بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه اراک

دانشکده علوم پایه

کارشناسی ارشدزیست شناسی (سلولی-تکوینی)

بررسی اثر تیمار همزمان ویتامین E و کلریدکادمیوم بر تمایز آزمایشگاهی سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت به استئوبلاست

پژوهشگر:

زینب دادگر

استاد راهنما:

دکترملک سلیمانی مهرنجانی

استاد مشاور:

دکترمجید مهدیه نجف آبادی

مهرماه ۱۳۹۱

بسم ا... الرحمن الرحیم

بررسی اثر تیمار همزمان ویتامین E و کلرید کادمیوم بر تمایز آمایشگاهی سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان موش صحرایی به استئوبلاست

توسط:
زینب دادگر

پایان نامه
ارائه شده به مدیریت تحصیلات تکمیلی به عنوان بخشی از فعالیت های تحصیلی لازم برای
اخذ درجه کارشناسی ارشد
در رشته ی زیست شناسی(گرایش سلولی- تکوینی)

از

دانشگاه اراک
اراک-ایران

ارزیابی و تصویب شده توسط کمیته پایان نامه بادرجه: عالی . 19:92

دکترملک سلیمانی مهرنجانی (استاد راهنما و رئیس کمیته).....دانشیار

دکتر مجید مهدیه (دانشگاه اراک).....استادیار

دکترسید محمدعلی شریعت زاده (دانشگاه اراک).....استاد

مهرماه 1391

این پایان نامه را به اعتبار بی بازگشت ترین لحظات زندگیم که در کسوت مقدس دانش آموزی گذشته است

تقدیم می کنم به زیباترین بهانه هایم برای زیستن؛

پدربزرگ عزیزم

تندیس پرشکوه مهر و فرشته ی بی همتا، که نامش دلیلی است بر بودنم؛

پر معناترین واژه های خلقت؛

پدر دلسوز و بزرگوارم و مادر صبور و مهربانم

که در وجودشان تجلی عظیم آفریدگار پرتو می افکند؛

و عظمت و فداکاری هایشان شکوه کوه را به زنجیر حقارت می کشاند؛

و مهر گردون از فروغ جاودانشان نور می گیرد.

تقدیم به

بهار وجودم، برادر عزیزم امیر حسین

که وجودش گرانبهاترین و زیباترین هدیه خداوندی در زندگی بوده است...

من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق عزوجل

برترین و بی شائبه ترین سپاس مخصوص **یگانه** ایست که شعله عشق به تحصیل را در فانوس سینه ی پر مهر صاحبان علم و طالبان عمل روشن نمود و حمد و ثنا کردگاری را سزاست که رخصت کسب علم و دانش را به ما عطا فرموده است تا ظلمت جهل و نادانی را به روشنایی فهم و کمال بیارایم.

بالاترین سپاس صمیمانه ام را نثار همسفران همیشه بیدار و دلسوزم **پدر و مادر عزیز و مهربانم** می نمایم. آن ها که نخستین گام ها و سخن گفتن ها و آغازین دانسته هایم را در مکتب معرفتشان آموختم و باران محبتشان طراوت بخش زندگیم است و اکنون واژه ای برای سپاس و جبران این همه محبت و فداکاری نمی یابم.

فراوان ترین گلواژه های سپاس خود را نثار **خواهران عزیز و دوست داشتنی ام** می کنم که همچون شمعی روشنی بخش زندگیم هستند. آنان که با نگاه پر مهر همواره مشوق و همراهم بوده و چشمانشان امید را بر دلم می نشاند و لبخند موفقیتم در گرو تبسم حضور آنهاست.

قدردان وجود پر مهر عزیزانم هستم که بهترین برایم خواستند و بهترین برایم هستند.

خالصانه ترین ارادت قلبیم، با شایسته ترین مراتب سپاس و قدردانی خود را تقدیم به استاد راهنمای ارجمندم **جناب آقای دکتر سلیمانی** می کنم که با علم و بردباری فراوانش هدایتم نمود. استاد فرهیخته ای که به من آموخت به جای استفاده از اندیشه دیگران خود بیاندیشم. باشد که در پناه مهر یزدان همواره شاد و سلامت باشد.

مراتب تشکر و سپاس خود را از **جناب آقای دکتر مهدیه** استاد مشاور اینجانب ابراز می دارم.

