بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم پایه

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی جانوری

تأثیر داروی دپرنیل بر تمایز سلول های بنیادی به سلول های عصبی در شرایط آزمایشگاهی

استاد راهنما:
دکتر فریبا اسماعیلی

اساتید مشاور:
دکتر فریباهوشمند

پژوهشگر:
شبنم بخشعلی زاده

دی ماه ۱۳۹۰

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه شهرکرد است.

تقدیم به پدر و مادر عزیز

آنان که وجودم برایشان همه رنج بود و وجودشان برایم همه مهر.
توانشان رفت تا به توانایی برسم و مویشان سپید گشت تا رویم سپید بماند.
آنان که فروغ نگاهشان، گرمی کلامشان و روشنی سیمایشان سرمایه های جاودانه زندگی من است.
آنان که راستی قامتم در شکستی قامتشان تجلی یافت.
در برابر وجود گرامیشان زانوی ادب بر زمین می نهم و با دلی مملو از عشق، محبت و خضوع بر دستشان بوسه می زنم.

همچنین با تشکر از خواهران عزیز و مهربانم و داماد گرامی.

با تشکر و قدردانی از:

بزرگوارانی که در تمامی مراحل تحصیل و تحقیق یاور و پشتیبانم بوده اند.

- استاد بزرگوارم سرکار خانم دکتر فر یبا اسماعیلی که تلاش ها و راهنمایی های دقیق و بی دریغ ایشان یاری گری مطمئن در انجام این رساله بود.
- استاد ارجمند سرکار خانم دکتر فر یبا هوشمند که با ارائه رهنمودهای بنیادین سهم بسزایی در به ثمر رسیدن این رساله داشتند.
- جناب آقایی دکتر مجید شریفی تهرانی مدیر محترم گروه زیست شناسی و سایر اساتید محترم گروه زیست شناسی دانشگاه شهرکرد
- اساتید و مسئولین محترم دانشکاه علوم پزشکی شهرکرد به ویژه جناب آقای دکتر مرتضی هاشم زاده چالشتری رئیس مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و جناب آقای دکتر هدایت الله شیرزاد
- دوستان خوب و مهربانم خانم دنیز کوشاور، خانم فرشته هاشمی زاده، خانم نجمه انصاری، خانم سعیده عشوری، خانم مژده خسرویان، خانم زهرا عبدالعلی زاده، آقای حسین یزدی خواستی، آقای مجتبی ساعدی، خانم اکرم منصوری و خانم مرضیه ابراهیمی

چکیده:

سلول های P19 دودمانی از سلول های کارسینومای جنینی چند استعدادی هستند که قادرند به طور مداوم در محیط کشت حاوی سرم رشد نموده و برای تمایز به هر دو دودمان مزودرمی و اکتودرمی القا شوند. تمایز این سلول ها می تواند به وسیله داروهای غیرسمی کنترل شود. در صورت تیمار سلول های P19 با دپرنیل، این سلول ها به انواع سلولی مشابه با سلول های مشتق شده از نورواکتودرم تمایز می یابند. اثر ضد پارکینسونی دپرنیل توسط محققان مختلف گزارش شده است. از طرف دیگر، تمایل روز افزونی در کاربرد بالقوه درمان با سلول بنیادی در بیماری پارکینسون وجود دارد. از آنجایی که بسیاری از آسیب های مغزی به علت توانایی احیایی محدود شده بافت عصبی بالغ مقاوم به سیستم خودترمیمی هستند، سلول های بنیادی ابزاری مناسب برای غلبه بر این مشکل هستند. به این علت که سلول های بنیادی می توانند تعداد نامحدودی سلول جهت استفاده در سلول درمانی تولید کنند. یکی از سیستم های جنینی قدیمی برای استفاده از این روش، جنین جوجه است. گزارشات اخیر نشان داده است بسیاری از انواع سلول های بنیادی می توانند به جنین جوجه وارد شده و به انواع سلول های مختلف تمایز پیدا کنند، به طوری که به سلول های جوجه میزبان ملحق شوند. در این بررسی، دپرنیل برای القای تمایز عصبی در سلول های P19 پر توان ترانسفکت شده با GFP استفاده شده است. در این پژوهش سلول ها با استفاده از محیط کشت α-MEM حاوی ۱۵ درصد سرم گاوی جنینی (FBS) کشت داده شدند. دوز القایی مناسب با استفاده از غلظت های مختلف دپرنیل ($۱۰^{-۱۱}$- $۱۰^{-۶}$ مولار) بدست آمد. پاسخ مناسب در غلظت $۱۰^{-۸}$ مولار بود که برای مطالعات بعدی استفاده شده است. روش های مورفولوژیکی و ایمینوفلورسنس برای ارزیابی تمایز سلول های P19، کرزیل ویوله برای بررسی مورفولوژیکی، آنتی بادی های ضد سیناپتوفیزین و ضد بتا- توبولین III برای تشخیص فنوتیپ عصبی سلول ها استفاده شد. سپس ما نورون ها ی مشتق شده از سلول های P19 را به درون مغز میانی جنین جوجه ۶۸-۷۲ ساعته پیوند زدیم. ما از آنتی بادی های ضد سیناپتوفیزین و ضد بتا- توبولین III و ضد GFP با استفاده از روش ایمینوفلورسنس دوبل در تهیه شده از جنین جوجه جهت تشخیص و ردیابی مهاجرت نورون های GFP مثبت مشتق شده از سلول های P19 استفاده کردیم. نتایج نشان داد دپرنیل می تواند تمایز عصبی وابسته به دوز را در سلولهای P19 ترانسفکت شده با GFP القا کند. همچنین نورون های GFP مثبت مشتق شده از سلول های P19 می توانند در سیستم عصبی جنین جوجه مهاجرت کرده و با سلولهای بافت میزبان تشکیل سیناپس دهند.

