوان بتوانند انواع سلول تمایز یافته که از سه لایه زاینده اولیه جنین است را بوجود آورند.
۵. طی تکوین دارای توان ادغام در تمام بافت های جنینی 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. بیان فاکتور نسخه برداری.  oct-4  این فاکتور سبب تحریک یا مهار دسته ای از ژن ها می شود که سلول های بنیادی جنینی 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 جنینی، بیشتر زمانشان را در فاز S هستند.
۱۱. سلول های بنیادی جنینی، غیر فعال شدن کروموزوم X را نشان نمی دهند.



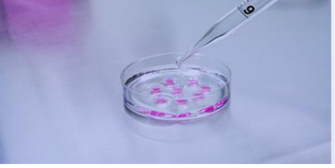
## ۲٫۳    سلول های بنیادی بالغ (Adult Stem Cell)

سلول های بنیادی پس از دوره جنینی در بافت های بدن (مثل پوست، مغز، عضلات، عروق خونی، قلب، مغز 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 جنینی کمتر است. سلول های بنیادی بالغ، سلول های سوماتیکی هستند که از بافتهای مختلف بدن جدا شده 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 اندامها و بافتها درسرتاسر زندگی یافت می شوند و سلول های موجود درآن 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.

## ۲٫۴    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 میزان اهدا کننده 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 وترشح 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 کشت می شوند. این سلول ها حاوی آنتی ژنهای 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 اخیرا 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.



## ۲,۵ سلول های بنیادی مغز استخوان (Bone Marrow Stem Cell)

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:

## ۲,۶ سلول های بنیادی خون ساز (Hematopoietic Stem Cells: HSC)

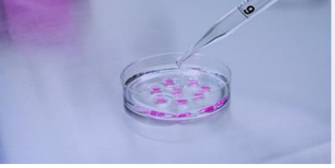
سلول های بنیادی خونساز، سلول های چند توان بوده که به صورت ذخیره سلولی برای انواع سلول های خونی در مغزاستخوان وجود دارند. این سلول ها قادر به ایجاد انواع سلول های خونی بالغ از جمله اریتروسیتها، گرانولوسیتها، مونوسیتها، ماست سل ها، لنفوسیت ها و مگاکاریوسیتها می باشند. تعداد این سلول ها در مغز استخوان بسیار محدود بوده و در واقع به ازای هر ۱۰۴ سلول مغز استخوان یک سلول بنیادی خونساز وجود دارد ولی این سلول ها به اتکاء رفیتشان 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.

## ۲,۷ سلول های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells: MSCs)

سلول های بنیادی مزانشیمی، سلول های چند توان هستند که توانایی تمایز به انواع دودمانهای 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 توسطFriedenstein  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.

## ۲,۸ خصوصیات سلول های بنیادی مزانشیمی(Mesenchymal Stem Cell)

خصوصیات MSCs در بین آزمایشگاههای مختلف و گونه های حیوانی مختلف یا مدلهای آزمایشگاهی، متفاوت می‌باشد. 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 وعملکردی 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 بافتها 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 می‌کند و یا سلول های بنیادی موجود در بافتهای ویژه که در زمان بیماری و یا جراحت پاسخ داده و وارد عمل می‌شود. 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 جراحت بیشتر از اثر مستقیم آنها (تمایز به سلول های بالغ بافت) در ترمیم بافت آسیب دیده موردنظر 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 4 ساعت بعد از کشت اولیه 2 روز در محیط کشت به صورت خاموش - به کف ظرف کشت چسبیده و ساکن می شوند. این سلول ها در حدود 4 باقی مانده و سپس شروع به تقسیم کرده و با قدرت بالا تکثیر میشوند. این سلول ها خاصیت کلونی زایی داشته وکلنی 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.

## ۲٫۹ سلول های بنیادی عصبی(Neural Stem Cell)

سلول های بنیادی عصبی یک جمعیت خودنوزا می باشند که توانایی تمایز به نورون 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.

## ۲٫۱۰ خصوصیات سلول های بنیادی عصبی

یک سلول بنیادی برای آنکه بتوان آن را به عنوان سلول بنیادی عصبی شناخت باید دارای سه خصوصیت باشد:

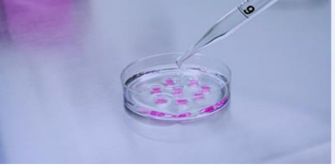
۱-یک سلول بنیادی عصبی، سلول چند توانی است که قادر به تکثیر و تولید پیش سازهایی است که قابلیت تبدیل به سه نوع اصلی سلول های سیستم اعصاب مرکزی را دارد :یعنی آستروسیتها، الیگودندروسیتها، و نورونها.

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.

## ۲٫۱۱ سلول های 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



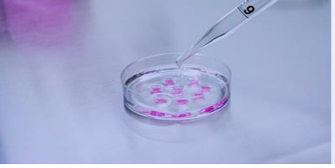
## ۲,۱۲ کاربردهای سلول های بنیادی عصبی

در مطالعات اخیر نشان داده شده که پیوند سلول های پیش ساز عصبی مشتق از مغز انسان بزرگسال به مدل حیوانی مبتلا به ضایعه ی 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.

## ۲,۱۳ 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 اندومتریوم با میومتریوم بصورت نامنظم است و هیچ بافت زیر مخاطی برای جدا کردن بافت غده ای اندومتریال از بافت ماهیچه ای صاف میومتریال زیر آن وجود ندارد. اندومتریوم و میومتریوم (زیر اندومتریوم) هر دو از مجاری مولر در طول زندگی جنینی منشا می گیرند. درصورتی که میومتریوم خارجی منشا غیر مولرینی دارد. ریزش لایه فانکشنال اندومتریوم در زمان قاعدگی و بازسازی دوباره آن از لایه قاعده ای یا بازال نشان می دهد که سلول های بنیادی بالغ همگی در این لایه بازال قرار دارند و از آنجا که اندومتریوم حاوی غدد، اپیتلیوم سطحی و استروما می باشد، چنین گفته می شود که هر دو سلول های بنیادی و پیش ساز استرومال و اپیتلیال مسئول بازسازی اندومتریوم می باشند .
سلول های بنیادی/اجدادی بزرگسال مسئول نوزایی اندومتریوم می باشند. این امر که سلول های بنیادی اندومتریال مسئول بازسازی لایه اندومتر رحم در هر سیکل قاعدگی است از سال ها پیش گزارش شده است اما تلاش برای جداسازی و شناسایی خصوصیات سلول های بنیادی آندومتریال فقط در طی چند سال اخیر، بعد از شناسایی سلول های بنیادی و پروژنیتور سایر بافت ها، طی آزمایشاتی پیگیری شده است.

سلول های بنیادی بالغ بوسیله خصوصیات عملکردی و بیان مارکرهای خود شناسایی می شوند. شواهدی برای وجود سلول های بنیادی بالغ و سلول های پروژنیتور در اندومتر رحم انسان و موش با بررسی سلول های بنیادی عملکردی در بافت ها و سلول های رحمی فراهم آمده است. این مطالعات عملکردی بر سلول های بنیادی و پروژنیتورهای همراه با تکثیر اندومتریال، زمینه را برای شناخت فیزیولوژی و پاتولوژی انواع بی نظمی های غیر طبیعی اندومتر رحم شامل سرطان اندومتر، هایپرپلازیای اندومتری، اندومتریوزیس و آدنومیوزیس و. . . فراهم ساخته است. این سلول ها ، قابلیت تمایز به آدیپوسیت، میو بلاست، کندروسیت و استئوبلاست را در محیطهای تمایز مناسب، از خود نشان داده اند. این مطالعه نشان داد که جمعیت سلول های بنیادی اندومتریال حاوی سلول های بنیادی مزانشیمی مشابه با مغز استخوان می باشد. این سلول ها براحتی قابل تکثیر بوده و از آنجایی که با یک بیوپسی ساده از اندومتر بدست می آیند و نیز مشکلات اخلاقی ندارند، میتوانند بصورت اتولوگ در درمانهای مختلف مورد استفاده قرار گیرند. علاوه بر این، سلول های بنیادی اندمتریال توانایی تمایز به سلول های بافتهای دیگر مانند استخوان ، چربی و غضروف را از خود نشان داده اند. بنابراین، اندومتریوم انسانی منبعی جدید برای سلول های بنیادی در سلول درمانی بشمار می آید. این مفهوم که سلول های بنیادی / اجدادی قاعده ای مسئول بازسازی قابل توجه اندومتر هستند، سال ها قبل پیشنهاد شد. شواهد غیر مستقیم برای وجود سلول های بنیادی /اجدادی بزرگسال در اندومتر مشخص شده است. تلاش برای جدا کردن و مشخص کردن ویژگی های سلول های بنیادی/ اجدادی به تازگی تحت عنوان آزمون شناسایی سلول های بنیادی بالغین در سایر بافت ها توسعه یافته اند. شواهد منتشر شده برای وجود سلول های بنیادی/ اجدادی بزرگسالان در آندومتر انسان منجر به شناسای سلول-



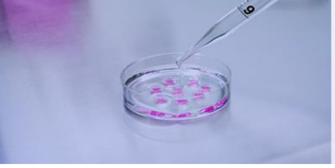
-های اپیتلیال و سلول های استروما کلونوژنیک به صورت نادر شد. کلونوژنیسیتی به معنای توانایی یک سلول واحد برای شروع یک کلونی از سلول ها است (CFU) در زمانی که در شرایط بسیار محدود کشت قرار بگیرند. در واقع یک ویژگی کلاسیک سلول های بنیادی و پیش ساز در حالت برون تنی محسوب می شود که برای بسیاری از سلول های بنیادی بالغ تایید شده است. سلول های استرومایی اندومتریال انسانی بطور قابل توجهی کلونوژنیک تر از سلول های اپیتلیال می باشند. هر چند که هر دو نوع سلولی از نظر اندازه و شکل کلونی های کوچک و بزرگی را تشکیل می دهند. بر همین اساس گفته شد که دو نوع سلول بنیادی بالغ در اندومتر وجود دارد: سلول های نادر اپیتلیال و سلول های استروما که تشکیل کلونی (CFU) می دهند.

## ۲,۱۴ مزایای سلول های بنیادی اندومتریال

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 اندومتریال نشان داده اند که توانایی رگزایی دارند. همچنین، تحقیق برروی 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.

## ۲,۱۵ سلول های بنیادی پرتوان القایی

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 توانو 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 فیبروبلاست 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.



## ۲,۱۶ 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 جراحت یا ایسکمی، به بافت مزبور آسیب برسد بافت غیرفعال جایگزین سلول های ماهیچه ای قلب فعال می شوند.  سلول های بنیادی جنینی 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 مواردختلالات 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 دردرمان بیماری دیابت باشند.

