٧٠٨٧٣

دانشگاه تهران
پردیس علوم
دانشکده زیست شناسی

بررسی بیان پروتئینهای شوک حرارتی ضمن تمایز سلولهای بنیادی کارسینومایی جنینی موش (P19) به سلولهای عصبی

نگارش:
الهه افضل

استاتید راهنما:
دکتر سید محمود عرب نجفی
دکترحسین بهاروند

استاد مشاور:
دکتر مرضیه ابراهیمی

۱۳۸۷ /۲/ ۱۱۹

پایان نامه کارشناسی ارشد برای دریافت درجه کارشناسی ارشد
در رشته زیست شناسی سلولی و مولکولی

مهر ۱۳۸۶

۷۰۸۷۲

بسمه تعالی

تعهد نامه اصالت اثر

اینجانب الهه افضل متعهد می شوم که مطالب مندرج در این پایان نامه حاصل کار پژوهشی اینجانب است و به دستاوردهای پژوهشی دیگران که در این پژوهش از آنها استفاده شده است، مطابق مقررات ارجاع و در فهرست منابع و مآخذ ذکر گردیده است. این پایان نامه قبلا برای احراز هیچ مدرک هم سطح یا بالاتر ارائه نشده است. در صورت اثبات تخلف (در هر زمان) مدرک تحصیلی صادر شده توسط دانشگاه از اعتبار ساقط خواهد شد.

کلیه حقوق مادی و معنوی این اثر متعلق به دانشگاه تهران - پردیس علوم - دانشکده زیست شناسی می باشد.

نام و نام خانوادگی دانشجو

الهه افضل

امضاء

۱۳۸۷ /۲/ ۱۱

تقدیم به عزیزانم:

پدر و مادر مهربانم که همواره پشتیبانم بودند و مسیر رشد و ترقی را برایم هموار ساختند.

به همسرم که در کنار او بودن انگیزهٔ تلاش و حرکت را در من دو چندان کرده است.

و به خواهرم منصوره و برادرم امیر که همواره مشوقم بودند.

و با بزرگداشت یاد

شهید دکتر چمران که این سخن او همواره در ذهنم خواهد ماند:

خدایا من علم را از آن جهت می خواهم که مبادا دشمنان تو از این طریق بر من برتری یابند.

چکیده

پروتئینهای شوک حرارتی مثل HSP۶۰, HSP۷۰, HSP۹۰ و HSP۲۵ به طور پیوسته در سلولها بیان می شوند و به عنوان چپرونهای مولکولی دارای عملکردی اساسی و ضروری در چرخه حیات پروتئینها هستند. بیانHSPها دقیقاً به مراحل حساس و مهم تکثیر و تمایز اولیه جنین وابسته است. بر این اساس، مطالعه حاضر به بررسی چگونگی بیان این پروتئینها ضمن تمایز سلولهای عصبی پرداخته است. علاوه بر این، با استفاده از شوک حرارتی، اثر القاء بیان HSPها بر تمایز عصبی نیز مورد بررسی قرار گرفته است. بدین منظور از سلولهای بنیادی کارسینومای موشی (P۱۹) به عنوان مدل مناسبی از سلولهای بنیادی جنینی استفاده شد. سلولهای P۱۹ در حضور رتینوئیک اسید (RA) با غلظت ۱μM به صورت سوسپانسیون در ظروف نچسب کشت داده شدند. تحت این شرایط، سلولها اجتماعات کروی شکلی ایجاد کردند که به آنها جسم شبه جنینی (Embryoid Body, EB) گفته می شود. جهت تکمیل تمایز عصبی، EBهای ۶ روزه به مدت ۴ روز به ظروف کشت بافت حاوی محیط ویژهٔ تمایز عصبی منتقل شدند. پس از مطالعهٔ بیان پروتئینهای شوک حرارتی در سلولهای P۱۹، چگونگی بیان این پروتئینها در اثر تیمار با RA و ضمن فرایند تمایز عصبی مورد بررسی قرار گرفت. درگام بعدی با تغییر بیان این پروتئینها در سلولهای P۱۹ و EBهای ۶ روزه با استفاده از شوک حرارتی (دمای ۴۲°C به مدت ۳۰ دقیقه)، اثر القاء بیان HSPها بر بیان شاخص سلولهای پیش ساز عصبی (نستین) و شاخص سلولهای عصبی بالغ (β-Tubulin III) مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت بررسی بیان این پروتئینها از فلوسایتومتری ، ایمنوبلات و ایمنوسیتوشیمی استفاده شد. بر اساس نتایج حاصله، دو پروتئین HSC۷۰ و HSP۶۰ به ترتیب در ۹۸/۱۰±۲/۶۸ و ۹۴/۶۵±۲/۹ درصد از جمعیت سلولهای P۱۹ بیان می شوند. ولی میزان بیان HSP۹۰ بسیار پایین (۱/۲۵±۰/۲۱) است و در شرایط طبیعی HSP۷۰ و HSP۲۵ در سلولهای P۱۹ بیان نمی شوند. نتایج ایمنوبلات در گروهی از سلولهای P۱۹ که تحت تیمار با RA به سمت تمایز عصبی القاء شدند افزایش بیان HSP۹۰ و کاهش بیان HSP۶۰ و HSC۷۰ را در سلولهای بالغ عصبی نشان داد؛ ولی اثری از بیان HSP۲۵ طی روند تمایز دیده نشد. مقایسه نتایج فلوسایتومتری نشان داد که گروههایی که تحت تیمار با RA بودند نسبت به سایر گروهها، نستین و β-Tubulin III را به طور معنی داری بیشتر بیان می کنند. این امر بیانگر نقش این مولکول در هدایت سلولهای P۱۹ به سمت تمایز عصبی است. ارزیابی اثر القاء بیان HSPها بر تمایز عصبی نشان داد که شوک حرارتی ۱۲ ساعت قبل از آغاز تمایز با RA تأثیری بر بیان مارکر سلولهای پیش ساز عصبی نستین و مارکرعصبی β-Tubulin III ندارد. ولی شوک حرارتی بعد از تیمار با RA و در مرحله EB باعث افزایش بیان مارکر عصبی β-Tubulin III می شود.