کلید واژه ها: سلول های بنیادی کارسینومای جنینی، تمایز عصبی، دپرنیل، پیوند سلولی، جنین جوجه

فهرست مطالب

عنوان شماره صفحه

فصل اول: مقدمه

۱-۱. تعریف سلول های بنیادی ۷

۱-۲. ویژگی های سلول های بنیادی ۷

۱-۳. انواع سلول های بنیادی ۷

۱-۳-۱. سلول های بنیادی بالغ یا سلول های بنیادی سوماتیک ۸

۱-۳-۲. سلول های بنیادی بند ناف ۸

۱-۳-۳. سلول های بنیادی جنینی ۹

۱-۳-۴. سلول های بنیادی زایای جنینی (EG cells) ۹

۱-۳-۵. سلول های بنیادی رویانی (ES cells) ۹

۱-۳-۶ سلول های کارسینومای جنینی (EC cells) ۱۰

۱-۳-۶-۱. دودمان سلولی P19 ۱۱

۱-۴. تمایز سلول های بنیادی ۱۱

۱-۴-۱. تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های عصبی ۱۲

۱-۴-۲. استفاده از رتینوئیک اسید به منظور القای عصبی در سلول های بنیادی ۱۴

۱-۴-۳. تمایز سلول های p19 به سلول های عصبی ۱۵

۱-۵. شناسایی سلول های عصبی حاصل از تمایز ۱۷

۱-۵-۱. نشانگرهای سلول های عصبی حاصل از تمایز ۱۷

۱-۶. اهمیت و کاربرد سلول های عصبی حاصل از تمایز ۱۸

۱-۷. دپرنیل ۲۱

۱-۷-۱. مکانیسم عمل دپرنیل ۲۲

۱-۷-۲. استفاده از دپرنیل به منظور القای عصبی در سلول های بنیادی ۲۴

۱-۸. انتقال ژن به سلول یوکاریوتی (ترانسفکشن) و انواع روش های آن ۲۴

۱-۸-۱. ترانسفکشن در سلول های بنیادی ۲۷

۱-۹. پروتئین فلورسنت سبز ((green fluorescent protein (GFP)) ۲۸

۱-۱۰. جنین جوجه و مراحل تکوین آن ۲۹

۱-۱۰-۱. استفاده از جنین جوجه در تحقیقات ۳۰

۱-۱۰-۲. پیوند سلول به سیستم عصبی جنین جوجه ۳۱

فصل دوم: مواد و روش ها

۲-۱. کشت سلول های p19 ..... ۳۴
۲-۱-۲. پاساژ سلول های p19 ..... ۳۵
۲-۱-۳. انجماد سلول های p19 ..... ۳۷
۲-۱-۴. ذوب کردن سلول های P19 ..... ۳۷
۲-۲. تعیین بقای سلولی (cell viability) در سلول های P19 تیمار شده با داروی دپرنیل ۳۸
۲-۳. تعیین دوز مناسب دپرنیل برای القای فنوتیپ عصبی در سلول های P19 ..... ۴۰
۲-۳-۱. طرز تهیه میکرو پلیت های ۲۴ خانه ای ژلاتینه ۴۰
۲-۳-۲. رنگ آمیزی سلول های عصبی با استفاده از کرزیل ویوله (Cresyl Violet staining) ۴۱
۲-۳-۳. آنالیز آماری ۴۲
۲-۴. تولید اجسام شبه جنینی یا embryoid body (EB) ۴۳
۲-۵. القای فنوتیپ عصبی در سلول ها ی P19 با استفاده از غلظت مناسب دپرنیل ۴۳
۲-۵-۱. ایمنوفلورسنس ۴۴
۲-۶. انتقال ژن به سلول های بنیادی P19 ..... ۴۶
۲-۶-۱. مشخصات پلاسمید pML8 ..... ۴۶
۲-۶-۲. تکثیر پلاسمید حاوی ژن GFP ۴۶
۲-۶-۳. تهیه باکتریهای مستعد برای ترانس فورماسیون ۴۷
۲-۶-۴. ترانس فورماسیون ۴۸
۲-۶-۵. استخراج پلاسمید درمقیاس کم (small scale extraction) ۴۹
۲-۶-۶. روش کار استخراج پلاسمید با کیت فرمنتاز ۴۹
۲-۶-۷. بررسیDNA استخراج شده در ژل آگاروز ۵۰
۲-۶-۸. استخراج پلاسمید درمقیاس انبوه (Large scale extraction) ۵۲
۲-۶-۹. بررسیDNA استخراج شده درژل آگاروز ۵۴
۲-۶-۱۰. تعیین غلظت نمونه ۵۴
۲-۶-۱۱. انتقال پلاسمید حاوی ژن GFP به سلول های P19 ..... ۵۵
۲-۷. پیوند سلول به جنین جوجه به صورت درجا یا in vivo ۵۶
۲-۷-۱. آماده کرده جنین جوجه و باز کردن پنجره در پوسته آهکی آن ۵۷
۲-۷-۲. پیوند سلول به سیستم عصبی جنین جوجه ۵۷
۲-۷-۳. بررسی سلول های تزریق شده به روش ایمنوفلورسانس ۵۸

فصل سوم: نتایج .....

