بسم الله الرحمن الرحيم
الحمد لله رب العالمين الرحمن الرحيم مالك يوم الدين
اهدنا الصراط المستقيم صراط الذين
انعمت عليهم غير المغضوب عليهم
ولا الضالين

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
دانشگاه تربیت معلّم آذربایجان
دانشکده علوم پایه
گروه زیست شناسی

پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد
رشته زیست شناسی سلولی و مولکولی

مطالعه تمایز سلولهای بنیادی جنینی موش به سلولهای شبه عصبی

اساتید راهنما:
دکتر منصوره موحدین – دکتر نادر چاپارزاده
اساتید مشاور:
دکتر مهدی فروزنده – دکتر معصومه خیری

پژوهشگر:
هاجر استیری

اسفند ماه / سال ۱۳۸٦
تبریز / ایران

تقدیم به پهلوان بزرگی که قلبش شتابان تر از لحظات مسابقات، برای ارتقاء علم وکمک به همنوع می تپد

تقدیم به برادرم عباس

با تشکر و قدردانی از:

اساتید بزرگواری که در تمام مراحل تحصیل وتحقیق یاور وپشتیبانم بوده اند.

دکتر محمد اقازاده، دکتر منصوره موحدین، دکتر نادر چاپارزاده، دکتر زرندی، دکتر مجیدی، دکتر سفالیان، دکتر سلمانیان، دکتر موسوی، دکتر خسروشاهی، دکتر صیامی، دکتر عیوضیان، دکتر صالح نیا، پروفسور تقی الطریحی، دکتر مهدی فروزنده، دکتر معصومه خیری، دکتر رضازاده.

مسئولین محترم گروه علوم تشریح:

شهرام پور بیرانوند، سعیده ابراهیمی ، اقای محمد لو وکارشناس گرامی گروه زیست شناسی خانم هاشمی.

دانشجویان خونگرم وبا معرفت تربیت مدرس:

زهره ماکولاتی، فروزان ابسالان، فاطمه پیغمبری، بهار موقر ، ماندانا بیگی، محمد علی اوچی، مرتضی کروجی، مجید نقدی، غلامرضا کاکا، علی عابد الهی، محمد رضا گلبار، خانم رجبی، یاشار سعدیان.

همکلاسی های خوب ومهربانم:

اطهر جوانمرد ، ساره زیدابادی، مهرناز ایزد پناه، ساره اسدی ، کینوش خلوقی، وحیده احمد زاده، سپیده ذنونی واحد، رضا گلیجانی مقدم، حبیب رضانژاد، حمید محمدی مطلق، سعید جهانگیر

وبا تشکر از همسردلسوز و باوفایم که همیشه همراه و پشتیبانم بوده است.