همچنین از مساعدت و راهنمایی های سازنده **جناب آقای دکتر شریعت زاده** به عنوان متخصص و صاحب نظر که زحمت مطالعه و داوری این پایان نامه را متقبل شدند صمیمانه سپاسگزارم.

از **اساتید گرانقدر گروه زیست شناسی** که از تجربیات ارزنده شان استفاده نمودم سپاسگزارم.

از **کلیه دوستان خوبم** که در طول دوران تحصیل مرا مورد لطف خویش قرار دادند، نهایت تشکر را دارم.

چکیده:

سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان (MSCs) سلول های چند توان هستند که توانایی تمایز به رده های مختلف سلولی را دارند .کادمیوم فلزی است که از طرف آژانس سرطان شناسی جزکارسینوژن های انسانی طبقه بندی شده است. ویتامین E یک آنتی اکسیدان محلول در چربی است که با اختلال در واکنشهای زنجیری رادیکالهای آزاد از پراکسیداسیون لیپیدی سلول ها جلوگیری میکند . با توجه به وجود کادمیوم به عنوان یک آلاینده زیست محیطی بخصوص در جوامع صنعتی و همچنین وجود ویتامین E به عنوان اولین خط دفاعی سلولها برای جلوگیری از پراکسیداسیون، اثر همزمان این دو ماده بر تمایز MSCs به استئوبلاست بررسی شد. پس از استخراج و کشت MSCs ، سلولهای پاساژ ۳ طی ۲۱ روز در معرض دزهای مختلف ویتامین E قرار گرفتند و توانایی زیستی و میزان معسپس سلول هارا با دوز ۵۰ میکرومولار ویتامین E و دوزهای ۱۵۰۰،۱۰۰۰ و ۲۵۰۰ نانومولار کادمیوم تیمار شدند و توانایی زیستی و میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی از طریق تست های فوق الذکر ارزیابی شد. برای ادامه مطالعه، دوز ۵۰ میکرومولار ویتامین E و ۱۰۰۰ نانومولار کادمیوم انتخاب شد . تاثیر اثر همزمان ویتامین E و کادمیوم بر میزان تمایز استئوبلاستی MSCs از طریق تست های MTT ، آلیزارین رد، سنجش میزان رسوب کلسیم داخل سلولی و خارج سلولی، میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز، مورفولوژی سلول های تمایز یافته توسط رنگ های فلورسنس و میزان شکستگی DNA توسط تست کامت و میزان سنتز پروتئین های استئوکلسین و استئوپونتین توسط تکنیک ایمینوهیستوشیمی ارزیابی شد نتایج نشان داد که کادمیوم طی۲۱روز موجب کاهش میزان تمایز MSCs به استئوبلاست و ویتامین E باعث جبران اثر تخریبی کادمیوم شد و همچنین در گروه تیمار شده با ویتامین E افزایش میزان تمایز MSCs به استئوبلاست مشاهده گردید .

فهرست

عنوان صفحه

فصل اول مقدمه
۱-۱ سلول های بنیادی..... ۲
۱-۱-۱.انواع سلول های بنیادی بر اساس توان تمایز ۴
۱-۱-۱-۱.همه توان..... ۴
۱-۱-۱-۲.پرتوان ۴
۱-۱-۱-۳.چند توان ۴
۱-۱-۱-۴.تک توان ۴
۱-۱-۱-۵. دسته بندی ومنابع سلول های بنیادی ۵
۱-۱-۲-۱.سلول های بنیادی رویانی..... ۶
۱-۱-۲-۲. سلول های بنیادی ۷
۱-۱-۲-۳.سلول های بنیادی خون بندناف..... ۸
۱-۱-۲-۴.سلول های بنیادی بالغ..... ۸
۱-۲. بافت مغز استخوان ۱۴
۱-۲-۱. سلول های بنیادی مغز استخوان..... ۱۵
۱-۲-۱-۱.سلول های بنیادی خونساز..... ۱۵
۱-۲-۱-۲.. سلول MAPC ۱۶
۱-۳.مزانشیم..... ۱۷
۱-۳-۲.منشا جنینی سلول های بنیادی مزانشیم..... ۱۸
۱۱-۳-۳. پراکنش سلول های بنیادی مزانشیم ۱۹
۱-۳-۴. جداسازی سلول های بنیادی مزانشیم ۲۲
۱-۳-۵. نشانگرهای سلول های بنیادی مزانشیم..... ۲۱
۱-۳-۵-۱.نشانگرهای مثبت..... ۲۱
۱-۳-۵-۲.نشانگرهای منفی..... ۲۲

