جزوه آموزشی- تخصصی شماره ۷۸

بررسی خونسازی انسان در مدلهای حیوانی

Orientation to the Routine blood banks

ترجمه و گردآوری:

دکتر حسین تیموری نقده

دکتر مانا مهران

تهیه شده در مرکز تحقیقات

سازمان انتقال خون ایران

صفحه آرایی و امور رایانه: زهرا مقصودی

□□□□ □□□□□

فهرست مطالب

خونسازی ۱
مدلهای زنوگرافت برای پیوند سلول پایه انسانی..... ۴
الف- مدلهای موشی ۴
- Sever Combined Immuno Defficiency (SCID)..... ۴
- SCID/Beige..... ۵
- Nude mice..... ۵
- Non-Obese Diabetic Scid Mice (NOD/SCID)..... ۵
- NOD/SCIDβ2-Microglobulin null..... ۵
- موش های Mdx..... ۵
- معایب مدلهای موشی..... ۶
ب- مدلهای جنینی ۶
۱- مدل جنینی جهت ارزیابی پلاستیسیتی سلول پایه خونساز ۸
۲- پیوند سلول پایه در مدل های جنینی زنوگرافت ۱۰
- روش های تزریق سلول پایه برای جنین..... ۱۰
کایمرا ۱۲
مدل جنین گوسفندی برای پیوند سلول پایه انسانی ۱۲
ارزیابی ایده ال از خونسازی انسان..... ۱۳
حساسیت مدل کایمرای انسان گوسفند..... ۱۵
ارتباط بیولوژیکی..... ۱۶
وقوع GVHD..... ۱۷
مزایای کایمرا انسان- گوسفند ۱۷
معایب کایمرا انسان- گوسفند..... ۱۸
- راهکارهای افزایش پیوند و تمایز سلول های دونور انسانی در پیوند زنوگرافت انسان- گوسفند..... ۱۸
- فواید استفاده همزمان سلول پایه خونساز انسان و سلول استرومایی..... ۲۰
- روش های شناسایی کایمریسم..... ۲۰

خونسازی

خونسازی یک پروسه ممتد است چرا که همه عناصر خونساز از جمله سلول های پیش ساز چند قوه ای از سلول های بنیادی خونساز (HSCs) تولید می شوند. سلول های بنیادی خونساز در جنین از مکان های مختلفی از جمله کیسه زرده، آئورت، گناد، مزونفروس (AGM) رویان اولیه، کبد رویانی، صفاق جنینی و خون موجود در عروق خونی دوران جنینی که بند ناف را هم شامل می گردد مشتق می شوند. از مهم ترین مکانهای فعال خونسازی، کیسه زرده و کبد است. کبد جنین به عنوان ارگان اصلی خونسازی عمل می کند، هر چند که جنین اولیه پستانداران قبل از تکوین کبد نیز، برای رشد و بقاء به گلبولهای قرمز نیاز دارند.

با آغاز اولین ماه زندگی قبل از تولد، اولین سلول های خونی در خارج رویان و از مزانشیم کیسه زرده به صورت جزایر خونی منشا می گیرند. این سلول ها عمدتا اریتروبلاست های اولیه ای هستند که بزرگ و مگالوبلاستی بوده و داخل عروق شکل می گیرند و هسته های خود را حفظ می کنند.

سپس خونسازی در کبد انسان در هفته ۶ جنینی و در کبد موش در روز ۱۱-۱۰ جنینی آغاز می شود و این عضو به اندام اصلی خونسازی در اوایل و نیمه جنینی مبدل می گردد.

در خارج عروق کبد، اریتروبلاست های قطعی به گلبول های قرمز بدون هسته تبدیل می شوند و گرانولوپوئز و مگاکاریوسیت ها نیز به نسبت کمتری دیده می شود.

در اواسط زندگی جنینی، خونسازی در طحال و تا حد کمتری در غدد لنفاوی فعال می شود ولی کبد کماکان عضو اصلی خونسازی است. در نیمه دوم زندگی جنینی، مغز استخوان به طور پیشرونده به محل مهم تری برای تولید سلول های خونی مبدل می گردد و نقش کبد کاهش می یابد. مدت کوتاهی بعد از تولد، خونسازی در کبد متوقف می شود و مغز استخوان تنها محل تولید اریتروبلاست ها، گرانولوسیت ها و پلاکت ها است. سلول های بنیادی خونساز و سلول های پیش ساز متعهد در BM باقی می مانند.

تولید لنفوسیت ها (از نوع سلول B) همچنان در BM و همینطور در اندام های لنفوئیدی ثانویه ادامه می یابد. در حالی که لنفوسیت های T در تیموس و اندام های لنفوئیدی ثانویه ایجاد می شوند. در هنگام تولد تمام فضای BM توسط مغز استخوان

خونساز قرمز اشغال شده است. همزمان با رشد بـدن در دوران شـیرخواری، فضـای BM افزایش می یابد. تنها قسمتی از این فضـا بـرای خونسـازی لازم اسـت و باقیمانـده فضـا توسط سلول های چربی اشغال می شـود. در دوران کـودکی تنهـا اسـتخوان هـای پهـن (جمجمه، مهره ها، قفسه سینه، شانه ولگن) و قسمت های پروکسیمال اسـتخوان هـای بلند (ران و بازو) مکان های تشکیل دهنده سلول های خونی هسـتند. باقیمانـده فضـای مغز استخوان چرب یا مغز زرد است که مـی توانـد در صـورت تحریـک مـداوم و شـدید، توسط سلول های خونساز مجدداً جایگزین شود (۱،۲،۳).

از مشخصات سلول پایه خونساز قدرت خود تکثیـری (self replication) و تمایـز آن به همه رده های سلولی خونساز است. اگر این امکان وجود داشـت کـه تعـداد سـلول های پایه خونساز را در invitro افزایش دهیم تأثیر عمده ای را روی آینده پیونـد سـلول پایه اتولوگ و آلوژنیک مشاهده می کردیم. بنابراین موضوع ازدیـاد (expanxion) سـلول پایه خونساز در invitro هم اکنون یکی از زمینه های هماتولوژی- انکولـوژی اسـت کـه روی آن تأکید می شود.

امکـان افـزایـش تعـداد پـروژنیتـورهـای خـونسـاز انسـان در محـیط کـشت وجـود دارد. سلـول هـای تشکیـل دهنـده کلـونـی (CFU) در محـیط LTC-IC (Long Term Culture-Initiating Cell) قادر به رشد بـوده و بـرای تنظـیم سـیکل ایـن سـلول هـا از سـایتوکاین هـای ماننـد GM-CSF, IL11. IL6. IL3. IL1 flt3/flk2, C-Kit ligand استفاده می شود. مشاهدات نشان می دهد که استفاده از IL1 و IL3 برای ازدیاد سلول پایه (expansion) در کشت های invitro بر روی توانایی پیوند طولانی مدت این سلول ها در گیرنده ها اثر منفی می گذارد. بنابراین تلاش برای ازدیـاد سلول های پایه خونساز انسانی در invitro مورد توجه قـرار گرفتـه اسـت. همچنـین در محیط invitro می توان سلول پایه را به طور انتخابی برای تبدیل به هر رده سلولی مورد نظر تمایز داد. ولی در این بررسی باید از جمعیت سلول هـای پایـه بسـیار خـالص شـده استفاده نمود، همچنین کشت در invitro مستلزم شـرایط ویـژه اسـت در حـالی کـه در مقابل در آزمایشات پیوند سلول پایه در invitro آزمایش گـر هـیچ کنتـرل و یـا کنتـرل کمی را روی شرایط invitro گیرنده پیوند ندارد، زیرا مدیاتورهای مورد نیاز برای سـلول های پایه که باعث تغییرات برجسته ای در سرنوشت این سلول ها می شـوند در invivo به میزان زیادی ناشناخته اند. از طرفی بررسی invitro قادر به ارزیابی الگوهای مهاجرت

و لانه گزینی سلول های پایه برای تمایز به بافت ها و ارگان ها نبوده، بنابراین در حال حاضر بهترین راه برای ارزیابی توانایی تمایز سلول های پایه انجام مطالعات پیوند در invivo است. به دلیل محدودیت های بیولوژیکی مربوط به سیستم های ارزیابی invitroاز بررسی پیوند و تمایز سلول های پایه انسانی دریک محیط زنوژنیک استفاده می شود.