۳-۱. بررسی میزان بقای سلولی (cell viability) در سلول های P19 پس از قرار گرفتن سلول ها در معرض دپرنیل ۶۳
۳-۲. تعیین دوز مناسب دپرنیل جهت القای فنوتیپ عصبی ۶۵
۳-۳. القای فنوتیپ عصبی در سلول های P19 با استفاده از غلظت مناسب دپرنیل ۶۷
۳-۴. تأیید هویت سلول های عصبی به روش ایمنوفلورسانس ۶۹
۳-۵. بررسی کیفی DNA پلاسمید استخراج شده در ژل آگاروز ۷۱
۳-۶. تعیین غلظت نمونه DNA ۷۱
۳-۷. انتقال ژن به سلول های بنیادی P19 (gene transfection) ۷۱
۳-۸. پیوند سلول های P19 ترانسفکت شده عصبی به جنین جوجه ۷۲
۳-۹. بررسی بیان نشانگرهای عصبی در سلول های پیوند زده شده به جنین جوجه ۷۵

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

۴-۱. تعیین دوز مناسب دارو دپرنیل جهت القای فنوتیپ عصبی در سلول های P19 ۸۰
۴-۲. تمایز سلول های ترانسفکت شده P19 به سلول های عصبی ۸۲
۴-۳. پیوند سلول ترانسفکت عصبی به سیستم عصبی جنین جوجه ۸۶

منابع

فهرست شکل ها

عنوان شماره صفحه

شکل ۲-۱. سلول های P19 که به صورت تک لایه ای کشت داده شدند..... ۳۵
شکل ۲-۲. طرح شماتیک از پلاسمید PML-8 که حاوی ژن GFP و ژن مقاوم به پیورومایسین است..... ۴۷
شکل ۳-۱. فتومیکروگراف سلول های P19 تمایز نیافته به صورت اجسام شبه جنینی که جهت تمایز عصبی از غلظت $۱۰^{-۸}$ مولار دپرنیل به عنوان القا کننده استفاده شده است را نشان می دهند..... ۶۸
شکل ۳-۲. فتومیکروگراف سلول های P19 تمایز یافته به سلول های شبه عصبی که از کرزیل ویوله برای رنگ آمیزی نورون های تمایز یافته استفاده شده است را نشان می دهند..... ۶۹
شکل ۳-۳. میکروگراف فلورسنس بیان نشانگرهای عصبی را نشان می دهد..... ۷۰
شکل ۳-۴. الکتروفورز پلاسمید PML-8 در ژل آگاروز یک درصد..... ۷۱
شکل ۳-۵. سلول های P19 ترانسفکت شده با پلاسمید حاوی ژن GFP..... ۷۲
شکل ۳-۶. جنین جوجه در مرحله نوزده همبرگر- همیلتون که پس از باز کردن پنجره در پوسته تخم مرغ ۷۳
شکل ۳-۷. تصویر میکروسکوپ فلورسنس جنین جوجه در مرحله نوزده در حین پیوند سلول های P19 ترانسفکت شده عصبی به مغز میانی جنین جوجه..... ۷۴
شکل ۳-۸. تصویر میکروسکوپ فلورسنس جنین جوجه در پس از پیوند سلول های P19 ترانسفکت شده عصبی به مغز میانی جنین جوجه (سلول های مهاجرت کرده به وزیکول بینایی)..... ۷۴
شکل ۳-۹. میکروسکوپ فلورسنس جنین جوجه در پس از پیوند سلول های P19 ترانسفکت شده عصبی به مغز میانی جنین جوجه (سلول های مهاجرت کرده به لوله عصبی)..... ۷۵
شکل ۳-۱۰. جنین جوجه فیکس شده در محلول فرمالین..... ۷۶
شکل ۳-۱۱. ایمنوفلورسنس دوبل برای پروتئین های سیناپتوفیزین و GFP در مقاطع بافتی تهیه شده از جنین جوجه..... ۷۷
شکل ۳-۱۲. ایمنوفلورسنس دوبل برای پروتئین های بتا توبولین III و GFP در مقاطع بافتی تهیه شده از جنین جوجه..... ۷۸

فهرست جداول

عنوان شماره صفحه

جدول ۳-۱. تأثیر غلظت های مختلف دپرنیل بر میزان بقای سلول..... ۶۴
جدول ۳-۲. تأثیر غلظت های مختلف دپرنیل بر القای فنوتیپ شبه عصبی در سلول های P19..... ۶۶

فصل اول

مقدمه

۱- مقدمه

۱-۱ تعریف سلول های بنیادی

سلول های بنیادی سلول هایی پرتوان[۱] و نامیرا[۲] هستند که می توانند به دودمانی از انواع سلول های تخصص یافته ی بافت های جنینی و بالغ تمایز پیدا کنند. این سلول ها به علت ویژگی های بیولوژیکی و اهمیت بالینی بالقوه بسیار مورد توجه قرار گرفته و ابزار قدرتمند و مفیدی برای مطالعه مراحل تکوین در محیط آزمایشگاه به وجود آورده اند. سلول های بنیادی کاربردهای درمانی گسترده ای داشته و منبع نامحدودی از سلول برای استفاده در پیوند و ترمیم بافت فراهم می کنند (D'Amour and Gage, 2000).