۱-۳-۶.خودنوزایی سلول های بنیادی مزانشیم..... ۲۳
۱-۳-۷. نیچ سلول های بنیادی مزانشیم..... ۲۴
۱-۳-۷-۱. ترکیبات سلولی نیچ سلول های بنیادی مزانشیم..... ۲۴
۱-۴.تمایز سلول های بنیادی مزانشیم..... ۲۵
۱-۵. جنبه های کاربردی سلول های بنیادی مزانشیم..... ۲۶
۱-۵-۱.کاربرد فارماکولوژیکی سلول های بنیادی مزانشیم..... ۲۶
۱-۵-۲.کاربرد سلول های بنیادی مزانشیم در ژن درمانی..... ۲۷
۱-۵-۳.کاربرد سلول های بنیادی مزانشیم درمهندسی بافت..... ۲۷
۱-۶.تمایز استئوژنیک سلول های بنیادی مزانشیم..... ۲۷
۱-۶-۱.اهمیت تمایز به استخوان..... ۲۷
۱-۶-۲. فرایند استخوان سازی..... ۲۸
۱-۶-۳. شرایط آزمایشگاهی لازم برای تمایز به استخوان سلول های بنیادی مزانشیم..... ۲۸
۱-۷.کادمیوم..... ۲۹
۱-۷-۱. سمیت کادمیوم ۳۲
۱-۷-۲.آثار سمی کامیوم بر بدن انسان..... ۳۲
۱-۷-۲-۱.اثر کادمیوم بر سیستم اسکلتی..... ۳۳
۱-۷-۲-۲. اثر کادمیوم بر سرطان زایی..... ۳۳
۱-۷-۲-۳.کادمیوم و سیستم تولید مثل..... ۳۴
۱-۷-۲-۴.کادمیوم و سیستم کلیوی..... ۳۵
۱-۷-۲-۵. کادمیوم و سیستم تنفسی ۳۶
۱-۷-۲-۶.کادمیوم وسیستم عصبی ۳۶
۱-۷-۳. کادمیوم واسترس اکسیداتیو..... ۳۷
۱-۷-۴.کادمیوم و مکانیسم های مولکولی..... ۳۸
۱-۸.انتی اکسیدان ها..... ۳۹
۱-۸-۱.ویتامین E..... ۴۲
. ۱ ۸ ۲اشکال مختلف ویتامینE..... ۴۲
۱-۹. مروری بر مطالعات گذشته ۴۳

هدف مطالعه..... .....۴۶

فصل دوم (مواد و روش ها)

۲-۱. انتخاب حیوان ۴۸

۲-۲. جداسازی و کشت سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان ۴۸

۲-۲-۱. اجرای پاساژ ۵۲

۲-۳. اثبات مزانشیم بودن سلول های استخراج شده ۵۱

۲-۳-۱. تمایز به استخوان..... .....۵۱

۲-۳-۱-۱. مراحل رنگ آمیزی آلیزارین رد ۵۲

۲-۴.دوز یابی ۵۲

۲-۴-۱.بررسی توان زیستی سلول ها..... ....۵۴

۲-۴-۱. ترسیم منحنی استاندارد با استفاده از سنجش تترالیوزوم.....۵۵

۲-۴-۲-۱. سنجش میزان رسوب ماتریکس معدنی به کمک استخراج رنگ آلیزارین رد ۵۵

۲-۴-۳. انتخاب دوز موثر ۵۶

۲-۵. بررسی روند تمایز.....۵۷

۲-۵-۱.انجام تست MTT برای سلول های تمایز یافته..... .....۵۷

۲-۵-۲. سنجش میزان رسوب ماتریکس معدنی به کمک استخراج رنگ آلیزارین رد ۵۷

۲-۵-۲-۱. بررسی میزان رسوب ماتریکس استخوانی در نمونه های تیمار شده ۵۸

۲-۵-۳. بررسی میزان رسوب کلسیم خارج سلولی با استفاده از رنگآمیزی وان کوزا..... .. ..۵۹