۴-سلول های عصبی از سلول های بنیادی جنینی 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 جنینی 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

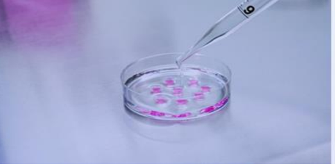
۷- تبدیل سلول بنیادی به سلول کبدی

۸-تولید لوله گوارش از سلول های بنیادی

تمایز سلول های بنیادی جنینی 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 ناباوری و کاهش ناهنجاری های مادرزادی و تولید انواع محصولات فاکتورهای رشد می شود.

## ۲,۱۷ سلول درمانی و ژن درمانی با استفاده از سلول بنیادی مزانشیمی

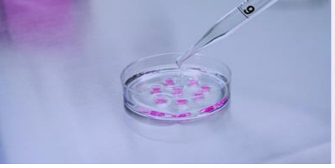
در این ارتباط سه استراتژی مهم وجود دارد. استراتژی اول تزریق سلول های مزانشیمی مستقیما به محل آسیب دیده است. از این روش برای ضایعات استخوان و غضروف استفاده شده است. استراتژی دوم وارد کردن ژن پروتئین خاص در سلول مزانشیمی و تزریق آن به سیستم گردش خون است. این سلول ها در مغز استخوان مستقر شده و پروتئین مورد 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 میشود درمان کرد.



# فصل سوم

## کشت سلول و روش های رنگ آمیزی سلولی

**۳**



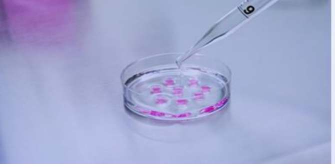
## ۳,۱ کشت سلول چیست ؟

کشت سلولی یعنی ازدیاد تعداد سلول ها در شرایطی مشابه شرایط درون بدن، پس دمای معادل دمای بدن (۳۷ درجه سانتیگراد) در درون انکوباتورهای CO2 و شرایط کاملاً ضد عفونی شده انجام می شود. چون رشد سلول های جانوری بسیار کندتر از رشد باکتری‌ها و مخمرها است و امکان آلودگی وجود دارد، برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها گاهی از آنتی بیوتیک‌هایی مانند پنیسیلین، استرپتومایسین و یا جنتامایسین استفاده می‌شود. محیط‌های کشت اختصاصی برای رشد سلول های مشخص نیز وجود دارد. مانند محیط کشتی که در آن فقط هپاتوسیت‌ها رشد می‌کنند و یا محیط کشت‌هایی که فقط نورون‌ها که تقسیم نمی‌شوند، می‌توانند زنده بمانند. برای اینکه سلول ها در محیط کشت بخوبی تکثیر یابند، لازم است تراکم آن در محیط کشت کم باشد. برای این منظور باید هر چند وقت یکبار، سلول ها را به محیط کشت‌های تازه پاساژ داد. در صورتیکه تراکم سلول ها بالا رود، بعلت ممانعت تماسی تکثیر سلول ها متوقف شده و سلول ها وارد مرحله تمایز می‌شوند. سلول ها از نظر نحوه کشت مدلهای 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 می‌شوند تا بصورت تک لایه، تمام سطح محیط کشت را فرا گیرند. پس از آن بعلت اثر فرایند ممانعت تماسی تکثیر سلول ها، متوقف می‌شود. سلول های ترانسفوم شده بعلت اینکه پروتئین‌های سطحی خود (که در ممانعت تماسی نقش دارند) را از دست داده‌اند، می‌توانند 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)، در صورتیکه به کمک اشعه‌های یونیزه کننده، بار زدایی شوند نیز می‌توان استفاده کرد. سلول ها به کمک پروتئین‌های سطحی خود مانند: اینتگرین‌ها، فیبرونکتین، کلاژن و لامینین به این سطوح متصل می‌شوند. سلول های وابسته به بستر را همچنین می‌توان بر روی سطوح معلق کشت داد. برای این منظور گاهی از گلوله‌های کلاژن، پلی استایرن، سفادکس، ژلاتین و یا پلی اکریل آمید، بعنوان سطحی برای اتصال سلول ها استفاده می‌شود. این گلوله‌ها در محیط کشت مایع معلق می‌شوند. برای اینکه سلول ها بهتر به سطوح متصل شوند، می‌توان این سطوح را با کلاژن، فیبرونکتین، پرونکتین، اناکتین، هپاران سولفات و. . پوشاند. همچنین می‌توان برای رشد اختصاصی سلول ها از مواد خاصی استفاده کرد. برای مثال برای رشد اختصاصی کندروسیت‌ها از کوندرونکتین استفاده می‌شود.

سلول های غیروابسته به بستر (Anchorage Independent): این سلول ها برای تکثیرو زنده ماندن لازم نیست قبلا به سطحی متصل شده باشند، مانند سلول های بنیادی هپاتوسیتی و یا رده‌های سلولی.



## ۳,۲ کاربردهای کشت سلولی

۱- مطالعه سلول از نظر نحوه رشد، نیازهای غذایی، علل توقف رشد و در نهایت توسعه روش‌های کنترل رشد سلول های 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 سلول های بنیادی جنینی و تولید حیوانات ترانس ژنیکی که بتوانند ژنهای خاصی را بیان نمایند.

۴- ممزوج کردن سلول ها و تولید آنتی بادی های منوکلونال

۵- آزمایشات سم شناسی

۶- تولید واکسن های ویروسی

۷- مطالعه فعالیت‌های داخل سلولی از قبیل تکثیر DNA و سنتز RNA، سنتز پروتئین ها و جزئیات مربوط به متابولیسم

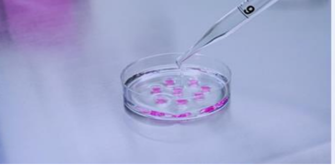
۸- مطالعه برهمکنش سلول ها

۹- مطالعه محصولات تهیه شده توسط سلول ها

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.

## ۳,۳ فاز تاخیری یا (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. طول فاز تاخیری وابسته به حداقل دو فاکتور است که شامل فاز رشد سلول ها در هنگام Sub Cultureing و تعداد سلول های تلقیح شده می باشد. کشتهایی 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 بطور فعال در حال تقسیم می باشند گروهی از سلول ها جدا شده و به محیط کشت جدید منتقل می شوند ( اصطلاحاً Subculture انجام می شود) فاز تاخیری کوتاهتری مشاهده می شود.



## ۳,۴   فاز رشد لگاریتمی (Logarithmic  Growth Phse )

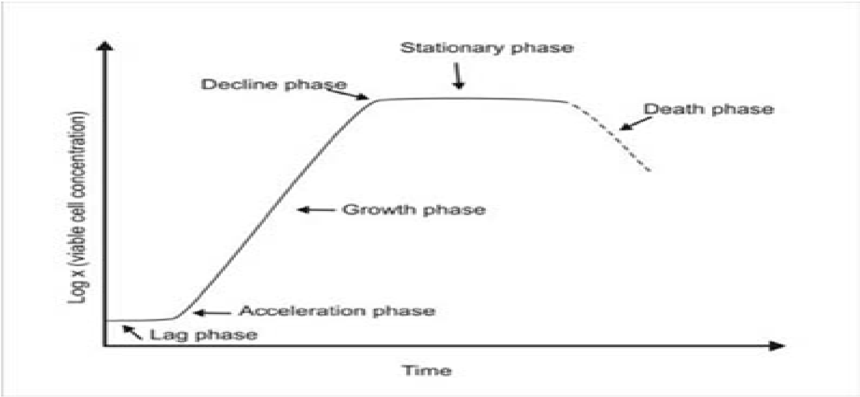
این فاز یک دوره تکثیر فعال است که در طی آن تعداد سلول ها بصورت لگاریتمی افزایش می یابد. در فاز لگاریتمی ممکن است درصد سلول های در حال تقسیم ۹۰ تا ۱۰۰٪ باشد و در یک زمان معین سلول ها بطور تصادفی در وضعیت های مختلف تقسیم سلولی دیده شوند. بعنوان یک قانون کلی در طی فاز لگاریتمی سلول ها عموماً در سالمترین وضعیتشان در نظر گرفته می شوند و بنابراین طبیعی است که هنگام مطالعه در مورد عملکرد سلول از سلول های فاز Log استفاده می شود. کینتیک تکثیر 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 طول فاز لگاریتمی را تحت تاثیر قرارمی دهند. شامل تراکم سلول های تلقیح شده، میزان رشد سلول و دانسیته اشباع رده سلول می باشد.

## ۳,۵   فاز ثابت یا (Plateau Phase (Stationary Phase

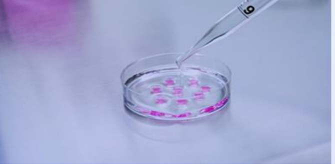
هنگامیکه جمعیت سلول ها به انبوه رسید میزان تکثیر سلول کند شده و کاهش می یابد.  این مرحله فاز پلاتو نامیده می شود.  در فاز پلاتو تقسیم سلول بوسیله مرگ سلول متعادل می شود و درصد سلول هایی که در چرخه تقسیم سلولی قرار دارند ممکن است به ۰ تا ۱۰٪ برسد.  برای برخی از رده های سلولی اگر محیط تجدید شود امکان طولانی تر شدن فاز پلاتو وجود دارد. این دوره دوره پایداری برای اغلب رده های سلولی نیست و اغلب سلول ها در این فاز آسیب پذیرترند. سلول هایی که در حالت سوسپانسیون رشد می کنند.  نیز به فاز پلاتو می رسند که تا حدودی به فراهم بودن غذا بستگی دارد.

## ۳,۶   مرحله کاهش رشد (Decline Phase)

فاز پلاتو بوسیله دوره ای از رکود در تعداد سلول ها دنبال می شود که مربوط به عدم تعادل در رشد و مرگ سلول است. این مرحله به منبع تغذیه سلول ها خیلی مربوط نمی شود.




شکل۴۹- فازهای رشد سلولی



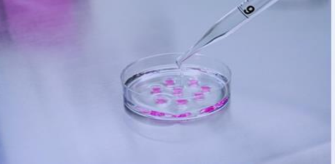
## ۳٫۷ کشت سلولی (شرح کار به صورت مقدماتی)

در ابتدا سلول های یخ زده و فریز شده داریم که در محفظه های لوله ای شکل خاصی که با یک فویل آلومینیومی نیز پوشانده شده اند، نگهداری می شوند. پس در مرحله ی اول باید سلول ها را دفریز کنیم تا یخشان باز شود و آماده ی کشت دادن شوند. سلول ها در نیتروژن مایع که دمایی بالغ بر منفی صد و نود شش درجه ی سانتی گراد دارد فریز می گردند. برای جلوگیری از تشکیل بلورهای یخ کخ باعث آسیب دیدن سلول ها می شود از ماده ی ضد یخی بنام دی متیل سولفوکساید (DMSO) استفاده می شود. برای کشت DMSO باید از محیط سلول ها بیرون بیاید و ما نیاز به سلول هایی با دمای طبیعی یعنی سی و هفت درجه ی سانتی گراد داریم. در کل دمای مناسب برای رشد سلول همان دمای محیط داخلی بدن انسان است. بهتر است مرحله به مرحله سلول ها را از حالت فریز در بیاوریم چراکه اگر به صورت ناگهانی این کار را بکنیم به سلول ها شوک وارد می شود و ممکن است کلا از بین بروند.