واژه های کلیدی: پروتئینهای شوک حرارتی، تمایز عصبی، سلولهای بنیادی کارسینومای جنینی

با سپاسگزاری از ...

استاد ارجمندم جناب آقای دکتر بهاروند که راهنمایی این پایان نامه را بر عهده گرفتند.
همچنین استاد ارجمندم جناب آقای دکتر عرب نجفی که در طی انجام ایـن تحقیـق از هیچگونـه مساعدت و راهنمایی دریغ نکردند.
استاد عزیزم سرکار خانم دکتر ابراهیمی که در تمام مراحل انجام این پروژه حمـایتگرم بودنـد و بـا صبر و بردباری مرا مساعدت و راهنمایی نمودند.

جناب آقای تقی آبادی، سرکار خانم حاتمی، خانم حیات، خانم طایی، خانم شاهسونی، خانم حبیبی، آقای معصومی، خانم دکتر احمدیان، خانم کرمعلی، خانم برکتی، خانم فقیهـی، خـانم دکتـر نوجـه دهیان، آقای مقدس علی و دوست عزیزم خانم براتیه و ...

و کلیهٔ پرسنل مؤسسه رویان که در طی مدت حضورم در این مؤسسه یاریم دادند.

—

کلیه هزینه های مصرفی و غیر مصرفی این پا یا ن نامـه بـر مبنـای قـرارداد شـماره ۸۴/۲۱۴۰۵ مورخ ۸۴/۱۲/۱۰ از بودجه تحقیقیاتی پژوهشکده رویان تامین گردیده است.