۲-۵-۴.بررسی میزان رسوب کلسیم داخل سلولی با استفاده از کیت کلسیم..... .....۵۹

۲-۵-۵.بررسی میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز ۶۱

۲-۵-۵-۱.طرز تهیه منحنی استاندارد..... .....۶۱

۲-۵-۵-۲. بررسی میزان فعالیت آنزیم در سلول های تیمار شده استئوژنیک ۶۱

۲-۵-۶.بررسی سنتز استئوکلسین واستئوپونتین..... .....۶۳

۲-۵-۶-۱. مراحل انجام تکنیک ایمونوهیستوشیمی ۶۵

۲-۶.بررسی آپوپتوز..... .....۶۶

۲-۶-۱. بررسی تغییرات مورفولوژیکی در نمونه های استئوژنیک با استفاده از رنگ آمیزی فلورسنس..... ۶۶
۲-۶-۲.آزمون کامت.....۶۷
۲-۶-۲-۱.آماده سازی لام.....۶۸
۲-۶-۲-۲. لیز کردن سلول ها.....۶۹
۲-۶-۲-۳. تیمار قلیایی سلول ها.....۶۹
۲-۶-۲-۴. الکتروفورز سلول.....۶۹
۲-۶-۲-۵ خنثی سازی وتثبیت.....۷۲
۲-۶-۲-۶. رنگ آمیزی.....۷۲
۲-۶-۲-۷. بررسی میکروسکوپی و عکس برداری.....۷۲
۲-۷. تجزیه تحلیل آماری داده ها ۷۲

فصل سوم(نتایج)
الف)نتایج مرحله استخراج سلول ها و انتخاب دوز موثر ۷۳
۳-۱ .رشد و تکثیر سلول های بنیادی مزانشیم.....۷۴
۳-۲.دوز یابی.....۷۵
۳-۲-۱. اثر ویتامین E بر توانایی زیستی سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان موش صحرایی برپایه ی رنگ سنجی.....۷۵
۳-۲-۳. اثر ویتامین E بر میزان رسوب ماتریکس معدنی به کمک استخراج رنگ آلیزارین رد..... ۷۵
انتخاب دوز موثر.. .....۷۷
۳-۲-۳. اثر همزمان ویتامین E وکادمبوم ر توانایی زیستی سلول های بنیادی مزانشیم.....۷۷
۳-۲-۴. اثر همزمان ویتامین E و کادمیوم بر میزان رسوب ماتریکس معدنی به کمک استخراج رنگ امیزی آلیزارین رد.....۷۸
انتخاب دوز موثر ۷۹

ب)نتایج اثر همزمان ویتامین E و کادمیوم بر تمایز سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان به استئوبلاست ۸۲
۳-۳-۱.توانایی زیستی سلول ها بر پایه روش رنگ سنجی ۸۲
۳-۳-۲.میزان معدنی شدن ماتریکس با سنجش رنگ آلیزارین رد ۸۲
۳-۳-۳.میزان رسوب کلسیم خارج سلولی ۸۳
۳-۳-۴.میزان رسوب کلسیم داخل سلولی ۸۵
۳-۳-۵. میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز.....۸۶
۳-۳-۶. بررسی سنتز استئوکلسین واستئوپونتین ۸۷
۳-۳-۷.آزمون کامت.....۸۸
۳-۳-۸.بررسی تغییرات مورفولوژیکی با استفاده از رنگ آمیزی فلورسنس در نمونه های استئوژنیک.....۹۱
فصل چهارم(بحث).....۱۰۷
فصل پنجم(پیوست).....۱۱۸
۵-۱. روش تهیه محیط کشت.....۱۱۹
۵-۲.تهیه ی فسفات بافر سالین مثبت.....۱۱۹
۵-۳. تهیه ی فسفات بافر سالین مثبت.....۱۱۹
۵-۴.روش تهیه محیط تمایزی استئوزنیک.....۱۲۰
۵-۵. آماده سازی آلیزارین رد.....۱۲۱
۵-۶. روش تهیه ی محلول MTT،.....۱۲۱
۵-۷. روش تهیه محلول فرمالدئید ۱۲۲
۵-۸. روش تهیه محلول نقره نیترات ۱۲۲
۵-۹. بافر استخراج آنزیم آلکالین فسفاتاز ۱۲۳
۵-۱۲.روش لاوری.....۱۲۳
۵-۱۲-۱ روش تهیه ی محلولBSA.....۱۲۳
۵-۱۲-۲.روش تهیه ی محلول کمپلکس ۱۲۱
۵-۱۱.روش تهیه ی محلول آگارز با نقطه ذوب معمولی ۱۲۱
۵-۱۲.روش تهیه ی محلول آگارز با نقطه ذوب پایین ۱۲۱