برای دفریز کردن سلول ها از بن ماری یا انکوباتور استفاده می شود. بن ماری نوعی حمام آب گرم است. پس از مرحله ی بن ماری و یا انکوباتور، سلول ها در حالت سانتریفیوژ، آرام آرام از یخ زدگی در می آیند و در واقع از خواب بیدار می شوند! اتاق کشت و کلا محیط کشت سلول باید دارای استانداردهای خاصی باشد و شدیداً باید از نظر پاکیزگی و ضدعفونی بودن مورد مراقبت قرار گیرد. یکی از چالش ها و مسائل بسیار مهم در کشت سلول ها استاندارد پاکیزگی آزمایشگاه کشت است. چرا که سلول ها به کوچکترین آلودگی حساس هستند. پس فرد کشت دهنده ی سلول باید کاملا پوشیده باشد تا عوامل تخریب سلولی را به محیط کشت سلول منتقل نکند. نکته ی مهم هود و فضای اطراف هود است که باید استریل شده باشد چرا که کشت سلول زیر فضای هود انجام می گیرد و آن فضا بیشترین تماس را با سلول خواهند داشت. تمام وسایل زیر هود باید توسط اتوکلاو استریل شده باشند. اتوکلاو دستگاهی است که گرما و فشار را همزمان به ظروف و وسایلی که درون آن قرار می گیرند اعمال می کند و بدین وسیله میکروارگانیسم های موجود روی ظروف و وسایل را از بین می برد. نیم ساعت قبل از کار تا نیم ساعت پس از کار باید لامپUV داخل آزمایشگاه مهندسی بافت روشن باشد تا محیط از برخی عوامل میکروبی پاک شود. اتوکلاو نباید در فضای داخلی آزمایشگاه باشد چرا که بخار بیرون آمده از آن سبب آلودگی محیط آزمایشگاه می گردد. برای همین است که اتوکلاو در بیرون آزمایشگاه و دور از محیط کشت قرار دارد. برخی از وسایل و مواد هستند که نمی توان آنها را اتوکلاو کرد برای آنها از روش فیلتراسیون یا همان فیلتر کردن استفاده خواهیم کرد. ست فیلتراسیون در واقع همان قیف، کاغذ فیلتر، ارلن و خروجی خلا است که پس از تنظیم کردن، از آن استفاده می کنیم.

برخی فیلترها سر سرنگی هستند که 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. استریل کردن دست ها و کل مواد زیر هود با الکل هفتاد درصد از دیگر نکات مهم کار با سلول ها می باشد. در واقع پاک کننده ی محیط کشت الکل است. سرنگ را باز کرده و از مدیا (محلول 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 به دقت مدیا را فیلتر می کنیم. معمولا فیلترها یک بار مصرف هستند و پس از هر بار مصرف out می شوند. سمپلر را با الکل کاملا تمیز می کنیم. این وسیله 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. مثلا رنگ زرد برای انتقال ۱۰ تا ۱۰۰ میلی لیتر کاربرد دارد.

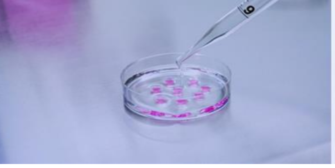
حال به بحث روی سلول هایمان می پردازیم. سلول های CHO رفتاری شبیه به سلول های فیبروبلاست دارند. سلول های فیبروبلاست، فراوانترین سلول بافت همبند است که همه انواع رشته‌های بافت همبند و مواد آلی ماده زمینه‌ای را سنتز می‌کند. فیبروبلاست، سلولی است با هسته بیضوی و روشن و دارای کروماتین ظریف است که حاوی یک یا دو هستک واضح می‌باشد. اندامک‌های دخیل در پروتئین سازی در فیبروبلاست بطور گسترده دیده می‌شوند. در مواردی که فعالیت سلول کاهش می‌یابد،



اندازه سلول کوچک‌تر شده و هسته آن پر رنگ و دوکی دیده می‌شود که در این حالت فیبروسیت نیز می‌نامند. فیبروسیت‌ها درصورت تحریک قابل برگشت به حال فعال می‌باشند. در بیشتر آزمایش های کشت سلول از سلول های فیبروبلاست استفاده می گردد. سلول های CHO از سلول های تخمدان موش چینی گرفته می شود. به وسیله ی سل اسکرپر، سلول های باقیماند در ته فلاسک را جدا می کنند. پس از دفریز کردن سلول ها، آنها را به وسیله ی سمپلر داخل فالکون ریخته و بلافاصله سانتریفیوژ می کنیم. فلاسک ها باید زیر هود و در محیط کشت باز شوند تا آلودگی داخل فلاسک نگردد. پس از سانتریفیوژ کردن مایع رویی را خالی می کنیم. تا سلول ته نشین شده را به راحتی ببینیم! خالی کردن مایع رویی به وسیله ی سمپلر انجام می گردد. حالا سلول ها را پیپیتاژ می کنیم در واقع به وسیله ی سمپلر آنها را از هم باز می کنیم و به هم می زنیم. بهتر است ابتدا سلول ها را شمرد تا بدانیم در هر فلاسک چند سلول می ریزیم. بهتر است فلاسک هایمان فیلتر دار باشدو در غیر این صورت مجبوریم سر فلاسک را کمی باز بگذاریم تا سلول ها خفه نشوند. در هر فلاسک کلا پنج میلی لیتر ماده ی مغذی (که محیط کشت نامیده می شود) وارد می کنیم که چهار و نیم میلی لیتر از آن محیط کشت است پنج صدم میلی لیتر از آن آنتی بیوتیک است و چهل و پنج صدم میلی لیتر از آن سرم جنین گوساله (که حاوی مواد مغذی و مورد نیاز برای رشد سلول ها) است. آنتی بیوتیک را برای این اضافه می کنیم که عوامل میکروبی و باکتریایی از محیط تخلیه گردند. از آنجایی که فلاسک مورد استفاده در آزمایش ما فیلتر دار نبود درش را کمی باز می گذاریم تا سلول های کشت شده ی ما خفه نشوند چرا که سلول دی اکسید کربن تولید می کند و این گاز باید به گونه ای از محیط تنفس سلولی خارج گردد. برای اینکه سلول ها خوب توزیع شوند فلاسک را کمی تکان می دهیم و آنها را داخل انکوباتور با دمای سی و هفت 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 به سلول ها سر می زنیم. سلول ها را از انکوباتور در می آوریم. ابتدا سرنگ را باز می کنیم. باید از یک سرنگ بزرگ استفاده کنیم. با استفاده از سرنگ مدیا را می کشیم. سلول ها هم بزرگتر و هم کشیده تر می شوند. فیلتر را به سر سرنگ وصل می کنیم. حال مدیا را به آرامی فیلترمی کنیم و درون فالکن می ریزیم. در واقع وقتی مدیا از فیلتر با فشار عبور می کند فیلتر خواهد شد. سلول هایی که خیلی ریزند و یا اینکه روی سطح ایستاده اند در واقع مرده اند. همان طور که اشاره شد سلول هایی زنده مانده اند که حالت خودشان را حفظ کرده و کشیده تر شده اند. مقدار کمی از سلول های مرده در محیط کشت تاثیری روی سلول های زنده ی دیگر ندارد ولی اگر تعدادشان از یک حدی زیاد تر گردد مشکل ساز می گردند. حال سرم، مدیا و آنتی بیوتیک را به محیط جدیدمان اضافه می کنیم. با همان نسبت هایی که قبلا به آن اشاره شد. محیط قبلی تغییر رنگ داده است. و از سرخ براق به زرد می گراید چرا که سلول ها مواد داخل محیط را مصرف می کنند. پس از خالی کردن محیط قدیمی کشت آن را با PBS دو تا سه بار شستشو می دهیم. حال محیط جدیدمان را اضافه می کنیم. ابتدا باید با میکروسکوپ چک کنیم که اصلا حد سلول ها به میزانی رسیده که پاساژشان دهیم یا نه و در واقع یک شمارش سلولی خیلی تقریبی و ساده زیر میکروسکوپ توسط سل کانتر انجام می دهیم. سلول های زنده عموما به محیط می چسبند و سلول های مرده معلق خواهند ماند. فلاسک را با PBS شستشو می دهیم تا اگر احیانا سلول مرده ای مانده باشد شستشو داده شود. سلول های کف فلاسک هنوز کنده نشده اند! سعی می کنیم فشار PBS به آنها آسیب وارد نکند. حال نوبت اضافه کرده تریپسین به محیط است. تریپسین در واقع برای سلول یک ماده ی خطرناک به شمار می رود. حدودیک میلیلیتر ازتریپسین به محیط اضافه میکنیم.

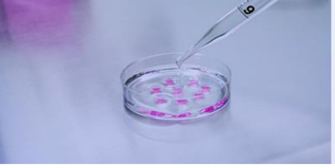
در واقع ما از این آنزیم به عنوان عاملی برای کندن سلول ها از محیط قبلی استفاده می کنیم. منتها باید سعی کنیم که سلول زیاد در معرض تریپسین قرار نگیرد چون قطعا می میرد. پس از مدت زمان خاصی که سلول ها از کف فلاسک کنده شدند حال سرم را به محیط اضافه می کنیم تا اثر تریپسین را خنثی کند. سلول ها در این مرحله باید 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 در غیر این صورت از ابزار میله ای شکل مخصوص به این کار استفاده می کنیم تا تمامی سلول ها در محیط سرم شناور گردند. به ازای هر میلی لیتر ۳۰۰ تا ۴۰۰



میلی لیتر سرم FBS اضافه می کنیم. حالا محتویات را داخل یک فالکن جدید می ریزیم.  و دوباره سانتریفیوژ می کنیم تا سلول ها جداسازی شوند.  در این فاصله محیط را آماده سازی می کنیم و سرم را در محیط می ریزیم. محیط قبل را داخل فلاسک خالی می کنیم.  مجموع تریپسین و سرم را از سلول ها جداسازی می کنیم.  حال دو میلی لیتر از محیط 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. برای شمارش تعداد سلول ها از صفحه ی شطرنجی شکلی زیر میکروسکوپ بهره می گیریم. این صفحه‌ی 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. برای شمارش سلولی از تریپانبلو استفاده میکنیم. تریپانبلو یک آنزیم سمی است که سلول کشته را از زنده تشخیص می دهد چرا که رنگ آمیزی آن به صورتی است که سلول مرده را از زنده متمایز می سازد. در واقع تریپان بلو ماده ای است که سلول های ما را رنگ آمیزی می کند. فقط باید حواسمان جمع باشد که شمارش را زیر میکروسکوپ سریع انجام دهیم چرا که تریپان بلو ماده ای سمی است و ممکن است پس از گذشت چند دقیقه سلول های زنده ی ما را نیز بکشد! محلول باید قبل از شمارش کاملا یکنواخت گردد و باید به حجم های مساوی و کم از دو فلاسک برداشته شود(حدود یک قطره که معادل ۲۰ میکرو لیتر است). حال محیط کشت و سرم و آنتی بیوتیک را به نسبت های گفته شده به در فلاسکهای مجزا می‌ریزیم. درحال حاضر یک فلاسک سلولی ما تبدیل شده به دو فلاسک سلولی و به این کار پاساژ دادن می‌گوییم. پس از چند مرحله پاساژ دادن میتوانیم از سلول هایمان در آزمایشهای مختلف از جمله آزمایشهای تستهای بیومتریال استفاده کنیم.