مطالعات اخیر در مدلهای حیوانی به طور قاطع نشان داده است که تعداد قابل توجهی از هپاتوسیت های فانکشنال مشتق شده از سلول پایه دونور در کبد گیرنده های پیوند شکل گرفته و یا شناسایی آلبومین انسانی، فعال بودن این سلول ها مشخص می شود.

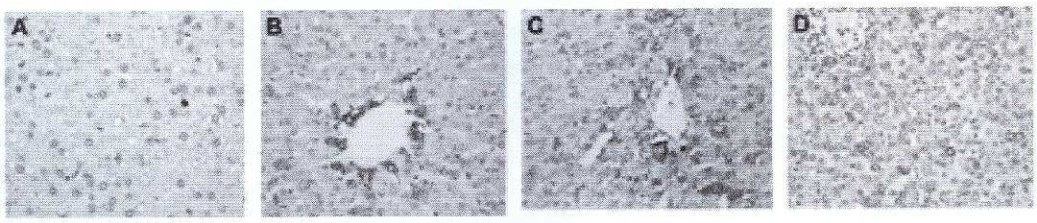

Figure 1. Adult human HSCs generate significant numbers of hepatocytes in a noninjury fetal model. (A) Control sheep liver section (nontransplanted) stained with an antibody antihuman hepatocyte (clone OCH1E5) as described in "Materials and methods." (B-C) Liver sections obtained at 3 weeks (B) and 4 months (C) after transplantation from sheep that received transplanted human BM $CD34^{+}Lin^{-}$ cells, stained with the same antibody showing a higher number of human hepatocytes in the latter (C). (D) Liver section obtained at 11 months after transplantation from sheep that received transplanted CB-derived $CD34^{-}Lin^{-}$ cells, stained with antihuman hepatocyte antibody. Human hepatocytes in all sections can be identified by the dark brown coloration.

علاوه بر آن این سلول ها می توانند تصحیح یک نقص کبدی را انجام دهند. مطالعات دیگر در مدل حیوانات کوچک شواهدی را فراهم آورده که سلول های حاضر در سیستم خونساز توانایی تبدیل شدن به سلول های عضلانی، عصبی ظاهرا فانکشنال را در گیرنده هایی که دارای نقص سلولی یا مولکولی خاص هستند دارند.

تحقیقات در مورد انسان موید این است که هپاتوسیت های مشتق شده از دونور، سلول های نورونی و کاردیومیوسیت ها بعد از پیوند سلول پایه خونساز در بدن گیرنده پیوند تشکیل می شوند.

این شاهد که سلول های پایه خونساز توانایی تبدیل شدن به عناصر سلولی غیر خونساز را در بافت های مختلف دارند بالا گرفته بنابراین استفاده از سلول های پایه خونساز جهت بازسازی بافت ها و ارگان های آسیب دیده مطرح است. علیرغم وجود ماهیت پلاستیسیتی این سلول ضرورت برای بدست اوردن یک مدل آزمایشی که به سلول های دهنده اجازه دهد سلول های دیگر بافت های غیر وابسته را تحت شرایط فیزیولوژیکی نرمال ایجاد کند مورد توجه قرار گرفته است. البته در صورت عدم فشار انتخابی تمایز سلول های پایه خونساز به دیگر تایپ های سلولی از جمله هپاتوسیتهای بالغ به میزان زیادی غیر کارآمد بوده و وجود این فشار انتخابی برای تمایز سلول پایه به سلولی مثل هپاتوسیت لازم است.

مدلهای زنوگرافت برای پیوند سلول پایه انسانی

الف- مدلهای موشی: استفاده از این مدل معمول ترین روش برای بررسی سلول های پایه خونساز انسانی است. در این مورد مشکل اولیه پاسخ سیستم ایمنی این حیوان علیه آنتی ژنهای بیگانه است و مشکل دیگر موضوع اختصاصیت گونه ها برای فاکتورهای ریز محیطی است که بر روی فعالیت سلول دهنده اثر می گذارد. پاسخ ایمنی را می توان با به کاربردن مدلهای حیوانی که نقص سیستم ایمنی دارند حذف نمود.

۱- Sever Combined Immuno Defficiency (SCID):

موشهای SCID در تکامل سلول های B و Tدارای نقص هستند. این نقص به علت جهش در ژن $prkdc^{scid}$ یا به اختصار scid است که روی کروموزوم ۱۶ قرار دارد. این جهش موجب نقص در لنفوسیت های B و T با ایجاد نقص در باز آرایی V(D)J آنها می گردد. ژن $prkdc^{scid}$ برای بازآرایی موفقیت آمیز قطعات ژنی TCR و Ig مورد نیاز است. این مدل با عدم وجود سلول های B و T فعال، هیپوگاماگلبولینمی، و ریز محیط نرمال همراه است. سویه های هموزیگوت IgG2a, IgG, IgG2b, IgA, IgM, IgG 1 قابلیت شناسایی ندارند. تیموس، غدد لنفاوی و فولیکول های طحالی واقعا خالی از لنفوسیت بوده، موشهای SCID پیوندهای آلوژنیک و زنوژنیک را قبول کرده، همین آنها را به مدل ایده الی برای آزمایشات انتقالی سلولی تبدیل کرده است. برخی موش های SCID به

طور خودبخودی واکنش ایمنی نسبی می دهند که سطح Ig آنها بیشتر از ۱μg/ml است. این جهش موجب می شود این روش ها حساسیت زیادی به اشعه داشته باشند. در این موش ها سطح بالایی از سلول های NK وجود دارد (۹).

۲ SCID/Beige این موش ها علاوه بر آن که دارای نقص در ژن scid هستند در عملکرد سلول های Tسیتوتوکسیک و ماکروفاژهای آنها نیز نقص وجود دارد. همچنین فعالیت های سلول های NKدارای impairment انتخابی هستند. این موش ها به عنوان یک مدل بالقوه پیشرفته برای مطالعات زونوژنیک و بیماری های عفونی است.

۳- Nude mice این مدل بدون تیموس و مو متولد می شوند. این خصوصیات به علت جهش هموزیگوت در ژن nu ایجاد می شود. چون این مدل فاقد تیموس هستند نمی توانند سلول های T بالغ تولید کنند. بنابرانی قادر به انجام بسیاری از پاسخ های ایمنی از جمله موارد زیر نمی باشند.:

الف- تولید آنتی بادی که نیاز به سلول های $T\ heler\ CD4^+$ دارد.