۵-۱۳. محلول لیز کننده ۱۲۱
۵-۱۴. بافر الکتروفورز ۱۲۲
۵-۱۵.بافر خنثی..... .....۱۲۲
فصل ششم (منابع و ماخذ)..... ۱۲۴

فصل اول

مقدمه

مقدمه

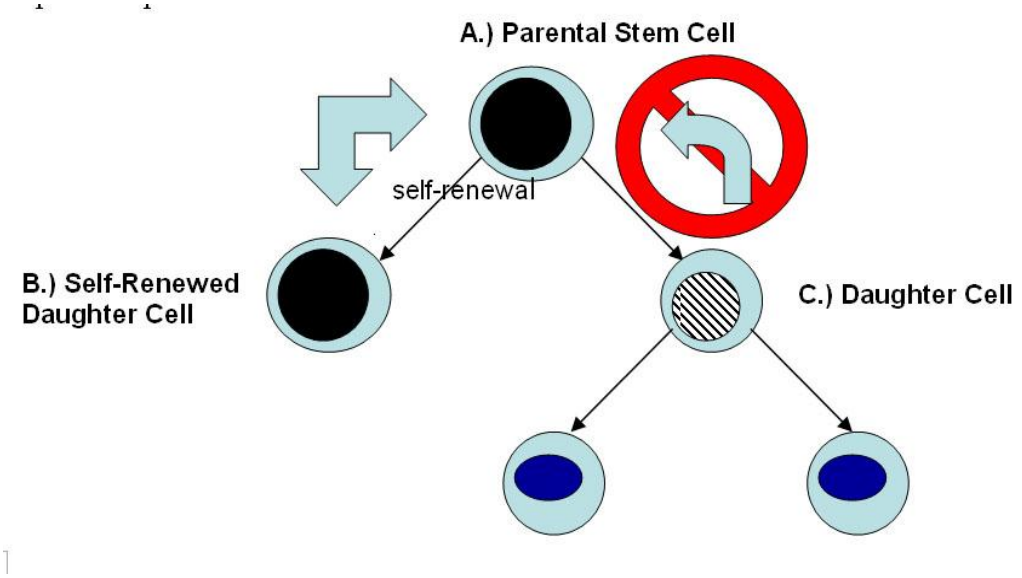
۱-۱.تعریف سلول های بنیادی

در واقع لغت بنیادی (Stem) از اصطلاحات گیاه شناسی به عنوان ساقه گیاهان منشاء گرفته است .جایی که وجود سلول های بنیادی در ریشه سطحی و هراتاک (meristem) به اثبات رسیده است که مسئول تشکیل یا بازسازی کل گیاه می باشد(۱) .سلول های بنیادی، سلول های غیر تخصصی هستند که قادرند تحت شرایط خاص، به یکی از انواع سلول های بالغ و یا کاملاً تمایز یافته تبدیل شوند(۲).

قاعدتاً یک سلول بنیادی تا قبل از دریافت یک سیگنال جهت تکامل به سلول تخصصی به صورت غیرتعهدی باقی می ماند. سلول های بنیادی در بدن انسان ویژگی تمایز به بسیاری از سلول ها را دارند. سلول های بنیادی به عنوان سیستم ترمیم به خدمت گرفته می شوند زیرا که توانایی تقسیم بدون محدودیت برای جایگزینی دیگر سلول ها را دارند. وقتی یک سلول بنیادی تقسیم می شود هر سلول جدید بدست آمده این پتانسیل را دارد که سلول بنیادی باقی بماند یا به سلول تخصصی جدید مثل سلول های خونی و مغزی تبدیل شود(۳). اکثر حوادث ترمیم در بدن پستان داران حوادث تمایزی هستند که با فعال شدن سلول های بنیادی یا سلول های پیش ساز موجود در بافت ایجاد می شوند(۴).

برای تعریف سلول های بنیادی، چهار ویژگی اصلی وجود دارد:

۱)سلول های بنیادی می توانند با تقسیمات کاملاً مشابه که شرط لازم برای پشتیبانی و نگه داری جمعیت سلول های بنیادی است، خودنوزایی داشته باشند(۳و۴).