## ۳,۸   محیط کار استریل

برای انجام کارهای مربوط به کشت سلول باید تا جایی که امکان دارد یک اتاق جداگانه در نظر گرفته شود.  این اتاق باید عاری از هر گونه شلوغی بوده و در صورت امکان از یک تهویه هوای فیلتر شده در محیط کار برخوردار باشد. یک فیلتر هوای HEPA (High Efficiency Particle Air Filter )  می تواند چنین محیطی را فراهم آورد. بافت اولیه حیوانی و میکروارگانیسم‌ها نباید در نزدیکی آزمایشگاه کشت سلول، کشت شوند و باید یک آزمایشگاه جداگانه و اختصاصی برای کار کشت سلول به صورت استریل طراحی شود. پوشش های مخصوص آزمایشگاه کشت سلول باید در ورودی آزمایشگاه پوشیده شده و لباسی که از این محیط خارج می گردد نباید مجدداً وارد آزمایشگاه شود. در صورت نیاز به استریل بودن شدید یک هود لامینار جهت حفظ بهتر از شرایط استریل پیشنهاد می گردد. در صورت استفاده از یک ماده شیمیایی خطرناک باید از هودهای عمودی (ورتیکال) استفاده گردد. به هر حال برای کشت های اولیه و در حالی که هیچ گونه هود لامینار یا اتاق استریل در دسترس نباشد باید یک فضای استریل جهت انجام کار در نظر گرفت. اگر شیوه های سترونی یا استریلیزاسیون به درستی رعایت گردد و نظافت و نظم محیط حفظ شود، می توان تا حدی از محیط کار استریل آسوده خاطر بود. تمام سطوح کار، میزها و قفسه ها و هود لامینار باید به طور مرتب با اتانول ۷۰٪ یا یک پاک کننده جایگزین به درستی پاکیزه و استریل گردند. در صورتی که هود لامینار یا فیلتر های هوا در محیط کار  جود نداشت، کار کشت می تواند بر روی یک میز تمیز با کمک شعله آتش جهت استیل نمودن سطح کار و هوای اطراف آن انجام گردد.



## ۳,۹ انواع رده سلولی

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

۱- کشت سلول نخستین — Primary cell culture

۲- کشت سلول دیپلوئید — Diploid cell culture

۳- کشت سلول رده پیوسته — Continuouse cell culture

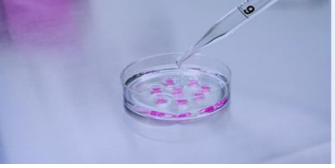
برای تهیه کشت‌های سلولی می‌توان از بافت‌های جنینی، بالغ و یا سرطانی استفاده نمود. قدرت تکثیر سلول ها جنینی زیاد است و معمولاً چند ساعت بعد از کشت در آن‌ها میتوز شروع شده و در مدت ۵-۴ روز تعداد قابل ملاحظه‌ای از سلول ها تولید می‌گردند برای این منظور اکثراً از کورتکس کلیه جنینی انسان و سلول های فیبروبلاستی جنینی مرغ یا موش استفاده می‌شود. بافت‌های بالغ نیز یعنی بافت‌هایی که پس از تولد از بدن نوزاد برداشته می‌شوند مثل سلول ها غشاء آمینوتیک و سلول های جفت نوزاد انسان و سلول های تیروئیدی و سلول های اپیتلیال کلیه خرگوش، میمون و غیره می‌باشند. برای تهیه کشت سلول نیز استفاده می شوند.

سلول های سرطانی نیز به نحوی که ذکر خواهد گردید در تهیه کشت سلولی به کار می‌روند.

## ۳,۱۰ کشت سلول نخستین

سلول های بسیاری از اعضاء را می‌توان در محیط خارج از بدن کشت داد برای این منظور تکه‌ها کوچک چند میلی‌متری از نسج مورد نظر را بدون ایجاد آلودگی و تحت شرایط آسپتیک تهیه کرده و پس از چند بار شستشو با محلول‌های مغذی چون ارل و هنکس با محلول رقیق‌تر تریپسین مجاور می‌کنیم و در حرارت ۳۷ درجه سلول و ترپسین را به هم می‌زنیم. به علت اثر پروتئولیتیک آنزیم تریپسین بر اتصال پروتئین بین سلول ها، قطعات نسج شکسته شده و سلول ها در محل آزاد می‌شوند. سپس این سلول های آزاد شده را به طریق سانتریفیوژ جدا کرده و پس از شستشو با محلول‌های مغذی فوق در محیط‌های کشت مخصوص به همراه متابولیت‌های لازم شامل املاح، ویتامین‌ها، گلوکز و اسیدهای آمینه در کنار ۲۰-۱۰ درصد سرم جنینی گوساله کشت می‌دهند.

حال اگر این سوسپانسیون سلول ها بر سطح شیشه بطری و یا فلاسک کشت سلول ته نشین شده و پس از آن تکثیر یافته می-تواند هب صورت یک ورقه تک لایه سلولی به آن چسبیده و تمام سطح آن را بپوشاند و در این مرحله تقسیم سلولی نیز متوقف می شود (Contact inhibition) حال کشت سلولی ایجاد شده را می‌توان مجدداً تحت تأثیر ترپسین قرار داده و پس از جدا شدن سلول ها به بطری‌ها یا فلاسک‌های دیگر انتقال داد. با این عمل که اصطلاحاً پاساژ نامیده می شود کشت سلولی را زیاد نمود. عمل پاساژ کشت سلولی در مورد اغلب نسوج محدود بوده و پس از چند بار پاساژ قدرت تکثیر سلول ها از بین می‌رود به این نوع کشت‌های سلولی نخستین Primary cell culture می‌گویند.



## ۳,۱۱ کشت سلول های دیپلوئید (Diploid Cell Culture)

تحت شرایط خاص و با استفاده از نسوج مخصوص چون پوست، شش کلیه و میوکارد می‌توان کشت‌های سلولی تهیه نمود که پاساژ آن‌ها به چند بار محدود نبوده و در حدود یک سال قابل پاساژ می‌باشد و در این مدت سلول ها خصوصیات سلول های اولیه را حفظ می‌نمایند. به این نوع کشت، کشت سلولی دیپلوئید گفته شده که برای ایزوله کردن ویروس‌های بیماری‌زای انسانی مناسب بوده و جهت تهیه واکسن نیز بکار می‌رود و واکسن ضد بیماری هاری از نوع HDVC که بهترین واکسن از نوع خود می‌باشد روی سلول دیپلوئید ریه انسان تهیه می‌شود.

## ۳,۱۲ کشت سلول رده پیوسته (Continuous Cell Culture)

بر خلاف رده سلول های قبلی سلول های فوق از نسوج بد خیم جهت کشت سلولی استفاده می‌شود و نسبت به سلول های بافت سالم بهتر می‌توانند به محیط in-vitro آداپته گردیده و لذا در اثر پاساژ مکرر قادر به زندگی طولانی و تکثیر خواهند بود.

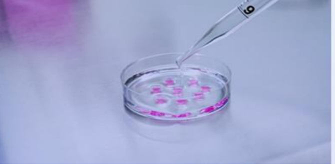
این نوع از کشت‌های سلولی به نام کشت‌ها سلولی رده پیوسته نامیده می‌شوند که در این دسته از سلول ها تعداد کروموزوم‌ها برعکس رده دیپلوئید که به شکل مجموعه‌ای از کروموزوم‌های زوج هستند غیر طبیعی می‌باشند.

از رده سلولی پیوسته به غیر از هلا انواع دیگری نیز به طور خالص تهیه و امروز در آزمایشگاه‌های کشت سلول مورد استفاده قرار می‌گیرد برای مثال می‌توانیم رده‌های سلولی Vero، KB، HeP2 را نام برد.

کشت اولیه سلول می‌تواند از طیق هضم آنزیمی طیف وسیعی از بافت‌های حیوانی در درجه حرارت سرد یا گرم و با روش ادامه رشد سلول ها برداشته شده اولیه از بافت حیوانی انجام پذیرد. چنین کشت‌هایی می‌تواند در شرایط آزمایشگاهی برای مدت زمان کوتاهی ادامه یابد که طول زمان کشت بستگی به توانایی سلول ها در تقسیم سلولی می‌باشد.

اگر چه نشان داده شده است که چنین سلول هایی با توانایی تقسیم، دارای چرخه‌ی حیاتی محدود در شرایط آزمایشگاهی می‌باشند. قسمت اعظم سلول ها درا نتهای 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.