۱- ۲ ویژگی های سلول های بنیادی

سلول های بنیادی دارای دو ویژگی اساسی خودتجدیدی[۳] و توانایی تمایز[۴] هستند. این سلول ها قادرند به انواع مختلفی از سلول های بافت های عصبی، قلبی، کلیوی، ریوی و پانکراسی و غیره تمایز پیدا کنند (Hall and Watt, 1989). از ویژگی های دیگر سلول های بنیادی این است که آن ها در معرض تقسیمات سلولی نامتقارن قرار می گیرند (Hall and Watt, 1989). در طی این تقسیم، دو سلول دختر ایجاد می شود که یکی از این سلول ها تمایز یافته و سلول دیگر به صورت سلول بنیادی باقی می ماند (Potten and Loeffler, 1990).

۱-۳ انواع سلول های بنیادی

انواع سلول های تمایز نیافته را می توان به ترتیب زیر دسته بندی نمود:

- سلول های بنیادی بالغ[۵]
- سلول های بنیادی جنینی[۶]

---

[1] Totipotent
[2] Immortal
[3] Self-renewal
[4] Differentiation
[5] Adult stem cells

- سلول های بنیادی بند ناف[۷]
- سلول های بنیادی زایای جنینی[۸]
- سلول های کارسینومای جنینی[۹]
- سلول های بنیادی رویانی[۱۰]

۱-۳-۱ سلول های بنیادی بالغ یا سلول های بنیادی سوماتیک

سلول های بنیادی بالغ از بافت ها و اندام های بالغ از جمله مغز استخوان، بافت عصبی، بافت چربی ، پوست و کبد استخراج شده اند که دارای خاصیت خودترمیمی در مواقع آسیب هستند (Morrison *et al.*, 1997). این سلول ها علاوه بر ویژگی خود تجدیدی دارای قدرت تمایز نیز هستند (Pan *et al.*, 2002). پیش از این تصور می شد که این سلول ها تک استعدادی[۱۱] و یا چند استعدادی[۱۲] هستند؛ در حالی که تحقیقات نشان داده است که سلول های مذکور نه تنها پراستعدادی[۱۳] هستند (Henningson *et al.*, 2003) بلکه قابلیت گذر از مرزهای تمایز را دارند (Preston *et al.*, 2003) ؛ بدین معنی که می توانند به انواع سلول های دیگر غیر از سلول های بافت مربوط به خودشان تمایز پیدا کنند. به عنوان مثال سلول های بنیادی مغز استخوان قادرند به سلول های عضله اسکلتی، میکروگلیا و سلول های کبدی تمایز یابند (Henningson *et al.*, 2003). همچنین سلول های بنیادی مزانشیمی می توانند به انواع مختلفی از دودمان سلولی مزانشیمی تمایز پیدا کنند که شامل فیبروبلاست ها، سلولهای بافتهای ماهیچه، استخوان، تاندون و چربی هستند (Pettis *et al.*, 1990) و (Mizuno and Glowacki, 1996).

پیش از این تصور می شد که سیستم عصبی مرکزی بالغ قادر به انجام خود تجدیدی یا ترمیم نیست. کشف سلول های بنیادی در مغز بالغ این تصور را منسوخ کرد (Reynolds and Weiss, 1992). این سلول ها قادرند به دودمانی از سلول های عصبی و گلیا تمایز پیدا کنند (Watt, 2000). پیش سازهای عصبی بالغ در ابتدا از ناحیه زیر بطنی مغز قدامی جدا شده اند. آن ها همچنین می توانند از نواحی هیپوکمپ، طناب نخاعی، جسم مخطط، سپتوم، کورتکس و عصب بینایی جدا شوند (Reynolds and Weiss, 1992) و (Gage, 2000) و (Weissman, 1994) و (Palmer *et al.*, 1999). نواحی زیر بطنی مغز قدامی و هیپوکمپ غنی ترین منابع ذخیره سلول های پیش ساز عصبی بالغ هستند (Gage, 2000).

۱-۳-۲ سلول های بنیادی بند ناف

---

[6] Fetal stem cells
[7] Cord blood stem cells
[8] Embryonic germ cells
[9] Embryonic carcinoma cells
[10] Embryonic stem cells
[11] Monopotent
[12] Multipotent
[13] Totipotent

سلول های بنیادی بند ناف از بند ناف جنینی استخراج شده اند. این سلول ها، سلول های پیش ساز خونی بوده و نخستین سلول هایی هستند که در جنین یافت شدند. آن ها می توانند به انواع مختلفی از سلول های خونی تمایز پیدا کنند (Rogers and Casper, 2004). مشابه سلول های بنیادی مغز استخوان، سلول های بنیادی بند ناف می توانند در درمان بسیاری از بیماری ها و سرطان های مربوط به خون مورد استفاده قرار گیرند(Evans *et al.*, 1999).