ب- واکنش تاخیری ازدیاد حساسیت که نیاز به سلول های $CD4^+$ دارد.

ج- کشتن ویروس ها یا سلول های بدخیم که نیاز به سلول های Tسیتوتوکسیک $CD8^+$دارد.

د- رد پیوند که نیاز به سلول های $CD4^+$ و $CD8^+$ دارد.

عدم وجود سلول های T فعال باعث می شود این موش ها علاوه بر عدم رد پیوند آلوگرافت توانایی رد پیوند زنوگرافت را نیز داشته باشند.

۴- Non-Obese Diabetic SCID Mice (NOD/SCID) این موشها علاوه بر خصوصیات موش های SCID دارای نقص در فعالیت سلول های NK، ماکروفاژها و کمپلمان نیز هستند (۱۰).

۵- NOD/SCIDβ2-Microglobulin null که این موش ها علاوه بر خصوصیات موش های NOD/SCID فاقد بتا دو میکروگلوبولین می باشند. این موش ها نقص ایمنی بیشتری دارند و در سلول NK عملکردی نداشته که برای قبول پیوند زنوگرافت لازم است.

۶- موش های Mdx: نقص این موش ها میلودیستروفی عضلانی است. مطالعات نشان می دهد وجود سلول های فعال شده و یا سیگنالینگ از ریز محیط یک ارگان خاص باعث القاء تمایز و تقسیم سلول پایه به سلول های ارگان های ناقص یا صدمه زده

می شود. در این مورد چون نقص به یک ارگان محدود است لذا با این مدل نمی توان پتانسیل کامل جمعیت های سلولی پیوند شده را بررسی نمود.

معایب مدلهای موشی

۱- طول عمر موش نسبتاً کوتاه است بنابراین ارزیابی طولانی مدت حتی با وجود شرایط ایده ال پیوند سلول انسانی غیر ممکن است.

۲- محدودیت در رده های سلولی و بیان گذرای سلول انسانی.

۳- ایجاد لنفومای تیموسی که مشاهده طولانی مدت پیوند را از بین می برد.

۴- کوچک بودن موش و سطح پایین پیوند البته به جز زمانی که تعداد زیادی سلول پایه تزریق شود در این مدل است.

۵- یافته ها در موش نمی تواند نشان دهنده وضعیت در حیوانات عالی تر و انسانی نیز همان گونه باشد. لذا استفاده از مدل هایی که از لحاظ تکاملی به انسان نزدیک تر هستند توصیه شده است (۱۱).

در مورد مشکل اول حتی زمانی که ریز محیط انسانی همزمان با سلول های پایه به موش SCID/hu پیوند می شود این مدل انعکاس واقعی از خونسازی نرمال انسانی نیست.

ب- مدل های جنینی

در تکامل جنین پستانداران الگوهای مهاجرت سلول پایه وجود سایت های پیوندی و لانه گزینی، ازدیاد و تکثیر سلول پایه و وجود سیگنالهای مخصوص بافت یا ارگان، ایده هایی را برای پتانسیل کامل سلول های پایه فراهم آورده است.

جنین نرمال پستانداران در یک دوره از زندگی به نام پنجره فرصت (window of opportunity) توانایی پذیرش پیوند زنوگرافت و آلوژنیک را دارد.

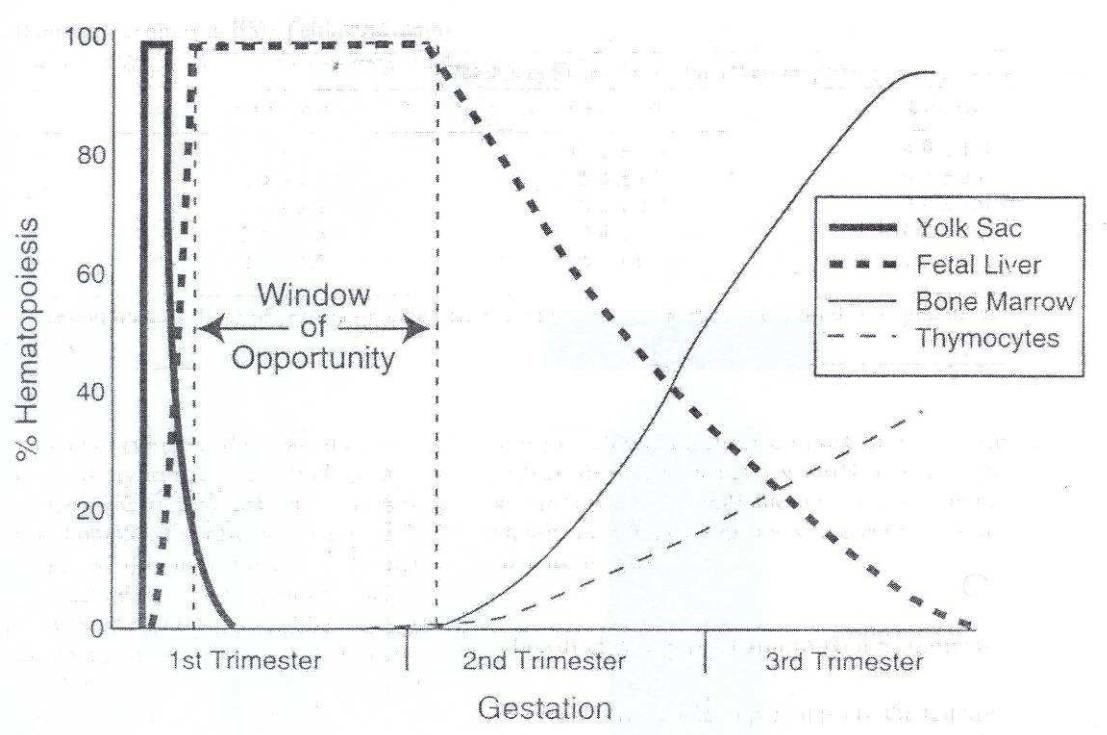

Fig. 1. Schematic representation of hematopoietic ontogeny in mammals of long gestation. The "window of opportunity" is prior to the appearance of mature thymocytes in the peripheral circulation and prior to migration of hematopoiesis to the fetal BM.

چون جنین دارای سادگی نسبی ایمنولوژیکی است به سلول های پایه زنوگرافت و آلوژنیک اجازه پیوند می دهد و این پیوند برای مدت طولانی می تواند باقی بماند. این امر باعث شده است که جنین در حال تکامل برای ارزیابی پتانسیل in vivo سلول های پایه مختلف استفاده شود. تکثیر سلولی سریع جنین می تواند پیوند سلول های پایه مختلف را حمایت کند. در ابتدای تکامل ایمنولوژیکی قبل از پروسسینگ لنفوسیت های بالغ توسط تیموس که جنین به آنتی ژن های خارجی مقاوم است، مواجه شدن با آنتی ژن در جریان این دوره باعث ایجاد تولرانس شده که اگر عرضه این آنتی ژن باقی بماند تحمل به طور دائمی باقی خواهد ماند. به نظر می آید تولرانس سلولی ثانویه به حذف لنفوسیت های واکنشی در تیموس باشد، در حالی که مکانیسم تولرانس لنفوسیت B به حذف و ساپرس کلونی مربوط می شود.