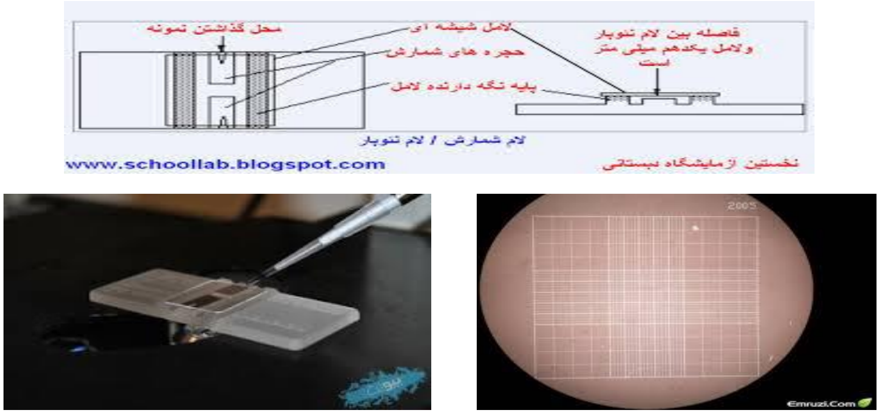
با این وجود امکان دستیابی به شرایط کشت، با توان رشد نامحدود سلولی وجود دارد. چنین دودمان‌های نامیرای سلولی می‌تواند به صورت خود به خودی (به عنوان یک پدیده نادر) و یا از طریق تغییرات ژنتیکی(Transformation) به کمک مواد شیمیایی سرطان زا و یا ویروس‌های تومورزا بدست آید. نمونه چنین دودمان‌های نامیرایی دائمی، دودمان لنفوبلاست موشی LS178Y و دودمان WI-26VA 4 و ویروس $SV_{40}$ ایجاد شده‌اند. روش دیگر در ایجاد دودمان‌های سلولی هیبرید (دو رگه) بین یک سلول با دوره حیاطی محدود و یک رده سلول نامیرا و نامحدود در ایجاد دودمان‌های سلولی هیبرید و یا جهت تولید آنتی بادی‌های مونوکلونال انجام شده است. آنچه صرف نظر از روش به کار رفته در نامیرا سازی سلول ها مهم به نظر می‌رسد ایجاد تغییرات اساسی در خواص سلول ها می‌باش. سلول در جریان این تغییرات خواص اختصاصی بافت اصلی خود را از دست داده و دچار تغییراتی در کروموزم‌های خود می‌گردد. تکنینک‌های مهندسی ژنتیک از جمله راهکارهای دیگر جهت نامیرا سازی سلول ها به حساب می‌آیند. طی این روند ژن‌های ویروسی جهت جلوگیری از میرایی و افول چرخه حیاتی سلول ها به ژنوم سلول وارد می‌شوند. این ژن‌ها به دو دسته تقسیم می‌شوند. دسته اول ژن‌هایی که توانایی نامیرا کردن سلول ها را دارند. این ژن‌ها سلول های ابتدایی را به سلول های زاینده(proliferative) تبدیل کرده و یا دوره حیاتی سلول ها را همانند سلول های فیبروبلاست جنبی اولیه افزایش می‌دهند دسته دوم ژن‌هایی هستند که باعث تغییرات ژنتیکی اساسی(Transformation) در سلول می‌شوند مانند



دودمان سلولی فیبروبلاست هوشی NIH-3T3، تغییرات ژنتیکی سرطانزایی در سلول ها توسط ویروس‌های DNA دار طی یک روند چند مرحله ای و در نتیجه همکاری چندین ژن سرطانزا (oncogene) انجام می‌پذیرد. نمونه چنین انکوژن‌هایی با توانایی نامیراسازی عبارتند از آدنو ویروس منطقه نزدیک AdElA)1A) و منطقه کد کننده آنتی ژن T بزرگ لولپویا.

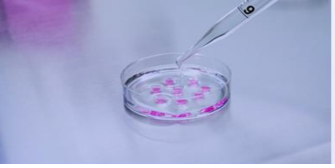
## ۳٫۱۳ شمارش سلولی

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 خود از ۱۶ خانه کوچکتر تشکیل یافته اند شمارش می گردد. سوسپانسیون سلولی پس از پیپتینگ مناسب جهت جدا شدن کامل سلول های چسبیده به هم 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 ۱۰۴ نشان دهنده میزان سلول ها در هر میلیمتر مکعب از سوسپانسیون است.




شکل۵۰-لام نئوبار

رنگ آمیزی سلول ها روشی است که برای بهتر دیده شدن سلول ها و یا اندامک های آن ها زیر میکروسکوپ انجام می شود. رنگهای مختلفی وجود دارد که می توانند بصورت ترجیحی اندامک های خاصی مانند هسته و یا دیواره ی سلولی و 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 ها قادر به جذب آنها هستند. چنان‌که گفته شد اساسی ترین دلیل رنگ آمیزی سلول ها، تسهیل مشاهده ی سلول ها یا اندامک های ویژه ی آن ها زیر میکروسکوپ است اما از رنگ های مختلف همچنین می توان برای نشان دادن انجام شدن پروسه های متابولیک مختلف و یا برای نشان دادن برخی تغییرات در سلول ها مثلاً تبدیل یک سلول بنیادی به یک سلول تخصص یافته و نیز افتراق 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. مثلا اگر پژوهشگری بخواهد تعداد سلول های بتای یک توده ی سلولی

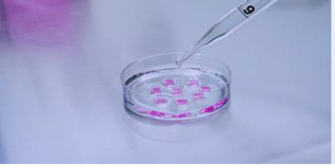


برداشته شده از پانکراس را بشمارد باید از رنگ ویژه ای استفاده کند که فقط سلول های بتا را رنگآمیزی می کند. در این حالت پژوهشگر می تواند تعداد سلول های بتا را که رنگ آمیزی اختصاصی شده اند از سلول های آلفا افتراق داده و براحتی بشمارد. رنگ آمیزی اختصاصی سلول ها اغلب بر مبنای مولکول های ویژه ای است که فقط در آن سلول ها یافت می شود.

## ۳,۱۴ سلول ها چگونه رنگ آمیزی می شوند؟

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 مثلا 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. مثلا 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، گلوتارآلدهید 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 بسته به فعالیت و یا آبدوستی در سلول زنده، باقی بمانند. مولکول های با بار منفی نمی توانند از غشای سلول زنده عبور کنند. ترکیبات با بار مثبت توانایی عبور از غشا را داشته و معمولاً در میتوکندری سلول های زنده تجمع می کنند. اغلب رنگ های مصرفی مانند ترکیبات اسیدی یا بازی رفتار می کنند. اجزای بافتی یا سلولی با بار منفی خالص(آنیونی) با رنگ های بازی بیشتر رنگ می گیرند و بازوفیل(یعنی بازی دوست) نامیده می شوند و اجزای با بار مثبت خالص (کاتیونی) تمایل به رنگ های اسیدی دارند و به همین دلیل اسیدوفیل (یعنی اسیدی دوست) نامیده می شوند. آبی تولوئیدین، آبی متیلن، آبی آلشین 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 که اجزای اسیددوست سلول مانند میتوکندری را رنگ آمیزی می کنند. معمولاً برای دیدن سلول ها در بافت ها از ترکیب ساده ی هماتوکسیلین برای رنگ امیزی 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 پریودیک اسید و شیف قرار می گیرند. در واقع در طی این پروسه گروه های ۱و۲-گلیکول موجود در قندها به پس ماندهای آلدئید تبدیل می شوند که با معرف شیف واکنش داده و رنگ ارغوانی را تولید می کنند.

فعالیت ها و ساختارهای مختلف یک سلول میتوانند توسط یک ترکیب فلورسنت رنگ آمیزی شوند. برخی از رنگ ها خاصیت فلوئورسنت 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 هستند. مثلاً نارنجی آکریدین به DNA و RNA متصل شده و خاصیت فلورسنت 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

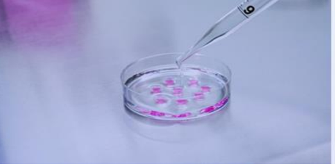


آمیزی سلول های زنده است چراکه از غشای سلولی عبور می کند و در سلول توسط استراز (یک آنزیم درون سلولی) به مولکول های با بار منفی هیدرولیز می شود. برخی از رنگ ها پس از عبور از غشای سلولی با پروتئین های درون سلولی بصورت کووالانسی پیوند برقرار کرده و در نتیجه گاه تا چند هفته می توانند در سلول حفظ شوند. برخی رنگ ها که نوکلئوتیدها 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 فلورسنت 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 فلورسنت 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 نورون 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 افزائیم. 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.

# فصل چهارم

## تجهیزات موجود در آزمایشگاه۴



## ۳,۱۵ 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 >پیپت ها >پلیت ها >سر سمپلر >لوله های فالکون >ویال های فریز
۱۶- لام نئوبار و لامل

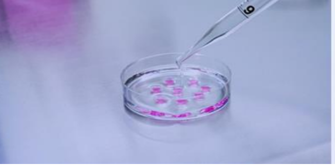
توضیح قبلی در واقع مرتبط با پاکسازی محیط آزمایشگاه بود، اما بهتره این مطلب رو در نظر بگیرین که خود سلول ها هم باید در محیط استریل آماده شوند، برای این منظور از وسیله مناسب این قضیه مطلبی به میان می آوریم.

## ۳,۱۶ هود لامینار:

هود دستگاهی است که با اشکال مختلف با توجه به نیازهای مختلف به تهویه به‌کار برده می‌شود. کار اساسی هود تامین گستره‌ای از مکش هوا بمنظور دریافت موثر آلاینده و انتقال آن به درون هود می‌باشد.

هودها بطور کلی به دو دسته خانگی و صنعتی تقسیم می‌شوند.  از انواع هودهای صنعتی هودهای محصور کننده می باشد.

شکل۴۶- هود لامینار



هودهای آزمایشگاهی نمونه‌ای 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 میکند و مسیرش قابل پیش بینی است. هود لامینار در آزمایشگاههای کشت سلولی و مواد بیماریزای انسانی (از قبیل باکتریها ، ویروسها ، میکروبها 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 مانند 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 غباررا 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 درفلاسک بدون خطر ضدعفونی ممکن می شود.

## ۳٫۱۷ وسایل انکوباسیون

علاوه بر فیلتر های هوا و هود لامینار و میزهای کاری که تمیز کردنشان به راحتی صورت می گیرد، آزمایشگاه کشت سلول به یک انکوباتور برای نگهداری سلول ها در دمای ۳۰ تا ۴۰ درجه سانتیگراد هم نیاز خواهد داشت. دمای انکوباسیون به نوع سلول های کشت شده بستگی دارد. سلول های حشرات در دمای حدود ۳۰ درجه بهترین رشد خود را دارند، در حالی که سلول های پستانداران به دمای حدود ۳۷ درجه سانتیگراد نیاز دارند.  استفاده از انکوباتورهایی که برای فراهم کردن $CO_2$ از یک منبع اصلی یا سیلندر گاز استفاده می کنند ضروری به نظر می رسد، چرا که هوای درون انکوباتور باید همیشه بین ۲ الی ۵٪ $CO_2$ داشته باشد. به طور کلی، لاین های سلولی بسیاری قادرند در اتمسفری حاوی ۹۵٪ هوا و ۵٪ $CO_2$ و با رطوبت نسبی ۹۹٪ قابلیت زنده ماندن خود را حفظ نمایند.  غلظت $CO_2$باید در تعادل با کربنات سدیم محیط کشت باشد. محیط کشت های مختلف ظرفیت بافری متفاوتی دارند. در صورتی که یک انکوباتور مجهز به $CO_2$ در دسترس نباشد به طور موقت می توان کشت ها را در یک فلاسک غیر قابل نفوذ حفظ نمود به این شکل که می بایست پس از گازدهی با $CO_2$ فلاسک ها را به کمک نوار پارافیلم ببندید. همچنین ممکن است محیط کشت های مختلفی مورد استفاده قرار گیرند که نیازی به اتمسفر حاوی $CO_2$ نداشته باشند که در این حالت به انکوباتور مجهز به $CO_2$ نیازی نیست، برای مثال هپاتوسیت ها در کشتهای اولیه خود در محیط کشت Leboviztz L-15 نگهداری می شوند که نیازی به $CO_2$ ندارد اما در این صورت نباید فلاسک های کشت مهر و موم و نفوذناپذیر شوند، چون که هپاتوسیت ها به مقادیر بالای $O_2$ نیاز دارند و با گذشت زمان مقدار اکسیژن در محیط بدون گاز غیر قابل نفوذ کاهش می یابد. بیشتر لاین های سلولی در دمای ۳۶/۵ درجه سانتیگراد نگهداری می شوند اگر چه برخی کشت ها، از جمله کشت های پوستی ممکن است به دمای پایین تری نیاز داشته باشند. سلول های کشت شده عموماً در دماهای پایین تر زنده می مانند، اما به ندرت دمای زنده ماندن آن ها 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 سلول ها قطع کند. انکوباتور ها طوری طراحی شده اند که یک درجه حرارت یکنواخت را تنظیم کنند، به عبارت دیگر درجه حرارت باید نهایتاً ۰/۵ ± درجه سانتیگراد در هر دمایی که

تنظیم شده است تغییر کند. بنابراین انکوباتورهای مجهز به سیستم گردش هوا می تواند به یکنواختی هوا در انکوباتور کمک نموده و آن را حفظ کند.