هاجر استیری

اسفند ۱۳۸۶

تبریز، ایران

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول : مقدمه

۱-۱. سلولهای بنیادی رویانی ۲

۱-۲. تمایز سلول بنیادی رویانی به سلولهای عصبی..... ۴

فصل دوم :مروری بر مطالعات انجام شده

۲-۱ . دودمان های سلول بنیادی ۷

۲-۱-۱.سلولهای بنیادی بالغ یا سلولهای بنیادی سوماتیک(SSCs) ۷

۲-۱-۲. سلولهای بنیادی جنینی(FSCs) ۸

۲-۱-۳. سلولهای زایای جنینی(EG Cells)..... ۸

۲-۱-۴.سلولهای کارسینومای جنینی(EC Cells)..... ۹

۲-۱-۵.سلولهای بنیادی رویانی(ES cells)..... ۹

۲-۲.ویژگی های سلول بنیادی رویانی..... ۱۰

۲-۲-۱.تشکیل کلنی در محیط کشت..... ۱۰

۲-۲-۲.مشخصات سلول..... ۱۰

۲-۲-۳.نشانگرهای ویژه سلولهای ES ۱۱

۲-۲-۴.قابلیت تمایز در محیط کشت..... ۱۲

۲-۲-۵. قابلیت تمایز دربدن موجود زنده ۱۴

۲-۳. . دودمان سلول بنیادیCCE..... ۱۵

۲-۴.تمایز سلولهای بنیادی رویانی به سلولهای عصبی ۱۶

۲-۵.انواع سلولهای پیش ساز عصبی ۱۷

۲-۵-۱. سلولهای پیش ساز عصبی نامیرا ۱۷

۲-۵-۲. سلولهای بنیادی عصبی چند استعدادی ۱۹
۲-۵-۳. سلولهای بنیادی مشتق از ستیغ عصبی(NCSCs) ۲۰
۲-۵-۴. سلولهای پیش ساز محدود به رده ۲۱
۲-۵-۵. سلولهای بنیادی عصبی انسانی ۲۲
۲-۵-۶. نورون وگلیای مشتق از سلولهای بنیادی پر توان ۲۳
۲-۶.پروتکل های مختلف تمایز عصبی سلولهای بنیادی رویانی در محیط کشت ۲۷
۲-۶-۱.اسید رتینوئیک وتمایز سلولهای ES ۲۷
۲-۶-۲.محیط کشت ITSFn و تمایز عصبی ES ۲۸
۲-۶-۳.پروتکل پنج مرحله برای تولید نورونهای دوپامینرژیک از سلولهای بنیادی رویانی ۲۹
۲-۷.تایید هویت سلولهای عصبی ۳۰
۲-۷-۱.ایمنو سیتوشیمی ۳۱
۲-۷-۲. بررسی بیان ژن فاکتورهای نوروتروفیک به روش RT-PCR ۳۲
۲-۸.ضرورت انجام تحقیق ۳۴
۲-۹.اهداف ۳۶
۲-۱۰.فرضیه ها ۳۷

فصل سوم : مواد و روش ها

۳-۱. سلول های بنیادی جنینی ۳۹
۳-۲. کشت سلول در شرایط غیر تمایزی ۴۰
۳-۲-۱. محلول‌های مورد نیاز جهت کشت سلول در شرایط غیر تمایزی ۴۰
۳-۲-۱-۱. بافر نمکی PBSفاقد کلسیم- منیزیم ۴۰
۳-۲-۱-۲. محلول تریپسینEDTA ۴۰

۳-۲-۱-۳. رنگ تریپان بلو ۴۱
۳-۲-۱-۴. محیط کشت DMEM ٤١
۳-۲-۲. مراحل و روش های نگهداری سلول های بنیادی جنینی در شرایط غیر تمایزی ۴۲
۳-۲-۲-۱. ذوب سلول های بنیادی جنینی (ذخیره شده در کرایوتیوب های ۱/۵ میلی لیتری
در تانک ازت) ۴۲
۳-۲-۲-۲. شمارش سلولی ۴۳
۳-۲-۲-۳. کشت سلول های بنیادی جنینی در شرایط غیر تمایزی ۴۳
۳-۲-۳. پاساژ سلولی ۴۴
۳-۳. منجمد کردن سلول های بنیادی جنینی تمایز نیافته ٤٤
۳-۳-۱. محلول‌های مورد نیاز ۴۴
۳-۳-۲. روش کار ۴۵
۳-٤-۱ . تهیه فیبروبلاست های اولیه جنینی ٤٥
۳-٤-۲ .تیمار با مایتومایسین ٤٧
۳-۵ القای شروع تمایز اولیه در سلول های ES و تشکیل ٤٨
۳-۵-۱. تشکیل اجسام شبه جنینی به روش قطره های آویزان ٤٨
۳-۵-۲ .القای فنوتیپ عصبی با استفاده از اسیدرتینوئیک اسید؛ پروتکل +٤/-٤ ..... ٤٩
۳-٦ .تأیید هویت سلول های عصبی ۵۰
۳-٦-۱. بررسی نشانگر عصبی به روش ایمنوسیتوشیمی ۵۰
۳-۷. بررسی مولکولی ۵۱
۳-۷-۱. مراقبت از RNA ۵۱
۳-۷-۲. مراقبت از آنزیم های مورد استفاده در فرایند ساختcDNA وPCR ۵۲
۳-۷-۳. ایمنی در کار با DEPC و اتیدیوم بروماید ۵۲
۳-۸. انجام RT–PCR ۵۲
۳-۸-۱.استخراج RNA ۵۲