نتیجه نهایی در یک سیستم ایمن به طور ویژه به سلول های پیوند شده تولرانس یافته و به طور نرمال با آنتی ژن های درگیر واکنش می دهد. در مرحله ای از دوره جنینی و تکامل مغز استخوان، این ارگان خالی از سلول های خونساز بوده و منتظر

مهاجرت عناصر خونساز از کبد جنین است، بنابراین دریافت سلول پایه خونساز به فضای خالی در مغز استخوان نیاز دارد. لذا مدل جنین گوسفند به عنوان بهترین مدل برای بررسی سلول پایه خونساز معرفی شده است.

۱- مدل جنینی جهت ارزیابی پلاستیسیتی سلول پایه خونساز

یک ارگانیزم پر سلولی از یک سلول پایه چند قوه ای Totipotent واحد که تحت چندین سیکل تقسیم و تمایز در جریان پروسه های پیچیده تکامل به وجود می آید. این سلول پایه اولیه و اصلی چند قوه ای با هر بار تقسیم در برخی از آنها خصوصیت چند قوه ای کم شده و به یک بافت خاص یا رده سلولی تعهد می یابند. در ابتدا این طور تصور می شد که هر یک از سه لایه جنینی مسوول تشکیل بافت های بالغ خاصی هستند. به طور مثال مغز و پوست از اکتودرم، خون و عضله از مزودرم و روده و هپاتوسیت ها از آندودرم منشأ گرفته اند. در حالی که هپاتوسیت های بالغ قادرند از فرم بالغشان به فنوتیپ اولیه تر تبدیل شده و پتانسیل تمایزی وسیع در حضور فاکتورهای رشد مناسب و سیگنالینگ های ماتریکس داشته باشد. در هر کدام از این موارد، این طور فرض شده است که این سلول پایه ضرورتا مختص بافت هستند و می توانند فقط برای تشکیل سلول های امبریوژنی بافت های مربوط شرکت کنند. به هر حال برخی از مطالعات اخیرا شواهدی را فراهم آروده است که سلول های پایه که از بافت های مختلف جدا شده اند این توانایی را دارند که به سلول های ارگان های غیر مربوطه تبدیل شوند.

بر این اساس فرضیه ای که بیان می کند که ممکن است تمایز و تعهد رده سلولی پروسه های غیر قابل برگشتی باشند، رد می شوند.

پلاستیسیتی ظاهری این سلول های پایه زمینه های جدیدی را از تحقیق سلول پایه باز می کند، چون اگر چه در خصوصیات این سلول ها از درک توانایی کامل آنها جلوگیری می کند ولی قدرت چند قوه ای (Pluripotency) به طور واضحی نشان می دهد که برای درمان های مختلف می توان از آنها استفاده نمود. اگر چه مکانیسم هایی که طی آنها یک تغییر در سرنوشت سلول ایجاد می شود در حال حاضر ناشناخته است روشن است که برای عملکرد مناسب، این سلول ها می بایست به ارگان هدف برسند و سیستم گردش خون یک سیستم توزیعی کارآمدی را برای سلول پایه در طول زندگی فراهم آورده است.

در جریان زندگی جنینی یک سری از پروسه های مهاجرت کاملا ثابت شده اند. سیستم گردش خون تضمین می کند تعداد کافی از سلول های پروژنیتور یا سلول پایه به بافت ها یا ارگان های هدف زمانی که مورد نیاز باشند برسد. به این دلیل این طور فرض شده است که راه ایده ال برای ارزیابی پلاستیسیتی کامل سلول پایه ی انسانی پیوند سلول های پایه، به گیرنده های جنینی است. در نقطه ای از تکامل وقتی که همه ارگان ها شروع به تمایز کردند، نیاز به رشد و تمایز می تواند هنوز امکان برنامه ریزی مجدد سرنوشت سلول های پایه پیوند شده را از طریق تحریکات سلولی فراهم آورد، بدون اینکه به سلول های پیوند شده جهت سازگاری به یک سرنوشت خاص و واحد فشاری از جمله آسیب یا القاء بازسازی (Regeneration) دریک ارگان خاص وارد آید.

وقتی که پیوند سلول های دهنده انسانی در جریان دوره جنینی انجام می شود به این دلیل که در جنین همه ارگان ها سریعا تکثیر و تمایز می یابند سلول های پیوند شده می باید شانس حضور در هر ارگانی را برای تبدیل شدن به سلول های متمایز به دست آورند با این ادعا که سلول های پیوند شده پتانسیل تبدیل شدن به سلول های مختلف را دارند.

اگر این فرضیه که اثر ریز محیطی مناسب می تواند به یک سلول با فنوتیپ بالغ القاء کند به گونه ای که این سلول به یک حالت تمایز نیافته برگردد و مثل یک سلول پایه اولیه شروع به تمایز به یک رده جدید نماید درست باشد پس این جنین می تواند یک سیستم ایده ال برای بررسی توانایی سلول پایه خونساز فرد بزرگسال باشد.

خصوصیتی از جنین که نمی توان آن را نادیده گرفت این است که جنین در یک کیسه پر از مایع شناور است که نتیجه آن بی وزنی است. شواهد زیادی نشان می دهد حداقل در مراحل اولیه تکامل، شرایط بی وزنی (Microgravity) می تواند به طور برجسته ای ژن هایی را که توسط انواع زیادی از سلول ها بیان می شوند تغییر دهد و این شرایط برای تکرار توانایی سلول هایی که در invitro رشد می کنند لازم است.

حالت بی وزنی در جنین اولیه ممکن است که نقش مهمی را در پروسه های نرمال تکامل جنین ایفا نکند اما ممکن است پیوند درگیرنده جنین یک سیستم بی همتا برای سلول های پایه پیوند شده باشد که می تواند رنج کاملی از پلاستیسیتی، پتانسیل سازگاری با تغییراتی که در invitro مشاهده نمی شود را داشته باشد.

۲- پیوند سلول پایه در مدل های جنینی زنوگرافت

پیوند سلول پایه انسانی در حیوانات نرمال بالغ، Preimmune، تضعیف ایمنی شده یک مدل واقعی برای ارزیابی مناسب فعالیت سلول پایه یا ظرفیت جایگزینی بافتی بعد از صدمه آزمایشی به بافت است. در حیوانات بالغ به طور آزمایشی صدمه بافتی می تواند به طور نسبی یا پیوند سلول پایه زنوژنیک یا سینرژیک جایگزین شود. جنین های گوسفند Preimmune بعد از دریافت سلول پایه انسانی،کایمریسم انسانی در مغز استخوان آنها در زمان تولد قابل شناسایی بوده بعلاوه سلول های تمایز یافته غیر خونساز انسانی در ارگان های با منشا آندودرمی نیز ایجاد می شود.

در پیوند قبل از تولد، زمان بارداری فاکتور عمده ای برای تثبیت تحمل ایمنی جهت پیوند بوده و مزیت پتانسیل بالای جنین است.

پیوند سلول پایه خونساز در مدل جنینی

همان طور که اشاره شد جنین گوسفند به عنوان بهترین مدل برای بررسی هماتوپویز انسانی در مدلهای زنوگرافت است.