شکل۱-۱: پدیده خود نوزایی در سلول های بنیادی

۲) سلول های دختری به وجود آمده از تقسیم یک سلول بنیادی، توانایی لازم برای تمایز به انواع سلول های بالغ را دارند. به عنوان مثال، سلول های بنیادی عصبی می توانند به سلول های آستروسیت و سلول های الیگودندریتی تمایز یابند (۵). سلول های بنیادی رده ی خونساز، قادرند انواع سلول های خونی را تولید کنند (۶). و یا سلول های بنیادی جنینی، که سلول های اووسیت را می توانند تولید کنند(۷). سلول های بنیادی مزانشیم بالغ (MSCs) نیز می توانند انواع سلول های بافت مزانشیمی از جمله فیبروبلاست، استئوسیت، کندروسیت و آدیپوسیت را تولید کنند(۸).

۳) سلول های بنیادی خاصیت کلون زایی دارند و هر سلول می تواند تعداد زیادی کلون تولید کند (۹).

۴) سلول های بنیادی قادرند به بافت آسیب دیده پیوند شوند و یک جمعیت سلولی ترمیمی را تشکیل دهند. به عنوان مثال، سلول های بنیادی خونساز برای ترمیم سلول های کبدی در بیمارانی که دارای ناراحتی کبدی هستند، مورد استفاده قرار گرفته اند(۱۰).

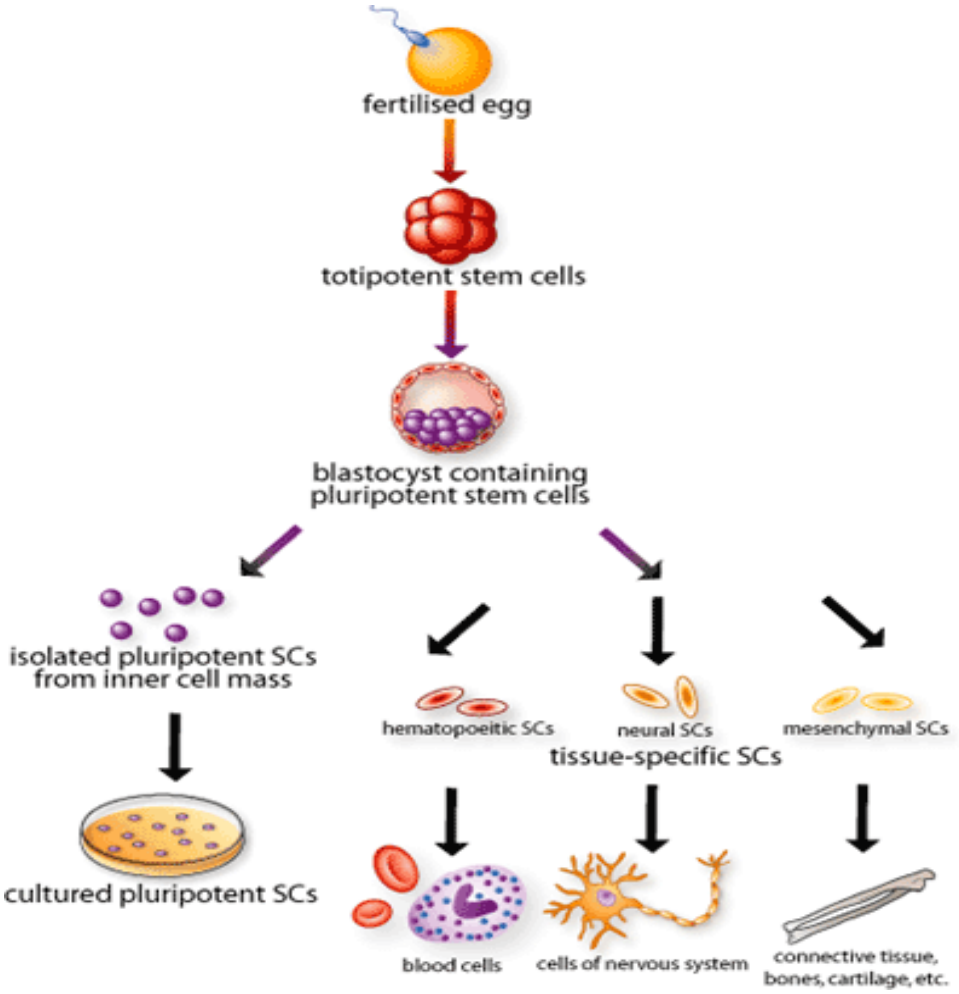
۱-۱-۱ تقسیم بندی سلول های بنیادی بر اساس توان تمایزی و برگشت پذیری

۱-۱-۱-۱ همه توان: این سلول ها می توانند همه ی انواع سلول های فرد و سلول های برون جنینی (جفت) را بسازند. اووسیت لقاح یافته پستان داران، سلول تخم، جنین در مراحل ۲ سلولی، ۴ سلولی، ۸سلولی و مورولا همه توان می باشند. از آنجا که بلاستومرها نمی توانند در طول تقسیمات کلیواژی ، خود نوزایی کنند و تولیدشان محدود می شود آنها را سلول بنیادی نمی گویند(۱۱).