۳-۸-۲. مرحله یRT یا ترجمه ی معکوس (جهت ساخت cDNA) ۵۳
۳-۸-۳. مرحله ی PCR ۵۳
۳-۹. روش ها و مراحل انجام بررسی مولکولی در تحقیق حاضر ۵۳
۳-۹-۱..نحوه ی ساخت آب تیمار شده با DEPC ۵۳
۳-۱۰. اندازه‌گیری غلظت RNA ٥٤
۳-۱۰-۱. روش اسپکتروفتومتری ٥٤
۳-۱۰-۲. روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز ٥٥
۳-۱۱. مرحله ی ساخت cDNA ٥٨
۳-۱۲. مرحله ی PCR ٥٩

فصل چهارم :نتایج

٤-۱ .توانایی تشکیل اجسام شبه جنینی(EB) و بررسی قدرت تمایزی سلول های ES ٦٤
٤-۲ تأیید هویت سلول های عصبی به روش ایمنوسیتوشیمی ٦٥
٤-۳ . ارزیابی بیان ژن فاکتور نروتروفیک NGF و NES ٦٥

فصل پنجم : بحث،نتیجه گیری و پیشنهادها

٥-۱ .کشت سلول های بنیادی رویانی ٧٦
٥-۲ . تشکیل اجسام شبه جنینی و تمایز خود به خودی ٧٧
٥-۳ . ارزیابی تمایز به فنوتیپ عصبی تحت اثر القایی اسید رتینوئیک ٧٨
٥-٤ .تمایز سلول های بنیادی رویانی به سلول های عصبی ٧٩
٥-٥ .پیشنهاد ها ٧٩
فهرست منابع ٨١

فهرست شکل‌ها

شکل ٤-١) تصویر مربوط به کشت سلولهای بنیادی رویانی موش در محیط کشت غیر تمایزی (در حضورLIF). ۶۷
شکل ۴-۲) تصویر مربوط به یک کلنی تمایز نیافته حاصل از کشت سلول‌های بنیادی رویانی CCE در محیط DMEM دارای LIF ۶۷
شکل ۴-۳) تصویر مربوط به کشت سلولهای فیبروبلاست جنینی موش(الف- دانسیته بالا و ب- دانسیته کم) ۶۸
شکل ۴-۴)تصویر مربوط به کشت سلولهای بنیادی رویانی موش (دودمان CCEبر روی لایه تغذیه کننده فیبروبلاست جنینی موشی غیر فعال شده با مایتومایسین) ۶۸
شکل۴-۵)تصویر مربوط به تشکیل اجسام شبه جنینی (Embryoid bodies) ۶۹
شکل۴-۶)تصویر مربوط به اجسام شبه جنینی(الف-یک روزه ب- دو روزه ج-چهار روزه) ۶۹
شکل۴-۷)تصاویر مربوط به میکروسکوپ فاز کنتراست واینورت سلولهای شبه عصبی مشاهده شده شده دو روز پس از کشت چسبنده اجسام شبه جنینی ۷۰
شکل ۴-۸)تصویر مربوط به ایمنو سیتوشیمی نشانگر نستین در سلولهای شبه عصبی مشاهده شده با میکروسکوپ فلورسانت ۷۱
شکل۴-۹) تصاویر مربوط به کشت چسبنده اجسام شبه جنینی وگسترش ومهاجرت سلولها به صورت شعاعی به اطراف ومشاهده مورفولوژی شبه عصبی آنها ۷۲
شکل۴-۱۰) تصویر مربوط به تریپسینه کردن سلولهای بنیادی جنینی موش بعد از گذشت پنج دقیقه ومشاهده مورفولوژی ۷۳
شکل ۴-۱۱) تصویر مربوط به الکتروفورز محصول RT-PCR ژنهای β2-m، Nes وNGF سلولهای بنیادی جنینی موش ۷۴

چکیده:

سلول‌های بنیادی رویانی، به طور تئوریک قادرند که تمام انواع سلول‌های یک ارگانیسم زنده را به وجـود آورند؛ در حالی که قادر به بازسازی خود بوده و ساختار ژنتیکی خود را به طور پایدار حفظ می‌کنند. این ویژگی‌هـای منحصر به فرد سلول‌های بنیادی رویانی را به ابزار مناسبی برای تحقیقات زیست پزشکی در زمینه‌هایی ماننـد کـاربرد درمانی برای بیماری‌های تحلیل برنده عصبی نظیر پارکینسون و آلزایمـر تبـدیل سـاخته اسـت. گـام نخـست، تمـایز سلول‌های بنیادی رویانی به سلول‌های عصبی است. در سال‌های اخیر، روش‌های آزمایـشگاهی توسـعه یافتـه‌انـد کـه اجازه تولید نورون از سلول‌های پرتوان[1] را در کشت فراهم می‌کند. سلول‌های بنیـادی رویـانی، سـلول‌هـای پرتـوانی هستند که از توده سلولی داخلی مرحله بلاستوسیست جنینی جدا می‌شوند. این سلول‌های پایـدار اگـر بـر روی لایـه تغذیه کننده یا در حضور LIF تکثیر یابند حالت تمایز نیافته خود را حفظ می‌نمایند. از آنجایی که سلول‌های بنیـادی رویانی قادر به تکثیر و تمایز هستند، امکان تولید تعداد زیادی سلول پیوندی را جهت پیوند عصبی فراهم می‌کنند.

اسید رتینوئیک یکی از مهم ترین مورفوژن هاست و توزیـع آن در مرحلـه جنینـی بـا تمـایز نـورون‌هـا و اختصاصیت مکانی آنها در سیستم عصبی مرکزی در حال تکوین مرتبط می‌باشـد. بـرای تمـایز آزمایـشگاهی در ایـن پژوهش، دودمان سلولی CCE برای تولید تجمعات سلولی (اجسام شبه جنینی) کشت داده شد. سپس این اجسام شبه جنینی در معرض غلظت 10^{-6} مولار اسید رتینوئیک قرار گرفت. در این پروتکل القـایی درصـد بـالایی از سـلول‌هـا (۸۰٪) به سلول‌های شبه عصبی تمایز پیدا کردند. این سلول ها، نشانگر سلول‌های نورواپی تلیالی یعنی نستین را بیان نمودند. همچنین نتایج نشان داد که اسید رتینوئیک می‌تواند بیان ژن NGF را در سلول‌های بنیادی رویـانی القـا کنـد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که اسید رتینوئیک به شدت تشکیل و اختصاصیت نورون‌هـا را در طـول تمـایز سـلول‌هـای بنیادی جنینی موش تنظیم می‌کند.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی جنینی – اجسام شبه جنینی – تمایز عصبی – اسید رتینوئیک– نستین.

1- Pluripotent

فصل اول

مقدمه

۱-۱. سلول‌های بنیادی رویانی:

سلول‌های بنیادی رویانی (سلول‌های ES[1])، دودمان سلولی تمام استعدادی[2] هستند که از جنین درمرحله پیش- لانه گزینی[3] در مرحله بلاستوسیست [۳۸و۹۲] و یا بر طبق گزارش‌های معدودی در مرحله دو سلولی [٦٤] هشت سلولی [۲۹]، مورولا [۳٦و۷٦] و اپی بلاست اولیه [۳۹] به دست می‌آیند. دودمان‌های اولیه از بلاستوسیست موش کوچک آزمایشگاهی جدا شدند [۳۸و۹۲]. از آن پس محققین موفق شده‌اند دودمان‌های دیگری از سایر گونه‌های حیوانات آزمایشگاهی تهیه نمایند. سلول‌های مذکور دارای دو ویژگی منحصر به فرد هستند [١٤]. نخست، چنانچه گفته شد تمام استعدادی بوده، قادرند به تمامی انواع سلول‌ها تمایز یابند و دوم، بدون هیچ گونه محدودیتی و بدون از دست دادن توانایی رشد و نمو، به طور نامتناهی تقسیم می‌شوند. به عبارت دقیق تر دارای قدرت تجدید خود به خودی[4] هستند [١٤]. بر طبق گزارشی، این سلول‌ها حتی پس از ۲۵۰ بار همانند سازی بدون اینکه متمایز شوند همچنان به تکثیر خود ادامه داده‌اند. وجود این دو ویژگی سبب شده است که سلول‌های ES ابزاری مناسب برای انجام تحقیقات وسیع در زمینه علوم پایه‌ای چون بیولوژی تکوینی و مولکولی و همچنین تولید موجودات ترانس ژنیک و انجام دستکاری‌های ژنتیکی فراهم آورد [٢٦].