مدت آبستنی در گوسفند ۱۴۵ روز است. پیوند سلول پایه خونساز به صورت درون پریتوان در زمان قبل از تولد از طریق تلقیح به بالب آمنیوتیک در روز ۵۵ آبستنی صورت می گیرد. اهمیت زمان آبستنی به فاکتورهای مختلفی وابسته است که شامل:

الف- بلوغ پیشرونده سیستم ایمنی که به میزان زیادی رقابتی شده و کمتر با آنتی ژن های خارجی تحمل می یابد.

ب- افزایش تعداد سلول های خونساز تولید شده بوسیله خود جنین که سایت های طبیعی برای خونسازی را پر می کند و به میزان زیادی با سلول های پیوند شده رقابت می کند.

روش های تزریق سلول پایه برای جنین

تزریق سلول پایه برای جنین به صورت داخل صفاقی یا داخل سلومی است. روش داخل سلومی یک نظر جالب برای تجویز سلول پایه بوده چون از نقطه نظر تئوری اجازه می دهد بتوان تزریق را زودتر انجام داد. زمانی که پیش از تولد به یکی از جنین های گوسفند Comiso که دو قلوزایی در آنها معمول است سلول های $CD34^+$ خالص شده و

به جنین دیگر بـه عنـوان کنتـرل سـرم فیزیولـوژی از طریـق درون سـلومی در شـرایط آسپتیک تزریق می شود. عمل تزریق درون سلومی به ایـن صـورت اسـت کـه توسـط اولترا سوند حفره سلومی هر جنین دوقلویی قابل رویـت شـده سـپس سـلول هـای پایـه خونساز $CD34^+$ تحت شرایط از طریق transabdominal تزریق می شوند.

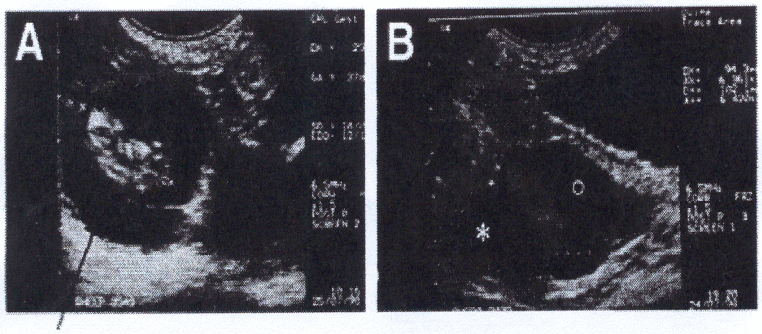

Figure 2. A) Ultrasound picture of a 37-day-old age ovine embryo with evidence of celomic cavity (arrow). B) Celomic (*) and amniotic (°) cavities in an ovine embryo under 50 days of gestational age.

۴۵۰ روز بعد از تولد ۱۰٪ سلول هـای مغـز اسـتخوان را سـلول هـای $CD34^+$ انسـانی تشکیل می دهند. وقتی که میزان سلول های تزریق شـده در تسـت بعـدی بـه دو برابـر رسید میزان سلول های $CD34^+$ موجود در مغز استخوان به ۲۰-۳۰٪ رسید. همانطور که اشـاره شـد پیونـد درون رحمـی بـه جنـین گوسـفند Preimmune یـا مـوش هـای NOD/SCID در حال حاضر مدل های موجود برای ارزیابی پیوند سلول پایه در in vivo است. میزان کایمریسم خونساز انسانی در این مدلها ۰/۱-۳۵٪ بسته به زیر رده، تعـداد و منبع سلول پایه تزریق شده است.

از نقطه نظر تئوری فعالیت فاکتورهای امبریوژنیک از سلول پایه چند قـوه حمایـت کرده و می تواند در مراحل اولیه آبستنی وقتی که هم تحمل ایمنی به آلوگرافـت بیشـتر است از این سلول های پایه حمایت کند. ارزیـابی هـای انجـام شـده در گوسـفند جهـت انتقال سلول های پایه خونساز بسـیار مفیـد بـوده اسـت و از نتـایج ایـن بررسـی هـا در مطالعات پاراکلینیک استفاده می شود. پیوند سلول هـای $CD34^+$ بسـیار خـالص از مغـز استخوان بالغین دررحم مادر باعث پیوند طولانی مدت بدون GVHD مـی شـود. از ایـن استراتژی برای پیوند زنوژنیک و آلوژنیک جهت درمـان موفقیـت آمیـز جنـین مبـتلا بـه

SCID وابسته به جنس استفاده شده است و این روش یک روش جایگزین برای سقط انتخابی این گونه بیماری های ارثی است.

کایمرا چیست؟

کایمرا موجودی است که با تزریق سلول پایه جنینی یا سلول پایه گونه دیگر به یک جنین در حال تکامل به وجود می آید. اصطلاح کایمرا از یک حیوان افسانه ای یونانی منشا می گیرد که قسمتی از بدن آن از بز، بخشی از آن شیر و یک قسمت از بدنش از اژدها گرفته شده است. سیستم ایمنی جنین گوسفند در مرحله ای از تکامل قادر به شناخت سلول های بیگانه نیست. بنابراین سلول های انسانی را قبول کرده و آنها را در ارگان های مختلفشان شرکت می دهد. این سلول ها می توانند توسعه و تکثیر یابند. سیگنال های رشد گوسفند باعث می شود که سلول های پایه انسانی به سلول کبدی، پوستی و انواع دیگر سلول ها تکامل یابند. در برخی از موارد ۷-۱۵٪ سلول های کبدی یک گوسفند کایمریسم را سلول های انسانی تشکیل می دهند. بنابراین اگر سلول پایه مغز استخوان بیماری را که تازه کبدش از کار افتاده است در یک زمان خاص به جنین گوسفند تزریق نمایند، بعد از تولد این نوزاد سلول های کبدی انسانی را برداشت نموده که این سلول ها کاملا با سیستم ایمنی بیمار سازگار هستند و در واقع سلول های خود بیمارند و از آنها می توان برای اصلاح آسیب کبدی استفاده نمود. شاید در آینده بتوان با تزریق سلول های پایه انسانی در مرحله ای از تکامل جنین گوسفند یک ارگان کامل انسانی به دست آورد (۱۲).

مدل جنین گوسفند برای پیوند سلول پایه انسانی

در این مدل، از تکامل جنین Preimmune در مرحله اولیه آبستنی که به یک حیوان بزرگ تکامل می یابد جهت پلاستیسیتی سلول پایه خونساز استفاده می شود. به دلایل ذیل جنین گوسفند یک مدل ایده ال جهت پیوند سلول پایه و بررسی پلاستیسیتی آن می باشد.

۱- اندازه بزرگ گوسفند و دوره زندگی طولانی آن اجازه می دهد که فعالیت سلول دونور در این حیوان برای سالها بعد از پیوند بررسی شود.

۲- تعداد کافی از سلول های پایه خونساز از گیرنده اولیه گرفته و آنها را برای یک جنین گوسفند دیگر به عنوان گیرنده ثانویه تزریق نمود و به بررسی فعالیت سلول گیرنده اولیه در گیرنده ثانویه پرداخت. این فرصت آزمایشی به آسانی توسط مدلهای موشی به دست نمی آید.