۱-۳-۳ سلول های بنیادی جنینی

سلول های بنیادی جنینی سلول هایی پراستعدادی هستند که از بافت ها و اندام های در حال تکوین جنین سقط شده به دست می آیند. سلول های بنیادی ستیغ عصبی[۱۴]، سلول های بنیادی پیش ساز خونی جنینی[۱۵]و پیش سازهای جزایر پانکراسی از جنین سقط شده جدا شده اند(Beattie *et al.*, 1997). سلول های بنیادی عصبی جنینی یافت شده در مغز جنین می توانند به نورون ها و سلول های گلیا تمایز پیدا کنند (Brustle et al., 1998) و (Villa et al., 2000). از سلول های پیش ساز موجود در عضله قلبی جنین در ترمیم عضله قلبی بالغ و از سلول های عصبی جنین برای ترمیم بافت عصبی و درمان اختلالات عصبی می توان استفاده نمود (Conti *et al.*, 2003). همچنین سلول های بنیادی خون ساز جنینی قابلیت تمایز به سلول های بنیادی عصبی و سپس تمایز به آستروسیت ها را دارند (Hao et al., 2003)

۱-۳-۴ سلول های بنیادی زایای جنینی (EG cells)

سلول های بنیادی زایای جنینی، سلول های تمایز نیافته ای هستند که از سلول های زایای بدوی[۱۶] یا PGC های موجود در گناد جنین به دست می آیند (Shamblott *et al.*, 1998). این سلول ها پراستعدادی بوده و ویژگی های مشابه با سلول های بنیادی رویانی دارند، از جمله این که فعالیت آلکالین فسفاتازی بالایی را نشان می دهند (Shamblott *et al.*, 1998). از دیگر ویژگی های مهم این سلول ها می توان توانایی رشد و تکثیر آن ها به صورت کلنی های چند سلولی، دارا بودن کاریوتیپ ثابت و طبیعی و همچنین قدرت تمایز آن ها به سلول های هر سه لایه جنینی را نام برد (Shamblott *et al.*, 1998).

۱-۳-۵ سلول های بنیادی رویانی (ES cells)

سلول های بنیادی رویانی دودمان سلولی پراستعدادی هستند که به طور معمول از جنین پیش لانه گزینی در مرحله بلاستوسیست به دست می آیند (Martin, 1981) و (Evans and Kaufman, 1981). برخی از محققین این سلول ها را به عنوان سلول های چنداستعدادی (Yang and Petitte, 1994) و یا حتی تمام استعدادی (Thomson *et al.*, 1998) و (Brustle, 1999) نیز در نظر گرفته اند. توده سلولی داخلی بلاستوسیست پنج تا شش روزه انسانی منبع سلول های رویانی چند استعدادی در انسان هستند. تاکنون

[14] Neural crest stem cells
[15] Hematopoietic stem cells
[16] Primordial germ cells

محققین موفق شده اند سلول های ES را از توده سلولی داخلی بلاستوسیست بسیاری از گونه ها جداسازی نموده و چندین دودمان سلولی به دست آورند. برای این کار بهتر است از بلاستوسیستی استفاده کرد که در مرحله تأخیری و در حول و حوش لانه گزینی باشد توانایی تکثیر سلول های ES پراستعدادی، فرصت مناسبی را برای بررسی تنظیم و عملکرد ژنی در طی خود تجدیدی، تعهد سلولی و تمایز فراهم کرده است (Evans and Hunter, 2002).

۱-۳-۶ سلول های کارسینومای جنینی (EC cells)

هنگامی که جنین یک تا هفت و نیم روزه موش به ناحیه ای در خارج از رحم میزبان پیوند زده شود توموری ایجاد می شود به نام تراتوکارسینوما، سلول های تمایز نیافته جدا شده از این تومور را سلول های کارسینومای جنینی گویند (Martin, 1981) و (Martin *et al.*, 1977).

سه نوع سلول اخیر علیرغم شباهت های بسیار، حتی در یک گونه هم تا حدودی از نظر مورفولوژی، در بیان نشانگرهای سطحی و نیازهای غذایی در محیط کشت با یکدیگر متفاوتند (D'Amour and Gage, 2000). از نظر کروموزومی سلول های ES و EG دیپلوئید و EC آنوپلوئید هستند (D'Amour and Gage, 2000) و (Evans and Kaufman, 1981). سلول های ES و EG در چندین ویژگی مورفولوژیکی از جمله میزان زیاد آلکالین فسفاتاز درون سلولی، حضور گلیکولیپیدها (Shamblott *et al.*, 1998) و گلیکولیپیدهای ویژه سطح سلول مشترک هستند (Shamblott *et al.*, 1998).

دودمان سلولی EC ایجاد شده در محیط کشت اولین بار در سال ۱۹۶۷ توسط فینچ[17] و افروزی[18] و در سال ۱۹۷۰ توسط کان[19] و افروزی گزارش شد. به دنبال آن چندین گروه دودمان سلولی EC موش را در سراسر دهه ۱۹۷۰ تولید کردند (Bernstine *et al.*, 1973). بسیاری از این دودمان های سلولی به صورت پراستعدادی باقی می مانند و می توانند تحت شرایط محیط کشتی معین به عنوان سلول های EC تمایز نیافته نگه داری شوند. این سلول ها توانایی تشکیل تراتوکارسینوما را بعد از پیوند مجدد به میزبان موش حفظ می کنند (Evans, 1972). بسیاری از سلول های پراستعدادی در محیط کشت مناسب تمایز می یابند. محیط کشت مناسب برای دودمان های سلولی مختلف، متفاوت است. بعضی از دودمان های سلولی EC اگر در محیط کشت ساب کانفلوئنت[20] در حال تکثیر نگه داشته شوند به صورت نامتمایز باقی می مانند؛ اما اگر برای چند روز در محیط کشت کانفلوئنت[21] نگه داری شوند، به حالت حداکثر تراکم خود رسیده و به انواع مختلفی از سلول ها، مثل سلول های عصبی و ماهیچه ای، تمایز پیدا می کنند (Nicolas *et al.*, 1976). سایر دودمان های EC پراستعدادی به محیط کشت حاوی لایه تغذیه دهنده از فیبروبلاست موش ترانسفورم شده برای جلوگیری از تمایز نیاز دارند. در این موارد تمایز می تواند با جدا کردن سلول های EC از سلول

[17] Finch
[18] Ephrussi
[19] kan
[20] Subconfluent
[21] Confluent

های دهنده القا شود (Evans and Kaufman, 1981) و (Martin and Evans, 1974). طبیعت تمایز خود به خودی غیر قابل کنترل سلول های EC، مطالعات در مورد این سلول ها را مشکل کرده است.