به عنوان مثال، سلول‌های بنیادی موجود در سیستم عصبی مرکزی پس از تمایز، انواع سلول‌های عصبی وگلیا را به طور مستقیم و یا از طریق تولید پیش سازهای سلولی حد و اسط به وجود می‌آورند [۱۰۰].

1- Embryonic stem cells.
2- Totipotent cell line.
3- Preimplantaion embryo.
4- Self-renewing

تکوین پیچیده این سیستم درمانی در دوران جنینی و زندگی اولیه پس از تولد به وسیله فاکتورهای مختلف کنترل می‌شود ولی به دلیل مشکلاتی که در مطالعه جنین زنده وجود دارد تاکنون این سیگنال‌ها و مراحل تکوینی سیستم مذکور به خوبی شناسایی نشده است. جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی و مطالعه این سلول‌ها در محیط آزمایشگاه به دانش ما در تعیین مسیر تکوینی سیستم عصبی کمک شایانی کرده است. از طرف دیگر، تکثیر نا محدود سلول‌های ES در محیط کشت، منبع عظیمی از سلول‌های تمایز نیافته فراهم می‌کند که کاربردهای بالقوه درمانی بسیاری دارند. با تولید مقادیر زیادی جمعیت سلولی خالص مانند سلول عضله قلبی، سلول خونی و عصبی می‌توان از این سلول‌ها در پیوند درمانی استفاده نمود. به عنوان مثال در بیماری‌هایی از قبیل پارکینسون و آلزایمر که در نتیجه مرگ و یا ناکار آمد شدن تنها یک یا چند نوع سلول حاصل می‌شوند جایگزینی سلول‌های تخریب شده با سلول‌های عصبی - که در محیط کشت به دست آمده اند- می‌تواند راه مناسبی برای درمان این بیماری‌ها باشد. سلول‌های ES در محیط کشت در حضور LIF [1] و یا در صورت کشت برروی لایه تغذیه کننده قادرند بدون این که دچار تمایز شوند تا چندین نسل تکثیر شده، دودمان سلولی ES را تولید نمایند [۱]. وجود LIF در محیط کشت این سلول‌ها برای حفظ دو ویژگی منحصر به فرد آنها ضروری است. در واقع ماده اصلی مهار کننده تمایز که موجب حفظ فنوتیپ این سلول‌ها می‌شود LIF است. اگر سلولی قادر به ترشح این فاکتور باشد احتمالاً می‌توان از آن به عنوان لایه تغذیه کننده در کشت سلول‌های ES استفاده نمود. با استفاده از روش‌های مختلف، تولید و ترشح سایتوکاین LIF توسط فیبروبلاست جنین موش [2] نشان داده شده است. با توجه به این نکته، در پژوهش حاضر از این سلول‌ها جهت کشت سلول‌های بنیادی رویانی علاوه بر LIF استفاده شد.

برای شناسایی سلول‌های ES معیارهای متفاوتی وجود دارد که عبارتنداز: بررسی مورفولوژی سلول‌های ES و کلنی‌های حاصل از آنها، وجود نشانگرهای سلولی ویژه مثل آنزیم آلکالین فسفاتاز، تلومراز، فاکتورهای کپی برداری، آنتی ژن‌های ویژه مانند انواع TRA، SSEA [3] GCTM، وبررسی قدرت تمایز این سلول‌ها در محیط کشت (که به سه روش امکان پذیر است:

1- Leukemia inhibitory factor.
2- Mouse Embryonic fibrobelast.
3- Stage-specific embryonic antigen.

کشت معلق[1]، حذف LIF، افزودن ماده القا کننده به محیط کشت) و بالاخره قابلیت تمایز سلول‌های ES در بدن موجود زنده که از طریق توانایی تومورزایی و هم چنین تولید موجود کایمرا مورد بررسی قرار می‌گیرد.