۳- جنین گوسفند دارای خصوصیات تکاملی و فیزیولوژیکی بسیار نزدیکی با انسان بوده بعلاوه به دلیل اندازه بزرگ جنین گوسفند امکان دستکاری های اولیه در آبستنی فراهم آمده است.

۴- دستورالعمل جهت به دست آوردن و نگهداری و دسترسی به جنین گوسفند کاملا مشخص و ثابت شده اند.

۵- در این مدل به علت وجود الگوهای مهاجرت طبیعی که در جنین وجود دارد سلول های پایه خونساز دهنده در بدن جنین توزیع شده و سلول ها تحت اثر تحریک محیطی ارگان یا بافت خاص تکثیر و تمایز می یابند.

۶- عدم وجود شرایط سرکوبگر مغز استخوان سلول های پایه خونساز انسانی پیوند شده با سلول های پایه آندوژنوس برای دسترسی به محل های موجود در مغز استخوان رقابت می کنند و این سیستم یک سیستم بیولوژیکی فعال محسوب می شود.

۷- در این مدل چون بعد از تولد محل های جدید در مغز استخوان در حال تشکیل شدن هستند تزریق دوزهای یادآور سلول های CD34+ بعد از تولد باعث می شود این سلول ها در این محل ها جایگزین شوند و در مقایسه با گروه کنترل افزایش قابل توجهی در سلول های پیوند شده می شود.

ارزیابی ایده ال از خونسازی در انسان

۱- این ارزیابی برای سلول پایه خونساز انسانی اختصاصی باشد.

۲- پیوند Multilineage داشته باشد یعنی همه رده های خونساز اریتروئیدی، لنفوئیدی و میلوئیدی را بیان کند.

۳- حساس باشد یعنی با تزریق تعداد کمی سلول پیوند ایجاد شود.

۴- کمی باشد.

۵- قابلیت تولید داشته باشد.

۶- قابلیت پاسخ بیولوژیکی داشته باشد.
۷- وابستگی بیولوژیکی با انسان داشته باشد.

چنین ارزیابی از سلول پایه خونساز ویژه است. مثلا سلول پایه خونساز چند قوه پیوند شده در این سیستم فعال است. سلول های پیوند شده یک جزء بیولوژیکی اند که به تنظیم خارجی پاسخ می دهند. در طولانی مدت یا به طور دائم بیان چند رده Multilineage از سلول های پیوند شده و پاسخ به سایتوکاین ها یا دیگر عوامل تنظیم کننده خونسازی خواهند داشت. این سیستم کمی بوده و قابلیت تولید داشته و به میزان زیادی حساس است که حتی تعداد بسیار کم سلول پایه خونساز قابل شناسایی است. در نهایت این سیستم از لحاظ بیولوژیکی فعال است یعنی رفتار این ارزیابی نمایی از رفتار خونسازی انسان تحت شرایط نرمال یا پاتولوژیک است. هم اکنون هیچ مدل به اندازه مدل انسان- گوسفند به طور کامل رضایت را برای این نیازها برآورده نکرده است.

با توجه به وجود تفاوت در سایتوکاین های مخصوص گونه ها در این مدل فرصتی را برای بررسی انتخابگر پاسخ سلول های پیوند شده انسانی در برابر تحریک سایتوکاین ها ی انسانی در یک ریز محیط زنوگرافت فراهم آورده شده است.

در مطالعه اولیه سعی شده است که بیان سلول پایه خونساز انسان را با استفاده از تزریق آهسته اینترلوکین-۳ نوترکیب انسانی و GM-CSF به گوسفند کایمریک یک ساله که سطح ثابتی از پیوند سلول انسانی را نشان می دهد افزایش دهند. بیان سلول انسانی قبل و بعد از تزریق سایتوکاین ها در مغز استخوان و خون محیطی به وسیله آنالیز کاریوتایپی و سطح بیان این سلول با روش FISH تایید شد.

تحریک سایتوکاین های انسانی باعث ۲/۱-۳/۴ برابر شده بیان سلول های انسانی در مغز استخوان و افزایش بیشتری در سلول های موجود در خون محیطی می گردد. آنالیز با FISH سطح بالای سلول های انسانی را در خون محیطی و مغز استخوان به دنبال تحریک تایید نمود.

اثر تزریق مداوم C-kit ligand انسانی نوترکیب یا سلول پایه فاکتور نوترکیب انسانی (rHu-SCF) بر روی پیوند سلولی انسان در گوسفند Preimmune و بر روی بیان سلولی انسان در کایمراهای انسان- گوسفند بررسی شده است. در مطالعه قبل از تولد rHu-SCF از طریق کاتترهای درون پریتوانی به یکی از جنین های دو قلو که سلول پایه دریافت کرده بود تزریق شد و به جنین دیگر به عنوان کنترل فقط سرم فیزیولوژی

تزریق شد این تزریق به مدت ۱۰ دوز در جریان پیوند انجام شد. در زمان تولد با فلوسایتومتری افزایش تقریباً ۱۰ برابر فرکانس سلول های انسانی در مقایسه با گروه کنترل دیده شد.

در بررسی دیگر کایمراهای انسان- گوسفند دو ساله که rHu SCF را از طریق درون صفاقی دریافت کرده بودند یک افزایش ۶-۷ برابر را در بیان سلول انسانی محیطی،همچنین افزایش ۳-۴ برابر در بیان CFU/MIX و BFU-E و یک افزایش حداقل در CFU/MIX داشتند.

این واقعیت که جمعیت سلولی انسان در کایمرا با ترکیب سایتوکاین انسانی حتی بعد از گذشت سالها از پیوند با پایداری کم اتفاق می افتد پیشنهاد می کند که یک جمعیت خاموش از سلول پایه خونساز انسانی در مغز استخوان این گوسفند وجود دارد.

به نظر می آید در حالی که زنده ماندن و درجه ای از خونسازی انسانی ممکن است در Microinvironment گوسفند باقی بماند ولی بیان ماکزیمم سلول انسانی نیاز به فاکتورهای تنظیم کننده انسانی ویژه را در این مدل حمایت نموده و پیشنهاد می کند که مدل انسان- گوسفند برای ارزیابی in vivo نقش فاکتورهای تنظیم کننده انسانی در خونسازی نرمال و غیر نرمال مفید است.

حساسیت مدل کایمرای انسان گوسفند

توانایی شناسایی تعداد کم HSC پیوند شده برای ارزیابی جمعیت های سلولی غنی ضروری است. در حالی که سلول های نسبتا کمی ممکن است موجود باشد و مطالعات برای آنالیز کمی فرکانس HSC در جمعیت های سلولی لازم باشد. ارتباط مدل حیوانی بزرگ برای ارزیابی جمعیت خالص شده، مشکل رقیق شدن سلول ها در تعداد بسیار زیاد سلول خونساز در مغز استخوان میزبان را به همراه دارد. به عبارتی دیگر اگر چه گوسفند بالغ بزرگ است اما گیرنده Preimmune در زمان پیوند وزنش به اندازه ۱۰ گرم است که از اندازه متوسط یک موش کوچک تر است.

در مطالعاتی که توسط Drs ، هافمن انجام شد یک جمعیت سلولی بسیار غنی شده $CD34^{+}HLADR^{-}$ از مغز استخوان فرد بزرگسال استفاده شده است که این جمعیت سلولی ۰/۸-۰/۴۵٪ سلول های هسته دار مغز استخوان را شامل می شوند و این سلول ها قادر به کشت های طولانی مدت اولیه LTC-IC مغز استخوان هستند.