۱-۱-۱-۲ پرتوان: سلول هایی هستند که می توانند همه ی سلول های فرد را بسازند. مثلاً سلول های بنیادی، تحت شرایط خاص می توانند یک فرد را بسازند ولی قادر به ایجاد سلول های برون جنینی نیستند. سلول های زاینده جنینی و سلول های تمایز نیافته کارسینومای جنینی نیز پرتوان می باشند (۱۲).

۱-۱-۱-۳ چندتوان: این سلول ها تعداد محدودتری از انواع سلول ها را می سازند. این سلول ها در بافت های بزرگسالان وجود دارند مانند سلول های بنیادی هماتوپوئیتیک که در مغز استخوان یافت می شود ومی توانند سلول های موجود در خون از قبیل گلبول های سفید و قرمز و پلاکت ها را تولید کنند (۱۳).

۱-۱-۱-۴ یک توان: توانایی ایجاد یک نوع سلول را دارند ولی توانایی خود نوزایی خود را حفظ کرده اند. مانند سلول های بنیادی اسپرماتوگونی که توانایی تولید اسپرم را دارند.



شکل۱-۲: توانایی سلول های همه توان و پر توان درتمایز به طیف وسیع سلولی

۱-۱-۲ دسته بندی و منابع سلول های بنیادی:

سلول های بنیادی بر اساس منشا به چهار نوع، دسته بندی می شوند که شامل : سلول های بنیادی از رویان (Embryonic)، سلول های بنیادی از جنین(Fetus) ، سلول های بنیادی از بند ناف و سلول های بنیادی از افراد بالغ، که هر کدام ازاین گروه ها دارای زیر گروه نیز می باشند.

۱-۱-۲-۱ سلول های بنیادی رویانی(Embryonic stem cells)

همان طور که گفته شد در پستان داران زیگوت، رویان های۲ سلولی، ۴ سلولی، ۸ سلولی و مورولا که نتیجه تقسیم های کلیواژ (تقسیمی که باعث کوچک شدن اندازه سلول می شود) در رویان اولیه هستند مثال هایی از سلول های با توان بالا (Totipoten) می باشند (۱۱). دلیل توان بالای این سلول ها از این حقیقت ناشی می شود که دو قلوهای مشابهی را می توان از دو قسمت کردن جنین اولیه درحیوانات اهلی درشرایط آزمایشگاهی به وجود آورد. توده سلولی داخلی ([Inner cell mass [ICM])، بلاستوسیتهای ۵ تا ٦ روزه انسانی منبع سلول های بنیادی رویانی پرتوان (hESCs)، هستند (در طول تکامل رویان ICM به دولایه مجزا به نام اپی بلاست و هیپوبلاست تکامل می یابد هیپوبلاست کیسه زرده را تشکیل می دهد که در نهایت در انسان زیاد کارآیی ندارد و اپی بلاست که به سه لایه زایای بدوی(اکتودرم، مزودرم، اندودرم) تمایز می یابد .سلول های اندودرمی رویانی تا حدودی در مسیرهای تکاملیشان محدود می شوند. جمعیت کوچکی از سلول های چند توان که آندودرم قطعی نامیده می شوند توانایی ایجاد همه ارگان های مشتق از اندودرم را دارند .اندودرم قطعی در طول گاسترولاسیون از سلولهای اپی بلاست پر توان بلافاصله بعد از لانه گزینی جدا شده است. اندودرم قطعی از یک صفحه اپی تلیالی که تقریباً 600 سلول دارد و سطح شکمی جنین را می پوشاند، تشکیل شده است. این صفحه بعداً روده پیشین، میانی و پسین را تشکیل می دهد .روده پیشین بعداً ریه، کبد، معده و پانکراس را تشکیل می دهد در حالی که بخش های خلفی تر آن روده ها (روده میانی) را تشکیل می دهند .روده پسین، رکتوم، روده بزرگ و کلوآک را به وجود می آورد(۱۵). آشنایی با مشتقات این مسیرهای تکامل جهت فهم بهتر عوامل و حوادثی که منجر به تمایز سلول های بنیادی رویانی به بافت مورد علاقه مثل پانکراس می شود ضروری می باشد .سلول های بنیادی رویانی پر توان در شرایط Invitro می