۱-۲- تمایز دودمان سلول بنیادی رویانی به سلول‌های عصبی

در صورت حذف عوامل ممانعت کننده تمایز (LIF و یا لایه تغذیه کننده) از محیط کشت، سلول‌های ES با یکدیگر تجمع پیدا کرده، اجسام کروی شبه جنینی (EBs)[2] را ایجاد می‌کنند. سلول‌های موجود درEB مراحل تمایزی را آغاز می‌کنند بنابراین در هرEB می‌توان سلول‌های هر سه لایه جنینی را ردیابی نمود که پس از تمایز به سلول‌های بافت‌های مختلف تبدیل می‌شوند. با استفاده از روش‌های مختلف از جمله استفاده از مواد القا کننده می‌توان مسیر تمایز سلول‌ها را به سمت خاصی هدایت نموده، درصد بالایی از فنوتیپ سلولی مورد نظر مثلاً فنوتیپ عصبی را به دست آورد. از جمله مواد القا کننده فنوتیپ عصبی می‌توان اسید رتینوئیک، DMSO[3]،FGF8،SHH[4] را می‌توان نام برد [۷۸].

از آنجا که اسید رتینوئیک رایج ترین و مهم ترین فاکتور القاء کننده عصبی می‌باشد در این پژوهش از این ماده به عنوان القا کننده عصبی استفاده شد. علاوه بر بررسی فنوتیپ سلول‌های عصبی حاصل از اثر القایی اسید رتینوئیک بر روی دودمان سلول (نوعی دودمان سلول بنیادی رویانی) تأثیر این ماده بر بیان ژن‌های نستین وNGF مورد ارزیابی قرار گرفت.

برای تأیید هویت سلول‌های عصبی حاصل از سلول‌های ES در in vitro از روش‌هایی مثل بررسی مورفولوژی، ایمنوسیتوشیمی، RT-PCR، الکترو فیزیولوژی و .... می‌توان استفاده نمود. در این پژوهش بیان نشانگر نستین (نوعی فیلامان حد واسط ویژه سلول‌های نورواپی تلیالی) به روش ایمنوسیتوشیمی بررسی شد. هم چنین نوروتروفین NGF[5] با استفاده از روش RT-PCR ردیابی شد. خانواده تروفین‌ها شاملNT-6،NT4/5،NT3،NGF،BDNF است [۳۵]. وجود چنین فاکتورهایی

1- Suspention Culture.
2- Embryoid body.
3- Dimethyl sulfoxid.
4- Sonic hedgehog.
5- Nerve growth factor.

برای بقاء، تمایز و عملکرد طبیعی نورون بالغ ضروری است. نوروتروفین‌ها اثرات عمیقی برسیستم عصبی مرکزی و محیطی دارند و موجبات بقاء و تمایز سلولی را در سیستم عصبی در حال تکوین فراهم می‌کند [۲].

فصل دوم

مروری بر مطالعات انجام شده

۲-۱. دودمان‌های سلول بنیادی:

دودمان‌های سلولی بنیادی[۱] که پایدار[۲]، نامیرا[۳] و پرتوان[۴] هستند ابزار قدرتمند و مفیدی برای مطالعه مراحل تکوین در محیط آزمایشگاه به وجود آورده‌اند [۲۶]. این سلول‌ها کاربردهای درمانی گسترده‌ای داشته، منبع نامحدودی از سلول برای استفاده در پیوند و ترمیم بافت فراهم می‌کنند [۲۶].

انواع سلول‌های بنیادی را می‌توان به ترتیب زیر دسته بندی نمود:

- سلول‌های بنیادی بالغ.
- سلول‌های بنیادی جنینی.
- سلول‌های زایانی جنینی.
- سلول‌های کارسینو مای جنینی.
- سلول‌های بنیادی رویانی.

۲-۱-۱. سلول‌های بنیادی بالغ[۵] یا سلول‌های بنیادی سوماتیک(SSCs)[۶]

این سلول‌ها در بافت‌های مختلف از جمله مغز استخوان، بافت عصبی، بافت چربی، پوست و کبد وجود داشته، دارای دو ویژگی تجدید خود به خودی[۷] و قدرت تمایز هستند.