تولید ایمنوگلبولین های انسانی توسط سلول های +CD45 حاصل از کایمریسم با در معرض قرار گرفتن آنها در محیط in vitro با Pokewed تمایز B cell و بلوغ آن را نشان می دهد. و بالاخره سلول های HLADR $CD38^+$ در مغز استخوان در گوسفندهای کایمرا قابل شناسایی بود.

سلول هایی که قادر به جمعیت سازی طولانی مدت هستند جمعیت سلولی $CD38^+$ اند یا $CD38^-$ ؟

برای پاسخ به این پرسش به یکی از جنین های دو قلو Preimmune سلول های $CD38^+$، Lin^-، $CD38^+$ و به جنین دیگر $CD38^-$، Lin^-، $CD34^+$ به میزان cell/fetus ۳×۱۰^{۶} تزریق شد. ۶۰ روز بعد از پیوند که جنین ها قبل از ترم از رحم خارج شده و برای سلول های پروژنیتور مورد ارزیابی قرار گرفتند، سلول های $CD45^+$ هم از مغز استخوان آنها ایزوله شد و سلول های $CD38^-$ و $CD38^+$ به گیرنده های جداگانه تزریق شد.

جمعیت $CD38^+$ پیوند شده بیان کمی را برای مدت ۶۰ روز در مغز استخوان گوسفند داشت. این سلول های $CD38^+$ زمانی که به گیرنده جنین دیگری پیوند زده می شود قادر به پیوند طولانی مدت نبودند. در عوض جمعیت سلولی $CD38^-$ خصوصیت خونسازی چند رده ای انسانی را هم در گیرنده های اولیه و هم گیرنده ثانویه داشت و جمعیت سازی طولانی مدت را در این جمعیت نشان می دهد.

این مطالعات حساسیت مدل انسان- گوسفند را برای شناسایی سلول پایه خونساز در جمعیت های سلولی خالص حتی زمانی که تعداد نسبتا کمی سلول تزریق شود را تایید می کند.

همچنین ظرفیت تمایز این مدل برای تعیین جمعیت های سلولی که قادر به تشکیل مجدد کوتاه مدت و طولانی خونسازی بودند را تعیین می کند.

ارتباط بیولوژیکی

آیا سلول های انسانی در محیط گوسفند به شیوه مربوط به بیولوژی انسان رفتار می کنند، یعنی آیا مدل انسان- گوسفند می تواند تخمین درستی از سیستم خونسازی انسان باشد؟

سلول های انسانی در محیط گوسفند- انسان به سایتوکاین های انتخابی که پاسخ مغز استخوان را برای سلول های انسانی برمی انگیزد جواب داده و این پاسخ ها آنالوگ با پاسخ های خونسازی انسان است.

وقوع GVHD

در بره هایی که سلول پایه خونساز دریافت کرده اند در پیوند سلول پایه خونساز انسان می توان سلول پایه خونساز را از چهار تا منبع کبد جنین انسان، بند ناف و مغز استخوان فرد بالغ،و خون محیطی تهیه نمود. وقوع GVHD در گیرنده های بندناف، خون محیطی و مغز استخوان فرد بالغ بیشتر مشاهده می شود و باعث می شود میزان بیشتری از تولد در گیرندهای جنینی صورت گیرد. تنها مدلی که باعث GVHD نمی شود کبد جنین است و یا زمانی که سلول های بسیار خالص شده از منابع بعد از تولد مورد استفاده قرار گیرند.

مزایای کایمریسم انسان- گوسفند

۱- این سیستم آزمایشی برای مطالعه خونسازی نرمال و غیر نرمال در in vivo است.
۲- نابالغ بودن ایمنولوژیکی جنین
۳- وجود فضای مغز استخوان که از نیاز به Marrow conditioning جلوگیری می کند. چون زمانی که نقص ایمنی توسط اشعه القاء می شود، ممکن است نتیجه آن Abnormality های استرومال باشد که باعث محدودیت در پیوند سلولی در این مدل می شود.
۴- در این مدل می توان با مرور آنتوژنی خونسازی، وقایع خونسازی مهاجرتی و تکامل را مورد بررسی قرار داده و این مدل حیوان بزرگ مزایای بیولوژیکی و عملی داشته و مطاله طولانی مدت سلول های پیوند شده را میسر می سازد.
۵- از این مدل می توان جهت آزمایش توانایی استراتژی های درمانی برای بیماریهای انسانی و به عنوان ابزاری برای بررسی پایه ای سوالات مربوط به بیولوژی سلول پایه و ایمنولوژی آن استفاده نمود.

معایب کایمرا انسان- گوسفند

۱- خطر انتقال ویروس های حیوانی به انسان

۲- در گوسفند Comiso که دوقلوزایی در آن معمول است و معمولا برای آزمایشات بررسی خونسازی انسانی مورد استفاده قرار می گیرد اشکال در این است که میزان سقط در این گوسفند بالا است (۱۰٪،۱۵٪ و حتی ۲۰٪است که در literature ذکر شده است).

۳- تهاجمی بودن دستورالعمل تزریق درون سلومی می تواند باعث آلودگی مایع آمنیوتیک از حفره سلومی شود و به دنبال آن جنین در تماس مستقیمی با عناصر معدنی با غلظت بالا قرار می گیرد که برای جنین مضر است. در نتیجه تزریق درون سلومی باید در ابتدای آبستنی انجام شود و این وابسته به درجه بالای پیوند در بافت های خونساز است. روش درون سلومی باعث می شود در مدت طولانی تری بتوان فالواپ گوسفندان را انجام داد.

راهکارهای افزایش پیوند و تمایز سلول های دونور انسانی در پیوند زنوگرافت انسان- گوسفند

ریز محیط جنین گوسفند ممکن است که کاملا برای تکامل سلول پایه خونساز در رحم مناسب نباشد. چون علیرغم وجود تعداد قابل توجهی از سلول های پروژنیتور/ سلول پایه دهنده در مغز استخوان گیرنده به دنبال پیوند درون رحمی سلول پایه خونساز میزان قابل سلول های مشتق شده از دونور یا محصولات این سلول ها تا اواخر آبستنی و نزدیک تولد در حد کم بوده و یا اصلا قابل شناسایی نیست.

مکانیزم های این تأخیر در تمایز و ظهور سلول های دونور در خون محیطی جنین گیرنده پیوند ناشناخته اند.

احتمال دارد که شروع خونسازی انسان در مغز استخوان وابسته به تکامل بیشتر محیط خونسازی در این مدل باشد، نتایج نشان می دهد که سلول های استرومایی قادر به ایجاد پیوند در جنین گوسفند بوده و پیوند همزمان سلول پایه خونساز و سلول های استرومایی/ مزانشیمال باعث افزایش قابل توجهی در فعالیت

خونسازی دونور در ابتدای آبستنی شده و همچنین باعث افزایش بیشتر سلول های انسانی در مغز استخوان بعد از پیوند می شود.