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه ۱

۱-۱. مبانی سلولهای بنیادی ۲

۱-۲. سلولهای بنیادی جنینی ۳

۱-۳. سلولهای بنیادی بزرگسالان ۴

۱-۴. سلولهای بنیادی کارسینومای جنینی ۵

۱-۴-۱. تراتوما و تراتوکارسینوما ۶

۱-۴-۲. منشاء سلول P۱۹ ۷

۱-۴-۳. سلولهای بنیادی جنینی و سلولهای کارسینومای جنینی: دو روی یک سکه ۸

۱-۵ . تمایز سلولهای EC به سلولهای عصبی ۱۰

۱-۵-۱. تشکیل خود به خود دودمانهای عصبی از سلولهای EC ۱۰

۱-۵-۲. تولید دودمانهای عصبی از سلولهای EC از طریق القاء شیمیایی ۱۱

۱-۶ . نقش پروتئینهای شوک حرارتی در تمایز سلولهای عصبی ۱۲

۱-۶-۱. پروتئینهای شوک حرارتی — ۱۲

۱-۶-۲. تنظیم بیان پروتئینهای شوک حرارتی ۱۴

۱-۶-۳. نقش پروتئینهای شوک حرارتی در تکوین سیستم عصبی ۱۶

۱-۶-۳-۱. HSP۹۰ ۱۸

۱-۶-۳-۲. HSP۷۰ ۲۰

۱-۶-۳-۳. HSP۶۰ ۲۱

۱-۶-۳-۴. HSP۲۵ ۲۱

۱-۷. هدف از انجام این پژوهش ۲۳

فصل دوم: مواد و روشها ۲۵

جدول ۱-۲. تجهیزات و وسایل مورد استفاده ۲۶

جدول ۲-۲. مواد مورد استفاده ۲۸

۲-۱. محلولهای مورد استفاده برای کشت و تمایز سلولهای P۱۹ ۳۲

۲-۱-۱. PBS ۳۲

۲-۱-۲. محیط کشت DMEM ۳۲

۲-۱-۳. محیط کشت کامل برای کشت وتکثیر سلولهای P۱۹ ۳۳

۲-۲. روش نگهداری سلولهای P۱۹ در آزمایشگاه ۳۳

۲-۲-۱. تکثیر سلولهای P۱۹ ۳۳
۲-۲-۲. ذوب سلولهای P۱۹ ۳۴
۲-۳-۳. انجماد سلولهای P۱۹ ۳۴
۲-۳. تشکیل اجسام شبه جنینی (EB) و القاء عصبی ۳۵
۲-۴. بلوغ سلولهای پیش ساز عصبی ۳۵
۲-۵ . روند آزمایش و معرفی گروهها ۳۶
۲-۶ . شوک حرارتی ۳۸
۲-۶-۱. ایجاد شوک حرارتی در سلولهای P۱۹ ۳۸
۲-۶-۲. ایجاد شوک حرارتی در EB های ۶ روزه ۳۹
۲-۷. ایمنو سیتوشیمی ۳۹
۲-۷-۱. محلولهای مورد استفاده ۳۹
۲-۷-۲. روش کار ۴۱
۲-۸ . فلوسایتومتری ۴۲
۲-۸-۱. مواد و محلولهای مورد استفاده ۴۳
۲-۸-۲. روش کار ۴۳
۲-۹. مطالعه میزان بیان پروتئینها به صورت نیمه کمی ۴۵
۲-۹-۱. جمع آوری نمونه ۴۵
۲-۹-۲. لیز کردن سلولها ۴۶
۲-۹-۳. روش برادفورد برای تعیین غلظت پروتئین ها ۴۷
۲-۹-۳-۱. محلولهای مورد استفاده ۴۷
۲-۹-۳-۲. روش کار ۴۸
۲-۹-۴ . SDS-PAGE ۴۹
۲-۹-۴-۱. بافرها و محلولهای مورد استفاده ۴۹
۲-۹-۴-۲. طرز تهیه ژل ۵۰
۲-۹-۴-۳. آماده سازی نمونه های پروتئینی برای الکتروفورز ۵۱
۲-۹-۴-۴. الکتروفورز ۵۲
۲-۹-۵ . وسترن بلات ۵۳
۲-۹-۵-۱. محلولها و مواد مورد استفاده ۵۳
۲-۹-۵-۲. روش کار ۵۴

۲-۹-۶. ایمنو بلات ۵۵
۲-۹-۶-۱. محلولها و مواد مورد استفاده ۵۶
۲-۹-۶-۲. روش کار ۵۶
۲-۹-۷. تشخیص آنزیمی به روش لومینسانس (ECL) ۵۷
۲-۹-۷-۱. مواد ومحلولهای مورد استفاده ۵۸
۲-۹-۷-۲. روش کار ۵۸
۲-۱۰. آنالیز آماری ۵۹
فصل سوم: نتایج ۶۱
۳-۱. معرفی گروهها ۶۲
۳-۲. بررسی مورفولوژی و فنوتیپ سلولهای P۱۹ کشت شده ۶۴
۳-۳. چگونگی بیان پروتئینهای شوک حرارتی در سلولهای P۱۹ ۶۵
۳-۴. بررسی بیان پروتئینهای شوک حرارتی ضمن فرایند تمایز عصبی ۶۹
۳-۵. بررسی بیان HSPها پس از القاء شوک حرارتی در سلولهای P۱۹ و EBهای ۶ روز ۷۹
۳-۶. بررسی اثر شوک حرارتی در تمایز سلولهای P۱۹ به سلولهای عصبی ۸۶
فصل چهارم: بحث ۹۰
۴-۱. کشت وتمایز سلولهای P۱۹ ۹۱
۴-۲. بررسی بیان پروتئینهای شوک حرارتی در سلولهای P۱۹ ۹۲
۴-۳. بررسی بیان پروتئینهای شوک حرارتی ضمن فرایند تمایز عصبی ۹۳
۴-۴. بررسی بیان HSPها پس از القاء شوک حرارتی در سلولهای P۱۹ و EBهای ۶ روزه ۹۶
۴-۵. بررسی اثر شوک حرارتی در تمایز سلولهای P۱۹ به سلولهای عصبی ۹۸
۴-۶. نتیجه گیری ۹۹
۴-۷. پیشنهادات ۱۰۰
فصل پنجم: منابع ۱۰۱
چکیده انگلیسی ۱۰۸
عنوان انگلیسی ۱۰۹