۱-۳-۶-۱ دودمان سلولی P19

همانند سایر سلول های بنیادی کارسینومای جنینی و سلول های بنیادی جنینی، سلول های P19 سلول هایی پر استعدادی هستند و مانند سلول های جنینی طبیعی با استفاده از مکانیسم های یکسان تمایز می یابند. وقتی سلول های P19 به جنین های نرمال تزریق شوند، سلول های مشتق شده از P19 بافت های طبیعی مختلفی را ایجاد می کنند (McBurney and Rogers, 1982) و (Rossant and McBurney, 1982). تعدادی از ویژگی های سلول های P19 آن ها را برای مطالعات تکوینی مناسب ساخته است. این سلول ها به آسانی رشد کرده و فنوتیپ تمایز نیافته خود را حفظ می کنند، در عین حال آن ها می توانند برای تمایز از طریق دستکاری های شرایط محیط کشت القا شوند. در نهایت ترکیب ژنتیکی این سلول ها می تواند به آسانی از طریق انتخاب کلون های حامل ژن های ترانسفکت شده به ژنوم آنها دست ورزی شده و به این صورت جهت بررسی مطالعات مختلف مورد استفاده قرار گیرند (McBurney, 1993).

تراتوکارسینوماها می توانند در بعضی نژادهای موش از جنین های اولیه پیوند زده شده از رحم به جایگاه های اکتوپیک ایجاد شوند (Stevens, 1970). دودمان P19 از تراتوکارسینومای تشکیل شده به دنبال پیوند یک جنین هفت و نیم روزه به بیضه مشتق شده است (McBurney and Rogers, 1982). سلول های P19 تمایز نیافته که شکل چند ضلعی دارد، تعدادی از آنتی ژن های سطحی سلول جنینی۱[۲۲] را بیان می کنند.بسیاری از این آنتی ژن ها در سلول های جنینی نورواپیتلیال نیز بیان می شوند (McBurney *et al.*, 1988) و (Levine and Flynn, 1986). همچنین فیلامنت حدواسط ویمنتین و پروتئین نوروفیلامنت حدواسط نستین نیز در سلول های P19 تمایز نیافته وجود دارند (Jones-Villeneuve *et al.*, 1983) و (Jones-Villeneuve *et al.*, 1982).

سلول های P19 کاریوتیپ مذکر طبیعی دارند. این ترکیب کروموزومی باعث می شود سلول ها رشد تصاعدی خود را حفظ کنند (McBurney and Rogers, 1982). دودمان های سلولی کارسینومای جنینی در صورتی که با تراکم بالا کشت داده شوند (Nicolas *et al.*, 1976) و (McBurney, 1976) یا بصورت توده در آیند (Martin and Evans, 1975)، تمایز پیدا می کنند. تمایز سلول های P19 می تواند تحت شرایط تیمار با غلظت های متفاوت داروئی القا شود. از جمله این داروهای مؤثر می توان رتینوئیک اسید و دی متیل سولفواکسید را نام برد که در دوزهای مؤثر برای سلول های P19 سمی نبوده و تمایز را با اهداف سلولی مختلف القا می کنند (McBurney and Rogers, 1982) و (Jones-Villeneuve *et al.*, 1982).

۱-۴ تمایز سلول های بنیادی

[22] Stage-specific embryonic antigen 1

در زیست شناسی تکوینی تمایز سلولی فرایندی است که در آن سلول کمتر تخصص یافته یا سلول تمایز نیافته بنیادی به سلول بیشتر تخصص یافته تبدیل می شود. تمایز به دفعات متعددی در طول تکوین موجود پرسلولی رخ می دهد؛ مثال آن تغییرات موجود از زیگوت ساده به سیستم پیچیده ای از انواع بافت ها و سلول ها است(Stocum, 2004) و (Casimir *et al.*, 1988). تمایز فرآیند رایج در افراد بالغ است به گونه ای که سلول های بنیادی سوماتیک در طول ترمیم بافتی و تغییر و تبدیل طبیعی سلول، تقسیم شده و سلول های دختر کاملاً تمایز یافته را ایجاد می کند (Tsonis and Del Rio-Tsonis, 2004).

همان طور که قبلا نیز گفته شد سلول های بنیادی، سلول هایی پرتوان و نامیرا هستند که می توانند به دودمانی از انواع سلول های تخصص یافته ی بافت های جنینی و بالغ تمایز پیدا کنند (Morrison *et al.*, 1997). در سال ۱۹۷۸ مطالعاتی توسط استریکلند[۲۳] و همکارانش صورت گرفته است که نشان می دهد یکی از دودمان های سلولی EC یعنی F9، بعد از قرار گرفتن در معرض رتینوئیک اسید و آدنوزین مونوفسفات حلقوی به سلول های شبه آندودرمی تمایز می یابند (Strickland *et al.*, 1980). رتینوئیک اسید و سایر عوامل به ویژه دی متیل سولفواکسید و هگزامتیلن بیس استامید نیز می توانند تمایز تعدادی از دودمان های سلولی EC موش را القا کنند (McBurney *et al.*, 1982) و (Jacob, 1978). در یکی از دودمان های سلولی EC یعنی سلول های P19، رتینوئیک اسید تمایز نورواکتودرمی و دی متیل سولفواکسید تمایز مزودرمی و ایجاد ماهیچه قلبی را القا می کنند (Jones-Villeneuve *et al.*, 1982).