در این روش به طور همزمان سلول های استرومایی stro-1+ به همراه سلول های CD34+HLA-DR یا CD34+Lin-Thy+ (این دو فنوتیپ توانایی یکسانی را برای پیوند و تمایز در مدل انسان- گوسفند دارند) به روش داخل صفاقی در روز ۵۶-۶۰ بارداری به جنین های گوسفند تزریق می شود. دو گروه کنترل در نظر گرفته شد: جنین هایی که فقط برای آنها به عنوان کنترل فقط سلول های استرومایی stro-1+ و برای گروه کنترل دیگر فقط سلول پایه خونساز با مشخصات فوق تزریق می گردد. نتایج به دست آمده نشان می دهد زمانی که فقط تزریق پروژنیتورهای استرومایی انجام می شود این سلول ها به طور فعال در ریز محیط گوسفند باقی می مانند و علاوه بر این که در مغز استخوان جنین جایگزین می شوند در بافت های دیگری مثل تیموس، کبد، طحال قابل شناسایی هستند. همچنین در جنین هایی که فقط برای آنها تزریق سلول پایه خونساز با مشخصات گفته شده انجام شد همین نتیجه را در برداشت. اما در جنین هایی که برای آنها پیوند همزمان سلول استرومایی و سلول پایه خونساز را داشتند در خون محیطی و مغز استخوان آنها ۹،۶،۳ هفته بعد از پیوند سلول های رده لنفوئیدی با شناسایی مارکرهای ویژه این رده مثل CD7 و سلول های رده اریتروئیدی با شناسایی مارکر گلیکوفورین A دیده می شود.

۶ هفته بعد از انجام این پیوندها اختلاف قابل توجهی بین دو گروه جنین هایی که سلول پایه خونساز را با یا بدون سلول استرومایی دریافت کرده اند مشاهده نمی شود، ولی در هفته نهم افزایش هر سه رده اریتروئیدی، لنفوئیدی و میلوئیدی مشاهده می شود. بعد از تولد سطح سلول های انسانی در خون در این دو گروه کاهش یافته و در سطح بالاتری در گروهی که پیوند همزمان را داشته اند دیده می شود و برای مدت یکسال این سلول ها قابل شناسایی باقی می مانند. علت این کاهش ها ناشناخته اند ولی ممکن است به علت ازدیاد اجزاء خونساز گوسفند به موازات افزایش سن و اندازه آن بدون تکثیر همزمان اجزاء سلول پایه خونساز انسانی می باشد.

فواید استفاده همزمان سلول پایه خونساز انسانی و سلول استرمایی:

۱- پیوند همزمان سلول پایه خونساز با سلول استرمایی یک وسیله برای رسیدن سریع تر و سطح بالاتر سلول های دهنده در گردش خون است.

۲- پیوند همزمان این سلول ها باعث بقا پیوند طولانی مدت در مغز استخوان می شود و پیشنهاد می کند که سلول های استرومایی ابزاری مفید برای کاربردهای درمانی از جمله ورود ژنهای خارجی به سیستم خونساز می باشد.

روش های شناسایی کایمریسم:

الف- روش فلوسایتومتری برای مارکرهای سطحی ویژه سلول های انسانی

ب- آنالیز کاریوتایپی لنفوسیت های B یا پروژنیتورهای مغز استخوان

پ- ایمنوهیستوشیمی با استفاده از آنتی بادی نشاندار شده با رنگهایی مثل فلورسین

ت- FISH (Florecent In Situ Hybridization) که در این روش از پروب های pancentromeric ویژه انسانی استفاده می شود. این روش در مقایسه با آنالیز کاریوتیپی از صحت بیشتری جهت بررسی سطح بیان سلول های انسانی برخوردار است چون آنالیز کاریوتیپی فقط سلول ها را در مرحله متافاز شناسایی می کند.

ث- استفاده از روش ELISA برای بررسی محصولات انسانی به طور مثال شناسایی آلبومین انسانی در سرم گوسفندهای کایمریک

ج- روش های مولکولی مثل PCR برای شناسایی بتا-۲ میکروگلوبولین انسانی در بافت خونساز و یا ریه، عضله اسکلتی، قلب، طناب نخایی و مغز

چ- کشت سلول های پروژنیتور انسانی مثل CFU-mix, BFU-E, GM-CFU

که در این مدل برای کشت از درجه بالای اختصاصیت سایتوکاین های انسانی استفاده می شود. یک نکته جالب این است که سلول های انسانی به سایتوکاین های گوسفند پاسخ نمی دهند البته به جز اریتروپویتین که نسبت به آن پاسخ می دهند.

در محیط کشت ویژه سلول های انسانی فاکتورهای رشد مثل ligand C-kit, IL3,GM-CSF انسانی اختصاصا می تواند رشد پروژنیتورهای خونساز انسانی را تحریک نماید. از مطالعاتی که تاکنون انجام شده است یک مطالعه نشان می دهد که ۱۵ گوسفند کایمریک مورد بررسی برای بیش از ۴ سال بیان سلول های انسانی را داشتند. عرضه سلولی پایین است مگر زمانی که سایتوکاین های

انسانی از جمله SCF rHu, GM-CSF تزریق شوند که نتیجه آن افـزایش گـذرای بیـان سلول های انسانی در مغز استخوان و خون محیطی است.

Refrence:

1. Moore MAS, Owen JJT. Stem cell migration in developing myeloid and lymphoid systems. Lancet, 1967;1:658.

2. Kumaravelu P, Hook L, Moorison AM,et al. Qantitive developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cell/long term repopulation untis (HSC/Rus): role of the aorta-gond-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonization of the mouse embryonic liver. Development 2002; 129: 4891-4899.

3. Cumano A, Goldin I, Pluripotent hematopoietic stem cell development during embryogenesis. Curr Opin Immunol, 2001; 13: 166-171.

4. Dzierzak EA, Medvinsky AL. Mouse embryonic hematopoiesis. Trends in Cell Biol, 1995; 11: 359-366.

5. Beamer WG, Shultz KL, Tennent BJ, Shultz LD. 1993. Granulosa cell tumorigenesis in genetically.

6. hypogonadal-immunodeficient mice grafted with ovaries from tumor-susceptible donors. Cancer Res53: 3741-3746.

7. Blunt T, Finnie NJ, Taccioli GE, Smith GC, Demengeot J, Gottlieb TM,Mizuta R, Varghese AJ. Alt FW, jeggo PA, Jackson SP. 1995. Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation. Cell 80:813-823.

8. Bosma M, Schuler W, Bosma G. 1988. The scid mouse mutant. Curr Top Microbiol Immunol 137:197-202.

9. Custer RP, Bosma GC, Bosma MJ. 1985. Severe combined immunodeficiency (SCID) in the mouse. Pathology, reconstitution, neoplasms. Am J Pathol 120: 464-477.

10. Prochazka M, Gaskins HR, Shultz LD, Leiter EH. 1992. The nonobese diabetic scid mouse: model for spontaneous thymomagenesis associated with immunodeficiency. Proc Natl Acad Sci U S A 89:3290.

11. Esmail D.Zanjani, Graca Almeda-porada, Alan W.Flake: Retettion and Multilineage Expression of Hemaopoietic Stem Cells in Human-Sheep Chimera.
12. Tippi C Mackenzie and Alan W.flake. Human mesenchymal stem cells persist, demonstrate site-specific multipotential differentation, and are present in sites of wound heeling and tissue regeneration after transplantation into fetal sheep. BLOOD Cells, molecules, and diseases (2001); 27(3) May/June: 601-604.