شکل ۴۶- دستگاه انکوباتور

همانطور که میدونین میکروسکوپ یکی از مهمترین ابزار مورد استفاده در آزمایشگاههاست. آزمایشگاه گیاه شناسی، دامپزشکی، علوم زیستی و بخصوص علوم سلولی نقش دارد. با توجه به گسترش زیاد که اخیرا در علوم پزشکی و صنعت شاهد بودیم، آشنایی با انواع میکروسکوپ به نظر ضروری میاد. پس در ادامه با انواع میکروسکوپ آشنا میشیم.

## ۳,۱۸ میکروسکوپ

واژه ای میکروسکوپ ازدو واژهmicro به معنای کوچک وskopin به معنای دیدن ترکیب شده است وابزاری است که بوسیله آن اجسام بسیار ریز را می بینیم.

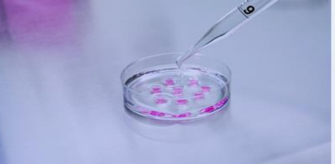
میکروسکوپی که در مراکز آموزشی مورد استفاده قرار می گیرد از نوع نوری است که خود دو نوع می باشد:

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 ۴۷- میکروسکوپ نوری

## ۳،۱۹ اجزای اصلی میکروسکوپ نوری

الف:بخش مکانیکی: بخش هایی ازمیکروسکوپ 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 می‌باشد که برای ثابت نگه داشتن میکروسکوپ بکار می رود ومعمولا ازجنس فولاد است تا از لرزش آن جلوگیری کند. پایه دارای ستونی می‌باشد که اجزاءمختلف به آن متصل می‌شود، 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 معمولا 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 داردکه 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 برزگ 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 معمولا 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 داردواین گیره متصل به سیستمی است

که می تواند در جهات جلو، عقب، چپ و راست حرکت کند این سیستم بارب یا شاریو نام دارد. دربعضی از میکروسکپ ها این باربرمجهز به درجه بندی ورنیه ای است که باز یابی سریع نمونه را امکان پذیر می سازد.

۷. پیچ های تنظیم

در دور ونزدیک کردن اسلاید به عدسی های شیئی نقش دارندواین عمل با حرکت صفحه ی پلاتین به بالا وپائین انجام می گیرد پیچ های تنظیم دونوع 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 واز چند عدسی محدب تشکیل شده است ومجموعه این عدسی ها کار یک عدسی محدب الطرفین را انجام می دهند وپرتو های نوررا بر روی نمونه متمرکزمی کنند.

۹. عدسی

۱. عدسی

۲. 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 استکه هر یک بیانگر خصوصیتی از ابژکتیو است.

اعداد نوشته شده بر روی عدسی شیئی شماره ۱۰عبارتند از:

۱- عدد۱۰ = بزرگ نمائی عدسی شیئی

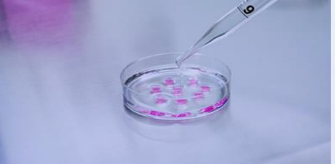
۲- عدد ۲۵/۰ = عدد گشادگی(Number of aperture(N. A

۳- عدد۱۶۰= طول لوله میکروسکوپ(برحسب میلی متر)

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

شکل ۴۸- بزرگنمایی عدسی

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



- در استفاده از عدسی شماره۱۰۰ بایستی از روغن گزیلول استفاده نمود.
- استفاده از روش ایمرسیون روغنی می‌تواند موجب افزایش N. A و افزایش روزلوشن شود.

۳. عدسی چشمییا اکولر:

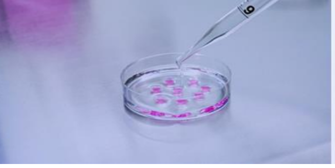
مجموعه ای از عدسی هاست که تصویری بزرگ تر، مستقیم ومجازی از جسم بوجود می آورد تصویر ابژکتیو به منزله جسم برای اکولر است به این ترتیب تصویر نهایی که به چشم ما می رسد تصویری مجازی، معکوس و بزرگتر است.
میکروسکوپ های مختلف میتوانندتک چشمی (monocular) و یادو چشمی (binocular) باشند، وقتی به مدت طولانی می‌خواهیم از میکروسکوپ استفاده کنیم دوچشمی بهتر است، چون مانع خستگی چشم می‌باشد.
بنابراین وظایفی که عدسی چشمی بر عهده دارند عبارتند از:
بزرگسازی تصویرمعکوس 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 می‌باشندکه 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 می‌باشد که یک طرف هر کدام مسطح و یکطرف محدب می‌باشد. در نوع هویگنس سطح محدب هر دو عدسی بطرف پایین می‌باشد و بین این دو عدسی دیافراگم قرار گرفته است، دیافراگم در محل کانون عدسی بالایعدسی چشمی واقع است. عدسی پایین پرتوهای رسیده از عدسی شیئی را جمع آوری نموده و درمحل دیافراگم یا در نزدیکی آن متمرکز می‌نماید. عدسی چشمی این تصویر را بزرگ نمودهو البته بصورت یک تصویر مجازی بزرگ شده به چشم فرد مشاهده‌گر منتقل می‌کند.
کار دیافراگم کاهش خیره کننده‌گی نور رسیده به چشم بیننده هاست. چشمی های هویگنس به چشمی های منفی معروفند و دارایبزرگنمایی۱۰و ۵ می‌باشند.  عدسی چشمی هویگنس دارای قیمت نسبتا ارزان و کارایی مناسب می‌باشد، اشکال عمده آن محدود بودن میدان دید و عدم تامین راحتی کافی برای چشم است.

۴. دیافراگم

دیافراگم میزان نوری را که از میکروسکوپ می گذرد تنظیم می کند درهر میکروسکوپ سه دیافراگم می تواند وجود داشته باشد.
الف: دیافراگم زمینه: در مقابل منبع نور قرار دارد ومیزان 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 وبوسیله مشاهده گر قابل دستکاری نمی باشد.
- دیافراگم ها در بعضی منابع جزءبخش مکانیکی میکروسکوپ به حساب می آورند.



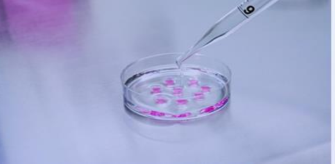
شکل ۴۸-اجزای میکروسکوپ

## ۳٫۲۰ انواع میکروسکوپ ها

### ۳٫۲۰٫۱ 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 ۴۹-میکروسکوپ فلورسانت



## ۳,۲۰,۲ 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 nm ۰/۵۰۰ می رسد. در این طول موج بهترین R ممکن حدود nm ۰/۲۰۰ 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 ۵۰-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 ۵۱-میکروسکوپ الکترونی گذاره

## ۳,۲۰,۳ میکروسکوپ الکترونی نگاره (scanning electron microscope)

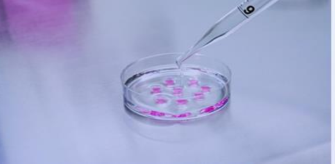
نوع ساده تر میکروسکوپ الکترونی است برای بررسی نمونه با این میکروسکوپ ، نمونه با لایه ای نازک از فلز سنگین به صورت یکنواخت پوشیده شود. الکترون های تابیده شده به سطح نمونه از هیچ ناحیه ای از آن عبور نمی کنند، بلکه در برخورد با سطح نمونه باعث تولید الکترون های بازتابیده می شوند. این الکترون ها تشخیص داده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

شکل۵۲- میکروسکوپ الکترونی نگاره

## ۳,۲۰,۴ 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 شودو 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 روبش 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.



شکل۵۳- میکروسکوپ پرتو X

### ۳,۲۰,۵ میکروسکوپ زمینه سیاه (Dark Fi el d M croscope)

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 نمونه های زنده و برخی از نمونه هایی با میکروسکوپ نوری معمولی قابل مشاهده نیستند را مشاهده کرد، به علاوه با این میکروسکوپ می توان حرکات سلولی مانند مهاجرت سلولی و فرایندهایی که در میتوز اتفاق می افتد را نیز مشاهده نمود.

شکل ۵۴- میکروسکوپ زمینه تاریک

### ۳,۲۰,۶ 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 سلول ها تیمار نشده و زنده بسیار مطلوب است. برای این منظور از میکروسکوپ های اختلاف فاز و میکروسکوپ تداخلی سیستم های نوری خاصی ابداع شده است، که سبب افزودن اختلاف ضریب انکسار بین اجزا تشکیل دهنده سلول می شود. با این میکروسکوپ ها نیز همانند میکروسکوپ زمینه تاریک می توان حرکات سولی مانند مهاجرت سلولی و فرایند میتوز را مشاهده کرد.

شکل ۵۵- میکروسکوپ اختلاف فاز و میکروسکوپ تداخلی

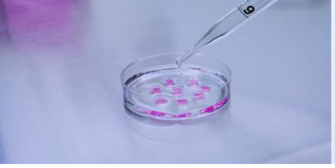
### ۳,۲۰,۷ میکروسکوپ معکوس ( Invert)

جهت بررسی رشد روزانه سلول ها واطلاع از چگونگی و نحوه تاثیر عصاره بر حیات سلول ها وهمچنین جهت بررسی مرفولوژی 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. سانتریفوژ معمولی در آزمایشگاه کشت سلولی جهت شستشوی سلول ها در مراحل مختلف باید از سانتریفوژ استفاده نمود. لذا وجود یک سانتریفوژ معمولی در این آزمایشگاه بسیار ضروری است.