۱-۴-۱ تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های عصبی

تمایز عصبی، رویداد جنینی اولیه است که بلافاصله بعد از تخصصی شدن لایه های جنینی آغاز می شود. مراحل تکوین سیستم عصبی مرکزی در همه مهره‌داران از الگوی مشترکی پیروی می‌کند (Lendahl *et al.*, 1990). در مرحله گاسترولاسیون، تحت اثر القایی مزودرم، اکتودرم رویی به نورواکتودرم یا اکتودرم عصبی تبدیل شده، صفحه عصبی به‌وجود می‌آید. اکثر سلول‌های سازنده این اکتودرم شکل اپی‌تلیوم استوانه‌ای به خود می‌گیرند. به همین دلیل اکتودرم عصبی را اپی‌تلیوم عصبی نیز می‌گویند (Okabe *et al.*, 1996). در اثر تکثیر سریع سلول‌های مذکور، صفحه عصبی دچار چین‌خوردگی شده و لوله عصبی را تشکیل می‌دهد. سلول‌های تشکیل‌دهنده این لوله پیش‌سازهایی برای انواع سلول‌های CNS هستند. این سلول‌ها پس از تمایز، قدرت تقسیم خود را از دست داده، برطبق برنامه‌ای دقیق و منظم انواع سلول‌های عصبی و گلیای موجود در سیستم عصبی مرکزی را به وجود می‌آورند (Okabe *et al.*, 1996) و (Lendahl *et al.*, 1990). محققین به منظور پی بردن به مکانیسم‌های دقیق و پیچیده تکوین سیستم عصبی مرکزی تحقیقات بی‌شماری انجام داده‌اند. در سال‌های اخیر روش‌هایی طراحی شده است که با استفاده از آن ها مراحل رشد و نمو و تکوین پیش‌سازهای چند استعدادی عصبی مورد مطالعه قرار گرفته است (Mansergh *et al.*, 2000). نتایج حاصل از این تحقیقات منجر به کشف جمعیتی از سلول‌های بنیادی عصبی چنداستعدادی در CNS جنین و افراد بالغ شده است (Mansergh *et al.*, 2000).

[23] Strickland

قبلاً تصور می شد که سیستم عصبی مرکزی قادر به خود تجدیدی یا ترمیم نیست؛ ولی کشف سلول های بنیادی در مغز افراد بالغ این تصور را منسوخ کرد (Richards *et al.*, 1992). سلول های بنیادی عصبی بالغ قادر به خود تجدیدی بوده و می توانند دودمان تمایز یافته ای از نورون ها و سلول های گلیا را ایجاد کنند (Watt, 2000). پیش ساز های عصبی بالغ از ناحیه زیر بطنی مغز قدامی، وهمچنین از هیپوکمپ، طناب نخاعی، جسم مخطط، کورتکس و عصب بینایی جدا شده اند (Reynolds and Weiss, 1992) و (Gage, 2000) و (Weiss *et al.*, 1996). سلول های بنیادی ستیغ عصبی نیز در طول تکوین از میا ن دیگر سلول های جنین مهاجرت کرده و انواع مختلفی از سلول ها را ایجاد می کنند. این سلول های چند استعدادی از نظر موفولوژیکی مجزا از سلول های بنیادی عصبی مشتق شده از مغز بوده و در شرایط آزمایشگاهی می توانند دودمان سلولی چند استعدادی را ایجاد کند (Stemple and Anderson, 1992) و (Rao and Anderson, 1997) و (Mujtaba *et al.*, 1999). سلول های بنیادی ستیغ عصبی می توانند به انواع مختلفی از سلول ها شامل نورون های سمپاتیکی آدرنرژیک و نورون های پاراسمپاتیکی کولینرژیک، سلول های شوان، غضروف، ملانوسیت ها، نورون ها و سلول های گلیا تمایز پیدا کنند (Stemple and Anderson, 1992) و (Baroffio *et al.*, 1991).

دودمان C17-2 که دودمان سلولی پیش ساز عصبی چند استعدادی و نامیرای مشتق شده از مخچه نوزاد موش است می تواند پس از پیوند در تکوین بسیاری از ساختارهای مغز شرکت نماید (Snyder *et al.*, 1997). سلول‌های C17-2 ترانسفکت شده با ژن HexA انسانی وقتی که به مدل موشی بیماری تی‌ساچ[۲۴] پیوند زده شدند به وسیله تولید ژن‌های فعال باعث بهبود بیماری شدند (Lacorazza *et al.*, 1996). استفاده از این سلول‌ها سیستم‌های قدرتمندی به وجود می‌آورد که پتانسیل زیادی در ژن درمانی و سلول درمانی و بهبود بیماری‌های عصبی دارند. ولی مشکل تومورزایی چنین سلول‌هایی در in vivo هنوز به قوت خود باقی است (Mansergh *et al.*, 2000).