فصل اول

مقدمه

۱-۱. مبانی سلولهای بنیادی

جنین در مراحل اولیه تکامل خود به صورت موقتی و گذرا حاوی جمعیتی از سلولهای پرتوان[۱] است که عامل تولید انواع مختلف سلولها و بافتهای بدن در دوارن جنینی و حتی پس از تولد هستند. به این سلولها، سلولهای بنیادی[۲] گفته می شود. امروزه سلولهای بنیادی از زمینه های جذاب زیست شناسی محسوب می شوند. تحقیق روی سلولهای بنیادی به پیشبرد دانش ما در زمینه چگونگی تکوین جاندار کامل از یک سلول منفرد یا چگونگی جایگزینی سلولهای آسیب دیده توسط سلولهای سالم در جاندار بالغ کمک می کند. به علاوه این سلولها نوید بخش روشهای نوین درمان مبتنی بر سلول درمانی هستند (۱). سلولهای بنیادی دارای چند ویزگی مهم نسبت به سایر سلولها هستند:

۱. قدرت تکثیر بالایی دارند.

۲. دارای قدرت خودنوزایی[۳] هستند.

۳. قادر به تولید انواع سلولهای تمایز یافته در محیط آزمایشگاه هستند.

به همین دلیل از این سلولها در تحقیقات جدید مانند تولید و تمایز رده های ویژه سلولی و پیوند به بدن به عنوان سلول درمانی و نیز در تولید حیوانات ترنس ژنیک استفاده می شود. دانشمندان تصور می کنند که در آینده این سلولها مبنای درمان بسیاری از بیماریهای عصبی، قلبی و دیابت خواهند بود (۲).

به طور کلی سلولهای بنیادی دارای دو منشاء جنینی[۴] و بزرگسال[۵] هستند. سلولهای بنیادی جنینی[۶] (ES) از توده سلول داخلی[۷] (ICM) جنین در مرحله بلاستوسیست بدست می آیند (شکل ۱-۱). دسته دیگر سلولهای بنیادی بزرگسال هستند که در بسیاری از بافتهای تخصص یافته بدن مثل مغز،

---

[۱] Pluripotent
[۲] Stem cell
[۳] Self Renwal
[۴] Embryonic
[۵] Adult
[۶] Embryonic Stem Cell
[۷] Inner Cell Mass

مغز استخوان، کبد، پوست، لوله گوارش، قرنیه و شبکیه چشم و حتی پالپ عاج دندان یافت می شوند (۳).

۱-۲. سلولهای بنیادی جنینی

سلولهای بنیادی جنینی از جنین در مرحله بلاستو سیست بدست می آیند (۴). بلاستوسیست مرحله ای از تکوین جنین پیش از لانه گزینی است که شامل ۳ بخش است:

۱. تروفو بلاست: لایه ای از سلولها که بلاستوسیست را احاطه می کنند.

۲. بلاستوسل: حفره تو خالی درون بلاستوسیست را گویند.

۳. توده سلول داخلی که شامل حدود ۳۰ سلول است و در یک انتهای بلاستو سیست قرار دارد.

ویژگیهای خاص این سلولها عبارتند از (۵):

۱. از توده سلولی داخلی مشتق شده اند.

۲. دارای توان تقسیم متقارن نامحدود و بدون تمایز هستند.

۳. کاریوتایپ آنها دیپلوئید و طبیعی است.

۴. پرتوان هستند و توانایی تبدیل شدن به انواع سلولهای هر ۳ لایه جنینی (اکتودرم، مزودرم ، آندودرم) را دارند.