شکل۵۶- میکروسکوپ معکوس

### ۳,۲۱ سانتریفیوژ

دستگاهی است که در آن با استفاده از نیروی گریز از مرکزمواد را از یکدیگر جدا می‌کنند. در این دستگاه محفظه‌ای که مواد جداشدنی در آن قراردارد معمولاً به کمک یک موتوربه سرعت حول یک محور می‌چرخد. دانشمندان معمولاً دستگاه سانتریفوژ را برای جدا کردن ذرات جامد از یک مایع یا تقسیم مخلوط مایعات به اجزای مختلف آن به کار می‌گیرند. مخلوط را درون لوله‌ای قرار می‌دهند که طوری قرار داده شده‌است که با چرخش دستگاه، به سمت خارج از مرکز حرکت می‌کند و به حالت افقی قرار می‌گیرند.  در این حالت، نیروی گریز از مرکز می‌خواهد که مخلوط را برخلاف مرکز سانتریفوژ براندو از این نقطه دور کند و ذرات

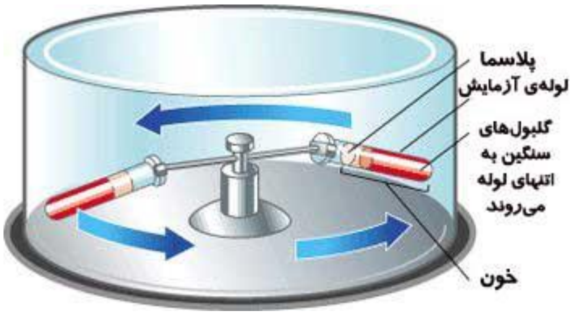


یا مایع سنگین تر بیش تر به سمت بیرون رانده می‌شوند. وقتی سانتریفوژ از حرکت باز می‌ایستد، مواد به همین حالت غیر مخلوط می‌مانند. خون و سایر نمونه‌های بیولوژیکی را معمولاً به وسیله دستگاه سانتریفوژ جدا می‌کنند. سریع‌ترین سانتریفوژ با نام «فرامرکز گریز» با سرعت ۲۰۰۰۰۰ دور در دقیقه می‌چرخد. از دستگاه‌های گریز از مرکز بزرگ برای انجام آزمایش بر روی خلبانان نظامی و فضانوردان استفاده می‌شود تا میزان مقاومت آنان در شتاب‌های بالا معلوم شود.

شکل ۵۷- سانتریفیوژ

## ۳,۲۲ اساس کار سانتریفوژها:

هر گاه جسمی با سرعت معینی حول یک مرکز با محور دوران کند نیرویی در جسم متحرک و در جهت عمود بر مسیر دوران و به سمت خارج از مرکز ایجاد می‌گرددکه به نیروی فراگریز یا نیروی گریز از مرکزموسوم است که مقدار آن از رابطه F=MRW2 که در آن R شعاع دوران M جرم جسم و Vسرعت خطی و (w) سرعت زاویه‌ای است بدست می‌آید. محور دوران ممکن است به سه حال قائم، افقی یا مایل باشد. سانتریفیوژ هایی که در صنعت اورانیوم کاربرد دارند قدرتی برابر ۳۰۰ دور در ثانیه را دارند.

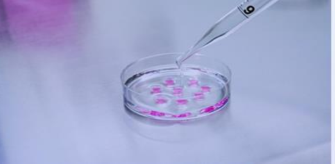



شکل ۵۸- اساس کار سانتریفیوژ

## ۳,۲۳ فلوسایتومتری

دستگاهی است برای بدست آوردن خصوصیات سلول ها، که بر اساس پراکنده سازی نور توسط سلول های تحت آزمایش و انتشار فلورسانس از آنها استوار است. نشر فلورسانس یا با استفاده مستقیم از مواد رنگ کننده فلورسنت یا ترکیبی از رنگ فلورسنت با آنتی بادی‌هایمونوکلونال حاصل می‌شود. این آنتی بادی‌های کونژوگه با فلورسانس می‌توانند مولکول‌های سطحی و یا ترکیبات داخلی سلول هارا ردیابی کرده و به آنها متصل شوند و شناسایی انواع سلول های موجود در یک جمعیت سلولی متنوع را توسط فلوسایتومتری امکان‌پذیر می‌سازند. این روش اساساً توسط ایمونولوژیست‌هایی ابداع شد که تلاش می‌کردند جمعیت‌های خالص سلول ها را از یکدیگر جدا کرده و پس از تکثیر آنها در محیط کشت سلولی، نقش مجزای هر سلول را در سیستم ایمنیبررسی نمایند. دستگاه‌های اولیه قادر بودند فقط یک یا دو رنگ فلورسانس را تجزیه و تحلیل کنند اما امروز دستگاه‌هایی عرضه شده‌اند که قادرند یازده رنگ فلورسانس را به طور هم‌زمان ردیابی و تجزیه و تحلیل کنند. امروزه استفاده از تکنولوژی‌های 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 می‌شود. در دهه اخیر استفاده از این روش در آزمایشگاه‌های کلینیکی و همچین تشخیص انواع سرطانبه طور چشمگیری افزایش یافته است. تاریخچه فلوسایتومتری به آزمایش‌های آندرو مولداواندر سال ۱۹۳۰ بر می‌گردد که دستگاهی را با استفاده از سلول فتو الکتریک طراحی کرد که سلول های در حال عبور از میانه لوله موئینه‌ای بر روی صفحه اسلاید میکروسکوپ را شمارش می‌کرد. اولین مقاله مربوط به فلوسایتومتری به سال ۱۹۳۴ بر می‌گردد 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 DNAو بررسی مقادیر آن بود. پس از آن شمارشگرهای افتراقی با اساس فلوسایتومتریک را وارد بازار شد. منابع نوری به کار رفته در این سیستم‌ها لامپ‌های تنگستنی هالوژنی بودند. در سال ۱۹۷۲ هرزنبرگ 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 اندازه‌گیری حداقل ۵ پارامتر در ۲۵۰۰۰ سلول در ثانیه به طور معمول به منظور بالا بردن تشخیص و مدیریت حالت‌های متفاوت بیماری‌ها و تشخیص بیماری‌ها استفاده شد. در سال ۲۰۰۳ دستگاه‌های پرسرعت با استفاده از تکنولوژی دیجیتالی معرفی شدند.

شکل ۵۹- فلوسایتومتری



## ۳,۲۴ چاپگرهای سه بعدی

وسایلی هستند که با استفاده از آنها می‌توانید از فایل های سه بعدی که در کامپیوتر خود دارید نمونه سه بعدی واقعی بسازید. در چاپگرهای سه بعدی خانگی، برای تولید محصولات از ذوب پلاستیک بهره می برند اما چاپگرهای سه بعدی صنعتی با قابلیت پرینت با استفاده از فلزات، خمیر سرامیک و حتی مواد خوراکی ساخته شده اند. برای تولید تجیزات پزشکی و طراحی های دقیق در این زمینه و همچنین تولید اندام های مصنوعی، نیاز به تولید طراحی قالب هایی با ابعاد و مواد بادوام می باشد که پرینترهای سه بعدی پاسخگوی این نیاز در علم پزشکی می باشند.

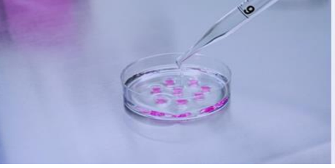
فنآوری استفاده از چاپ سه بعدی برای تولید اندام ها به منظور پیوند زدن، یک گام به پیش برداشته است. در سال های اخیر گروهی از دانشمندان توانستند جوهر زیستی کشف کنند. جوهر زیستی ترکیبی از سلول اندام هاست و چاپگر آن را به شیوه دقیقی برای ساختن ارگان انتخابی به کار می گیرد.

شکل ۶۰-چاپگر سه بعدی

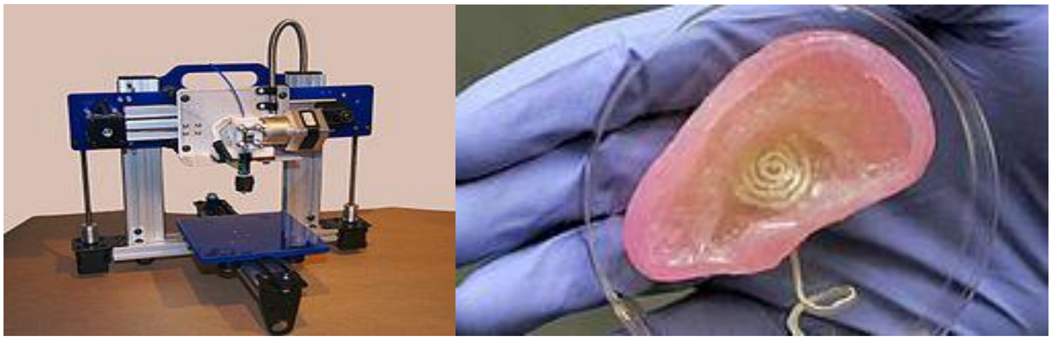
پژوهشگران همچنین با استفاده از یک چاپگر سه بعدی عادی ارزان موفق شدند که بافت نرم چاپ کنند، به این ترتیب که بافت نرم را در داخل نوعی ژل که به طرز خاصی طراحی شده بود، چاپ کردند. اما چالشی که در رابطه با مواد ژله مانند مخصوص چاپ بافت های نرم وجود دارد، این است که بافت ها و یا اندام های نرم پس از چاپ شدن با این مواد، همچون ژله خوراکی بر اثر وزنخود 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 مدلبندی مولکولی در مقیاس نانو و شبیه‌سازی‌هایی برای زیست‌شناسی سلولی ارائه داده‌اند. محققان در نظر دارند تجمع‌های سلولی را به طور دیجیتالی طراحی کنند، یک دگمه «اینتر» را فشار دهند و ظرف چند ثانیه چگونگی تغییر ساختار و تکامل بافت‌های زنده کامل را تجسم بخشند. به نظر می رسد نخستین محصول زیستی کامل اورگانو بافت کبد برای آزمایش دارویی خواهد بود. مسمومیت کبد شایع‌ترین دلیل برای ساخت دارویی از آزمایش‌های بالینی و بازاریابی آن پس از تایید خواهد بود. هنوز هیچ شیوه‌ای برای ارزیابی چگونگی اثرگذاری یک دارو بر کبد انسانی پیش از مصرف آن حتی در درمان‌های حیوانی، وجود ندارد. هدف نیز چاپ بافت پانکراس برای درمان گزارش شده است. این بافت فقط از سلول های درون‌ریزی ساخته می‌شود که قادر به تولید انسولین هستند.