کشت این سلول‌ها و یا سلول‌های نورواپی‌تلیال و بررسی آن ها در شرایط آزمایشگاهی کمک شایانی به درک مکانیسم‌های تکوین سیستم عصبی مرکزی نموده است؛ ولی با استفاده از این سلول‌ها نمی‌توان به مراحل ابتدایی تر تکوین این سیستم پی برد (Okabe *et al.*, 1996). بنابراین دستیابی به روشی که به وسیله آن بتوان سلول‌های رده اکتودرم عصبی و سپس سلول‌های تمایز یافته‌تر CNS را از سلول‌های چنداستعدادی در شرایط آزمایشگاهی تولید نمود ابزار قدرتمندی برای پی بردن به حوادث سلولی و مولکولی تمایز و تکوین CNS خواهد بود (Okabe *et al.*, 1996).

سلول‌های بنیادی رویانی موش، دودمان سلولی پراستعدادی هستند که بنا برعبارتی از نظر تکوینی، معادل سلول‌های توده داخلی بلاستوسیت هستند (Martin, 1981). مطالعات پیشین نشان داده است که این سلول‌ها قادرند در شرایط آزمایشگاهی به رده‌های مختلف سلولی تمایز یابند (Doetschman *et al.*, 1985) و (Doetschman *et al.*, 1988). سلول‌های عصبی و گلیا می توانند در این شرایط از تمایز سلول های بنیادی رویانی انسان و موش بدست آیند (Mansergh *et al.*, 2000).

[24] Tay Sach,s disease

اخیراً تعدادی دودمان سلولی تولید شده است که اغلب آن ها از پیش‌سازهای عصبی ترانسفورم شده یا سلول‌های توموری با منشأ عصبی به دست آمده‌اند. این پیش‌سازها قادرند ویژگی‌های سلول‌های عصبی را در محیط کشت تقلید نموده، مدل مناسبی برای بررسی این سلول‌ها فراهم نمایند (Bain and Gottlieb, 1998). یکی از مفیدترین مدل‌های تمایز عصبی در آزمایشگاهی تمایز سلول P19 است که نوعی دودمان سلولی کارسینومای جنینی است. این دودمان از سلول‌های توموری حاصل از پیوند جنین هفت روزه موش در زیر کپسول بیضه موش بالغ به دست آمده است (McBurney and Rogers, 1982). سلول‌های P19 دارای ژن P_{53} غیرفعال شده هستند و این دلیل ویژگی نامیرایی آنهاست(Mansergh *et al.*, 2000). این سلول‌ها مشابه سلول‌های اکتودرمی اولیه هستند (Schmidt-Kastner *et al.*, 1998) و (Schmidt-Kastner *et al.*, 1996)، همچنین دارای پتانسیل تکوینی وسیعی بوده، همچنین قادرند در تولید رده‌های سلولی سوماتیک در کایمرای موش شرکت کنند (Stewart *et al.*, 1994).

۲-۴-۱ استفاده از رتینوئیک اسید به منظور القای عصبی در سلول های بنیادی

اسید رتینوئیک یا به طور اختصار RA یکی از مشتقات ویتامین A است (Cheung et al., 2000) و (Wohl and Weiss, 1998). این ماده مورفوژنی طبیعی (Cheung et al., 2000) با فعالیت زیستی وسیع است که در همه مهره‌داران یافت می‌شود (Castro-Obregon and Covarrubias, 1996). تحقیقات نشان می‌دهد که هدف عمده RA سیستم عصبی درحال تکوین است (Rosenthal *et al.*, 1990) و (Ruberte *et al*., 1993) و (Maden and Holder, 1991). البته RA تنها محدود به بافت عصبی نیست؛ بلکه در مزودرم کرانیال نیز تولید می‌شود (Wohl and Weiss, 1998). در دوران جنینی این ماده تعیین‌کننده الگوی محوری جلویی پشتی بدن بوده (Papalopulu and Kintner, 1996) و (Conlon, 1995)، در تمایز بسیاری از سلول‌ها مانند سلول‌های پیش‌ساز عصبی و سلول‌های اپی‌تلیالی مؤثر است (Cheung and Ip, 1998).جایگاه عمل رتینوئیک اسید گروهی از رسپتورهای هسته ای رتینوئیک اسید است و RA اثر خود را بر روی سلول هدف از طریق این گیرنده های هسته‌ای اعمال می‌کند (Evans, 1988). RA نقش بسیار مهمی در تنظیم تکثیر و تمایز سلولی و مرگ برنامه ریزی شده[۲۵] سلول دارد (Ross *et al.*, 2000).

در شرایط آزمایشگاهی، رتینوئیک اسید تمایز سلول های کارسینومای جنینی و سلول های بنیادی رویانی چند استعدادی را به دودمان سلولی مختلف القا می کند. اثر القایی بستگی به غلظت رتینوئیک اسید و شرایط محیط کشت سلول دارد (Rohwedel *et al.*, 1999). مطالعات مختلف نشان داده است که برای تمایز به دودمای عصبی، بهتر است سلول های ES وEC تحت شرایط محیط کشت غیر چسبنده در معرض رتینوئیک اسید قرار گیرند تا تشکیل اجسام شبه جنینی[۲۶] دهند (Bain *et al.*, 1995) و (Fraichard *et al.*, 1995) در محیط کشت تک لایه ای حاوی RA و سرم، تمایز سلول های شبه آندودرمی اتفاق می افتد (Rochette-Egly and Chambon, 2001) و (Pachernik *et al.*, 2002). بررسی های دیگر که توسط

[25] Apoptosis
[26] Embryoid bodies