توانند به سلول های زیادی از جمله به بافت های مشتق از سلول های آندودرمی تمایز پیدا کنند. پیشرفت در فهمیدن این که چگونه سلول های بنیادی تمایز می یابند می تواند جواب هایی برای برنامه ریزی مجدد (re-programming) سلول های بنیادی از بافت های بالغ داشته باشد(۱۶).

سلول های زایای رویانی(Emberyonic germ cells):

سلولهای زایای بدوی یا پیش ساز سلول های زایای دیپلوئیدی قبل از مهاجرت، به طور موقت در جدار خلفی کیسه زرده در جنین وجود دارند. سلول های زایای بدوی یا پیش ساز سلول های زایای دیپلوئیدی ازجدارخلفی کیسه زده منشاء می گیرند و سپس به ستیغ های گنادی مهاجرت کرده و در هفته ۵ وارد ستیغ ها می شوند. این سلول ها از هفته ۵ تا ۹ که هنوز تمایز نیافته اند از ستیغ ها جدا سازی شده و به عنوان سلول های زایای رویانی انسانی (hegcs) که یکی از انواع سلول های بنیادی محسوب می شوند، نامگذاری می گردند. سلول های hEG به طور موفقیت آمیزی جداسازی و تعیین ماهیت شده اند .این سلول ها پر توان می باشند و توانایی ایجاد هر سه لایه زایای جنینی را دارند(۱۷).

۱-۱-۲-۲ سلول های بنیادی جنینی (Fetal stem cells):

سلول های بنیادی جنینی از نوع سلول های اولیه ای هستند که در ارگان های جنین یافت می شوند .سلول های بنیادی نورال کرست ، سلول های بنیادی خونساز جنینی و پیش سازهای جزایر پانکراس از جنین های سقط شده جداسازی شده اند . سلولهای بنیادی عصبی جنینی که در مغز جنین یافت می شوند می توانند هم به نورون و هم به سلول های گلیال

تمایز پیدا کنند . خون جنین، جفت و بند ناف منبع غنی از سلول های بنیادی خونساز جنین هستند(۱۸و۱۹).

۱-۱-۲- ۳ سلول های بنیادی بند ناف (Umbilical cord stem cells):

خون بندناف حاوی سلول های بنیادی در حال گردش می باشد و محتوای سلولی خون بند ناف ظاهراً ازمحتوای سلولی خون محیطی افراد بالغ و مغز استخوان کاملاً متفاوت می باشد. خصوصیات سلول های بنیادی خونساز خون بند ناف اخیراً شناسایی شده است(۲۰) . فراوانی سلول های بنیادی خونساز خون بند ناف برابر یا بیشتر از سلول های مغز استخوان می باشند و نشان داده شده است که این سلول ها تلومرهای بلندی دارند و درinvitro کلونی های بزرگی ایجاد کرده و فاکتورهای رشد متفاوتی نیاز دارند، و به مدت طولانی می توان آنها را پاساژ داد. سلول های بنیادی بند ناف کاهش رد پیوند را در مقایسه با مغز استخوان نشان می دهند که احتمالاً مربوط به بالابودن سطح اینترلوکین ۱۰ تولید شده توسط سلول ها و یا کاهش بیان میکروگلوبولین B2 می باشد. این سلول ها چند توان بوده و قادر به تمایز به سلول های عصبی و کبدی می باشند(۲۱).

در حالی که بیشتر توجهات روی سلول های بنیادی خون بند ناف و ذخیره آنها برای آینده می باشد .گزارش شده است که سلول های ماتریکس بند ناف نیز حاوی سلول های بنیادی بالقوه قابل استفاده ای می باشند(۲۲). این ماتریکس که ژله وارتون نامیده می شود منبعی از سلول های بنیادی مزانشیمی می باشد. این سلول ها مارکرهای سلول بنیادی مثل C-Kit را بیان می کنند، فعالیت تلومرازی بالایی دارند، قابل پاساژ برای طولانی مدت هستند و می توانند به عصب تمایز یابند(۲۳).