پیش از این تصور می‌شد که این سلول‌ها تک استعدادی[۸] و یا چند استعدادی[۹] هستند؛ در

1- Stem cell lines.
2- Established.
3- Immortal.
4- Pluripotent.
5- Adult stem-cells.
6- Somatic stem cells.
7- Self-renewing.
8- Monopotent.
9- Multipotent.

حالی که تحقیقات نشان داده است که سلول‌های مذکور نـه تنهـا پـر اسـتعدادی هـستند [٥٦]، بلکـه قابلیت گذر از مرزهای تمایز[1] را دارند: بدین معنی که می‌تواننـد بـه انـواع سـلول‌هـای دیگـر غیـر از سلول‌های بافت مربوط به خودشان تمایز پیدا کنند. به عنوان مثـال سـلول‌هـا بنیـادی مغـز اسـتخوان قادرند به سلول عضله اسکلتی، میکرو گلیا، آستروگلیا و سلول کبـدی تمـایز یابنـد [٥٦]. هـم چنـین سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل از بافت چربی می‌توانند به سلول عضله قلبی تمـایز یافتـه، بـرای ترمیم این بافت مورد استفاده قرار گیرند. مشخص شده اسـت کـه در سیـستم عـصبی مرکـزی بـالغ، نوسازی رخ می‌دهد. این امر نشانگر وجود سلول‌های بنیادی عصبی(NSCs)[2] در ایـن سیـستم اسـت [٤٦]. غنی ترین محل ذخیره چنین سلول‌هایی در مغز، ناحیه زیر بطنی مغز قدامی است [٤٦].

۲-۱-۲. سلول‌های بنیادی جنینی(FSCs)[3]

این سلول‌ها نیز سلول‌های پر استعدادی هستند که در بافت‌هـای مختلـف جنـین از جملـه بافت عصبی [۸۸ و ۲۵] عضله قلبی [٦٥] و اپیدرم [۳۰] وجود دارند. از سلول‌های پیش ساز موجـود در عضله قلبی جنین در ترمیم عضله قلبی بالغ و از سلول‌های عصبی جنین برای ترمیم بافت عـصبی [۲۵] و درمان اختلالات عصبی می‌توان استفاده نمود. هم چنین سلول‌های بنیادی خـون سـاز جنینـی قابلیت تمایز به سلول‌های بنیادی عصبی و سپس تمایز به آستروسیت را دارند [٥٥].

۲-۱-۳. سلول‌های زایای جنینی (EG Cells)[4]

سلول‌های تمایز نیافته‌ای هستند که از سلول‌های زایای بـدوی (PGCs)[5] موجـود در گنـاد جنین بدست می‌آیند. این سلول‌ها پر استعداد بوده، ویژگیهایی مشابه با سلول‌های ES دارند. از جمله اینکه فعالیت آلکالین فسفاتازی بالایی نشان می‌دهند. از دیگر ویژگیهای مهم این سـلول‌هـا مـی‌تـوان توانایی رشد و تکثیر آنها به صورت کلنی‌های چند سلولی، دارا بودن کاریوتایپ ثابت و طبیعی و هـم چنین قدرت تمایز به سلول‌های هرسه لایه زایای جنینی را نام برد.

1- Trans differentiate = to cross lineage boundaries.
2- Neural stem cells.
3- Fetal stem cells.
4- Embryonic germ cells.
5- Primordial germ cells.

۲-۱-٤. سلول‌های کارسینو مای جنینی (EC Cells)[1]

هنگامی که جنین یک تا هفت و نیم روزه موش به ناحیه‌ای در خارج از رحم میزبان پیوند زده شود تو موری ایجاد می‌شود به نام تراتو کارسینوما. سلول‌های تمایز نیافته جدا شده از این تومور را سلو لهای کارسینومای جنینی گویند [۹۲ و ۹۱].