۵. قابلیت ادغام شدن با انواع بافتهای جنین در حال تکوین را دارند و تولید کایمر می کنند.

۶. قابلیت نفوذ در دودمان سلولهای زاینده و تبدیل شدن به اسپرم و تخمک را دارند.

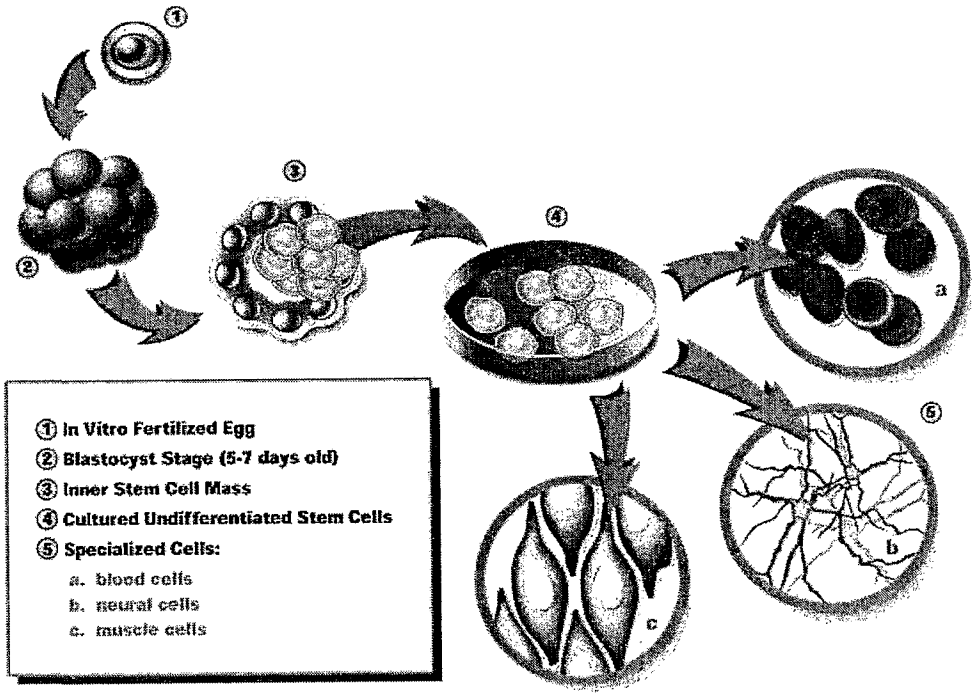
۷. قدرت کلون زایی دارند (یعنی یک سلول بنیادی جنینی می تواند یک کلونی از سلولهایی تولید کند که از نظر ژنتیکی یکسان ومعادل سلول اولیه هستند.)

۸. عامل رونویسیOCT۴ را بیان می کنند. این عامل باعث حفظ سلولهای بنیادی در حالت تکثیر و ممانعت از تمایز آنها می شود.

۹. می توان آنها را القاء کرد تا تمایز یابند و یا به تکثیر خود ادامه دهند.

۱۰. فاقد نقطه کنترل G۱ در چرخه سلولی هستند. این سلولها غالباً در مرحله S قرار دارند و برخلاف سلولهای بدنی تمایز یافته نیازی به محرک خارجی برای آغاز همانندسازی DNA ندارند.

۱۱. پدیده جسم بار[۸] در این سلولها رخ نمی دهد.



شکل ۱-۱. تولید سلولهای بنیادی و تمایز آن به رده های مختلف سلولی. (۴)

۱-۳. سلولهای بنیادی بزرگسالان

سلولهای بنیادی بزرگسالان، سلولهای تمایز نیافته ای هستند که در بافتهای تمایز یافته بدن دیده می شوند. این سلولها تکثیر می یابند و می توانند به انواع سلولهای بافتی که از آن منشاء گرفته

[۸] Bar Body

اند تمایز یابند. بیشترین اطلاعات در رابطه با این سلولها از سلولهای خونساز مغز استخوان[۹] بدست آمده است (۳).