در صورت کاشت در بدن انسان، چنین بافتی می‌تواند قند خون را تنظیم کرده و دیابت نوع ۱ را درمان کند. ارگان های قابل‌پیوند چالش نهایی فرایند چاپ سه‌بعدی زیستی خواهد بود، زیرا هم‌اکنون در ایالات متحده ۱۱۸ هزار نفر در فهرست انتظار گرفتن اهدای عضو هستند. چاپگرهای زیستی همچنین می‌توانند در دانشکده‌های پزشکی کارآمد باشند. دانشجویان در حال حاضر بر روی جسد آموزش می‌بینند، اما هنگام برخورد با فرایندهایی مانند سرطان، هیچ چیز با تجربه واقعی



همخوانیندارد. به جای چاپ بافت سالم، چاپگرهای زیستی می‌توانند ارگان‌های دارای تومور یا دیگر نواقص را بسازند، به طوری که جراحان بتوانند پیش از ورود به اتاق عمل، فرایند جراحی را با آن‌ها تجربه کنند.



شکل ۶۱- چاپگر زیستی

## ۳,۲۵ اتوکلاو (Autoclave)

اتوکلاو استریل کننده ای است که میکروارگانیسمهارا با استفاده از بخار آب و گرمای تحت فشار از بین می‌برد.  این گرمای مرطوب جهت استریل کردن محیطهای کشت، ظروف شیشه‌ای در پیچ دار، مایعات و سایر مواردیکه به حرارت حساس نیستند، بکار می‌رود.  اساس کار اتوکلاو به این گونه است:نقطه جوش آب بدون بخار$C^{\circ}$ ۱۰۰ است. مولکولهای آب در بخار پخش می‌شوند. بنابراین وقتیکه در یک محفظه بسته وتحت فشار محصور می شوند، دما افزایش می‌یابد. در فشار $^{lb}/_{inch^2}$ ۱۵ دما تا $^{\circ}C$ ۱۲۱ افزایش می‌یابد.  اگر این فشار و دما به مدت ۱۵ دقیقه ثابت نگهداشته شوند، کلیه میکروارگانیسمهای زنده از بین می‌روند. ظرف استوانه‌ای شکل اتوکلاو از یک دیوار دو جداره فلزی جهت مقاومت در برابر فشار بالا ساخته شده است.  اتوکلاو انداره ها و انواع مختلفی دارد.  مثلاً نوعی که در آن بطور عمودی باز می‌شودو یا نوعی که بطور افقی و دریک جهت باز می‌شود.

شکل۶۲- اتوکلاو

## ۳,۲۶ آون(Oven)

استریلیزاسیون توسط گرمای خشک یا هوای داغ عمدتاً توسط آون انجام می‌شود . استریلیزاسیون با گرمای خشک باعث خروج آب از میکروارگانیسم ها می‌شود. آون یک کابینت فلزی با دیواره های عایق سه جداره و یک درب می باشد.  دیواره خارجی حاوی

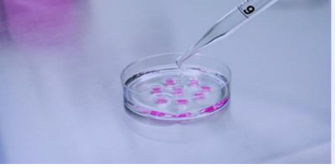
پنبه فسفر بوده، که باعث کاهش انتشار گرما به خارج می‌شود .  در قسمت زیرین آون، سیم‌پیچ های الکتریکی تمام سطح را پوشانده اند و یک صفحه فلزی بر روی آن قرار داده شده است که ظروف شیشه‌ای و سایر وسایل جهت استریل شدن بر روی آن گذاشته می‌شوند.  آون دارای ترموستات، ترمومتر و دستگیره است. ترمومتر دمای داخلی را نشان می‌دهد و ترموستات دما را ثابت نگه می‌دارد. آون علاوه بر استریلیزاسیون، برای خشک کردن وسایل نیز بکار می‌رود. به‌منظور استریلیزاسیون، وسایل باید به مدت ۴ ساعت در دمای ۱۶۰°C قرار گیرند.

شکل ۶۳-آون

## ۳,۲۷ یخچال و فریزر(۲۰–)

هر دو این وسایل برای ذخیره محیط کشت مایع در ۴ درجه سانتیگراد و برای آنزیم ها ( به طور مثال تریپسین ) و برخی دیگر از محتویات محیط کشت ( مانند گلوتامین و سرم ) در ۲۰- درجه بسیار مهم و ضروری هستند.  یخچال برای نگهداری محیط های کشت و بافرها و فریزر برای ذخیره سرم قبل از تقسیم بندی، مواد مغذی و آنتی بادی ها مورد نیاز خواهد بود.  این مواد طبیعی برای ذخیره شدن به دمای ۲۰- نیاز دارند اما سلول ها برای ذخیره و نگهداری به نیتروژن مایع یا فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد نیاز دارند.

شکل ۶۴- یخچال و فریزر(۲۰-)



## ۳,۲۸ 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.

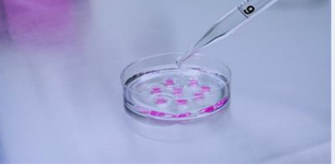
فرآیند فریز کردن سلول ها عموماً برای تمامی انواع سلولی صورت می گیرد. سلول ها باید در فاز تصاعدی رشد با یک نگهدارنده مناسب که معمولاً دای متیل سولفوکسید ( DMSO ) است فریز شوند. سلول ها معمولا ابتدا چند ساعت در ۲۰- درجه قرار داده می شوند و سپس در نیتروژن مایع ۱۹۶- درجه فرو برده می شوند ( در ویال های کوچک 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 اولیت استفاده از نیتروژن مایع است. ویال ها را می توان در یک جعبه پلی استایرنی با دیواره های ۱ اینچی فریز نمود.

شکل۶۵- نیتروژن مایع/ فریزر ( ۷۰-)

## ۳,۲۹ 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 $CO_2$ گازدهی کرده و سپس آنها را محکم بسته ( غیر قابل نفوذ)، به طوریکه نیاز به استفاده از انکوباتور $CO_2$ مرتفع گردد. این حالت خصوصاً زمانیکه انکوباتور به خوبی کار نمی کند مفید خواهد بود.



شکل۶۶-ظروف کشت

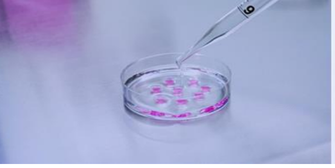
## ۳,۳۰ سیستم اسمزی معکوس

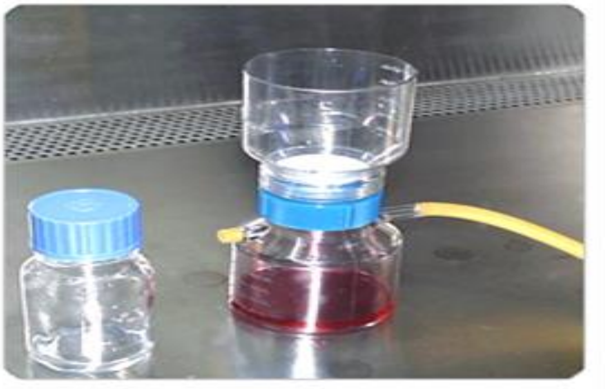
تهیه یک آب دوبار تقطیر شده یا اسمز معکوس برای آماده سازی محیط کشت و شستشوی ظروف شیشه ای ضروری است. PHآب دوبار تقطیر شده باید مرتباً چک شود چرا که در مواردی امکان تغییر در PH وجود دارد. تنوع در کیفیت آب مورد استفاده ممکن است سبب تغییراتی در نتیجه شود، بنابراین آبی که از یک منبع می آید باید مورد استفاده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

شکل ۶۷- سیستم اسمزی معکوس

## ۳,۳۱ استریلیزاسیون فیلتری

محیط هایی که قابلیت اتوکلاو ندارند باید به واسطه عبور از یک فیلتر غشایی با قطر منافذ ۰/۲۲ استریل شوند. این فیلتر ها در اندازه ها مختلف به منظور فیلتراسیون طیف وسیعی از مواد با حجم های مختلف طراحی شده اند. این فیلتر ها می تواند به صورت یک بار مصرف و یا به صورت فیلتر هایی با قابلیت اتوکلاو همراه با یک نگهدارنده مناسب خریداری شوند. محیط های کشت، آنزیم ها، هورمون ها، کوفاکتور ها و بافرهای بیکربنات نمونه ای از این مواد غیر قابل اتوکلاو هستند.



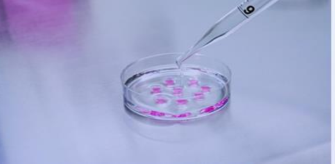


شکل ۶۸- استریلیزاسیون فیلتری

## ۳,۳۲ 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 ارگانیسم یا ماده ی بیوشیمیایی جدا شده از ارگانیسم 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 چراکه در محیط بدن سلول ها در معرض انواع جریان های مایعات و فشارهای 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 میکنند. همچنین وجود نیروهای مختلف مکانیکی برای عملکرد برخی سلول ها ضروری است که در شرایط کشت دوبعدی 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 دستگاهی است که بیوراَکتور 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



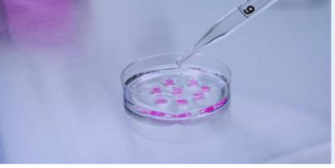
ها، بدلیل حساسیت بالای برخی سلول ها بخصوص برخی سلول های بنیادی، ممکن است نتایج مختلفی از یک آزمایش بدست آید که با توجه به قابلیت تنظیم و کنترل بیوراکتورها در صورت استفاده از آن ها در تحقیقات این مانع نیز برطرف می شود.
در بیوراکتورها بسته به نوع سلولی که مورد مطالعه قرار گرفته و در بیوراکتور کشت می شود 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 دربدن 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.

## ۳,۳۳ مشخصات بیوراکتورها

شرایط محیطی را به گونه ای فراهم کنند 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 ۱۰۰*۱۰۰*۱۰۰ 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 spinner flask، hollow fiber perfusion، direct perfusion bioreactor، دارند که این بیوراکتورها هرکدام مزایا و معایب خاص خود را دارند و بسته به نیاز پژوهشگر و نوع تحقیقات هرکدام از آن ها را می توان برای پیشبرد تحقیقات به کار برد.

## ۳,۳۴ 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 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 فلکون 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.



# هوالعلیم

از گذشتگان منقوش بر ذهن داریم که **«دیکته نانوشته غلط ندارد».**

کتابچه ای که در حال حاضر مشاهده می فرمایید نتایج تلاش ساعت ها نگارش و گردآوری همکاران متعددی در این عرصه بوده است و طبیعتاً شبیه هر اثر علمی دیگر خالی از اشکالات نخواهد بود.

لذا مایه منت بر ما خواهد بود تا از شما دانش آموزان، دبیران، اساتید و فرهیختگان گرانقدر هرگونه نظر، نقد و پیشنهادی در باب ارتقای علمی، نگارشی، محتوایی و ساختاری را پذیرا باشیم. با ما با آدرس isro@stemcell.isti.ir مکاتبه نمایید.

در پناه حق باشید

یا مهدی