۲-۱-۵. سلول‌های بنیادی رویانی (ES Cells) [2]

بنا بر تعریف سلول‌های بنیادی رویانی، دودمان سلولی پر استعدادی هستند که به طور معمول از جنین پیش لانه گزینی[3] در مرحله بلاستوسیست به دست می‌آیند [۹۲ و ۳۸]. البته برخی محققین، این سلول‌ها را به عنوان سلول‌های چند استعدادی و یا حتی تمام استعدادی[4] [١٤ و ۳۳] نیز در نظر گرفته‌اند. تاکنون محققین موفق شده‌اند سلول‌های ES را از توده داخلی بلاستوسیست بسیاری از گونه‌ها 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 وحوش لانه گزینی[5] باشد. البته استفاده از بلاستوسیست در جداسازی ES دارای مزایایی است ولی ضروری نیست. تا سال ۱۹۸۱ تلاش‌ها برای به دست آوردن سلول‌های پر استعدادی به طور مستقیم از جنین موش ناموفق بود [۳۸]. در همین سال ایوان وکافمن توانستند سلول‌های مذکور را به دست آورند.

سه نوع اخیر یعنی ES،EC،EG، علی رغم شباهت‌های بسیار، حتی در یک گونه هم تا حدودی از نظر مورفولوژی، بیان نشانگرهای سطحی و نیازهای غذایی در محیط کشت با یکدیگر متفاوتند [٢٦]. از نظر کروموزومی سلول‌های EG و ES دیپلوئید [٢٦] وEC آنیو پلوئید هستند [٢٦ و ۳۸]. بنابراین سلول هایEC احتمالاً مدل مناسبی برای بررسی مراحل رشد و نمو طبیعی نیستند [٢٦]. سلول‌های ES،EG در چندین ویژگی مورفولوژیکی از جمله میزان زیاد آلکالین فسفاتاز درون سلولی، حضور گلیکولیپیدها و گلیکو پروتئین‌های ویژه سطح سلول مشترک هستند.

1- Embryonic carcinoma cells.
2- Embryonic stem cells.
3- Pre implantation embryo.
4- Totipotent.
5- Implantation ally-delaye-blastocysts.

۲-۲. ویژگی‌های سلول بنیادی رویانی

سلول ES دارای دو ویژگی منحصر به فرد است: در حضور LIF به طور نامحدود و بدون از دست دادن پتانسیل رشد و نمو خود تکثیر می‌شود، هم چنین تمام استعدادی بود، پس از تمایز قادر است به سلول‌های مختلف تبدیل شود [۱٤]. برای اثبات وجود این دو ویژگی کلی در سلول‌های ES محققین از معیارهایی استفاده می‌کنند که به شرح زیر می‌باشد.

۲-۲-۱. تشکیل کلنی در محیط کشت:

سلول‌های ES پس از تکثیر در محیط کشت، کلنی‌های متراکم چند سلولی تشکیل می‌دهند. پس از برداشت و تریپسینه کردن توده سلولی داخلی، این سلول‌ها دیگر قادر به تشکیل بافت‌های منسجم شبیه طرح بدن نیستند چرا که حافظه[1] خود را برای تشکیل محور از دست داده، به صورت کلنی‌هایی رشد می‌کنند. کلنی‌های حاصله از نظر فنوتیپ دارای اختلافات جزئی با یکدیگر هستند. این اختلافات ظاهراً به نوع سیستم کشت مورد استفاده مربوط می‌شود. کلنی سلول‌های ES کشت شده بر روی فیبروبلاست تخم مرغی شکل بوده محور بلند آن با محور طولی سلول‌های تغذیه کننده موازی است، کشت سلول‌های ES برروی دودمان STO- که سلول‌های آن در در همه جهات گسترده می‌شوند - کلنی‌های گرد به وجود می‌آورد و بالاخره کلنی‌های حاصل از کشت سلول‌های ES در محیط کشت‌های ثانویه شکل نامنظم و فشردگی کمتری دارند . در اغلب کلنی ها، سلول‌ها متراکم و به هم فشرده با محدوده نا مشخص هستند. ولی برخی کلنی‌ها تخت تر و دارای سلول‌هایی با تراکم کمتر هستند .

۲-۲-۲. مشخصات سلولی:

سلو ل‌های ES که تا کنون از گونه‌های مختلف جداسازی شده‌اند از نظر مورفولوژی سلولی دارای ویژگی‌های مشترکی هستند. اینها سلول‌هایی کوچک گرد یا چند وجهی، دارای

1- memory