۱-۴. سلولهای بنیادی کارسینومای جنینی

شناخت سلولهای بنیادی جنینی بر شالوده ای از تحقیقات فراوانی قرار دارد که از دهه ۱۹۵۰ در مورد تراتوکارسینوما[۱۰] آغاز شد. از مدتها پیش عقیده پاتولوژیست ها براین بود که فرایند تشکیل تراتوکارسینوما از جنبه های فراوانی مشابه فرایند تکوین جنین است و سلولهای پرتوانی که در این گونه از تومورها دیده می شوند، مشابه سلولهای بنیادی تمایز نیافته اولیه جنینی هستند (۶). مطالعهٔ این نوع تومورها به علت نادر بودن آنها در انسان، با محدودیت مواجه بود؛ تا اینکه در سال ۱۹۵۴ محققین متوجه شدند که بیضه ٪۱ از موشهای نژاد ۱۲۹ مستعد تشکیل تراتوما است و می توان از پیوند تیغه جنسی جنین این گونه و بعضی گونه های دیگر به بیضه موشهای بالغ نیز، تشکیل این تومورها را القاء کرد. تراتوماهای بدخیمی که قابلیت پیوند به میزبان دیگر را دارا بودند « تراتوکارسینوما» نامیدند(۷). این دسته از تومورها حاوی سلولهایی به نام سلولهای کارسینومای جنینی (EC)[۱۱] هستند که از پیش به عنوان سلولهای بنیادی این دسته از تومورها شناخته شده بودند. ویژگی بنیادی بودن این سلولها از آنجا به اثبات رسید که مشاهده شد انتقال تنها یک سلول EC به میزبان جدید، در آن حیوان تراتوکارسینومای پیچیده ای ایجاد می کند، که دارای قابلیت پیوند به میزبان دوم نیز، هست (۸). مجموعه ای از مطالعات انجام شده روی سلولهای بنیادی کارسینومای جنینی (EC) از دهه ۱۹۶۰ تا دهه ۱۹۷۰، منجر به کشف و تولید سلولهای بنیادی جنینی موشی[۱۲] (mES)در سال ۱۹۸۱ و سلولهای بنیادی جنینی انسانی[۱۳] (hES) در سال ۱۹۹۸ شد.

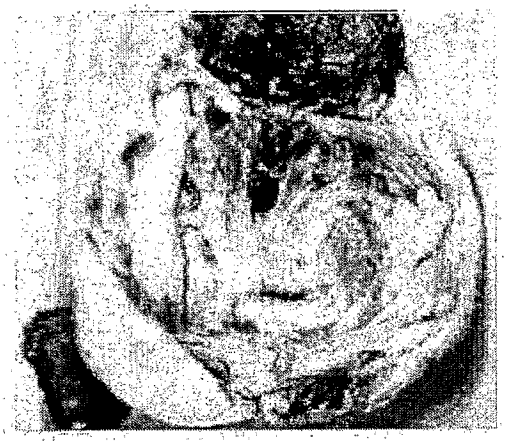
---

[۹] Hematopoietic Stem Cell
[۱۰] Teratocarcinoma
[۱۱] Embryonal Teratocarcinoma
[۱۲] Mouse Embryonic Stem Cell
[۱۳] Human Embryonic Stem Cell

در ادامه به طور خلاصه تحقیقات انجام شده بر روی تراتوکارسینوما و منشا سلولهای کارسینومای جنینی ذکر خواهد شد. سپس در مورد خصوصیات این نوع سلولها، شباهتها و تفاوتهای آنها با سلولهای بنیادی جنینی صحبت خواهیم کرد.

۱-۴-۱. تراتوما و تراتوکارسینوما

تراتوما نوعی تومور خوش خیم است که غالباً در تخمدان دیده می شود و به آن کیست درموئید تخمدانی نیز گفته می شود. اووسیت درون تخمدان به صورت پارتنوژنیک فعال شده و تکوین می یابد. سپس نظم آن به هم ریخته و تشکیل تراتوما می دهد. مجموعه ای از بافتهای مختلف جنینی در تراتوما مشاهده می شود (شکل۱-۲).



شکل۱-۲. تراتومای تخمدان انسان. انواع مختلف بافتهای سازمان یافته در این تومورها دیده می شوند.توده های مو و دندان در اینگونه ازتومورها بسیار رایج هستند. (۹)

تومورهای مشابهی در بیضه تشکیل می شوند که بسیار بدخیم هستند و به آنها« تراتوکارسینوما» می گویند. این نوع تومور که جزء سرطانهای مربوط به سلولهای جنسی [۱۴](GCT) محسوب می شود،

[۱۴] Germ Cell Tumor

نادر است، اما در میان پسران جوانی که تازه به سن بلوغ رسیده اند بیشترین شیوع را دارد. خوشبختانه سرطانهای سلولهای جنسی از درمان پذیرترین سرطانها هستند (۹).

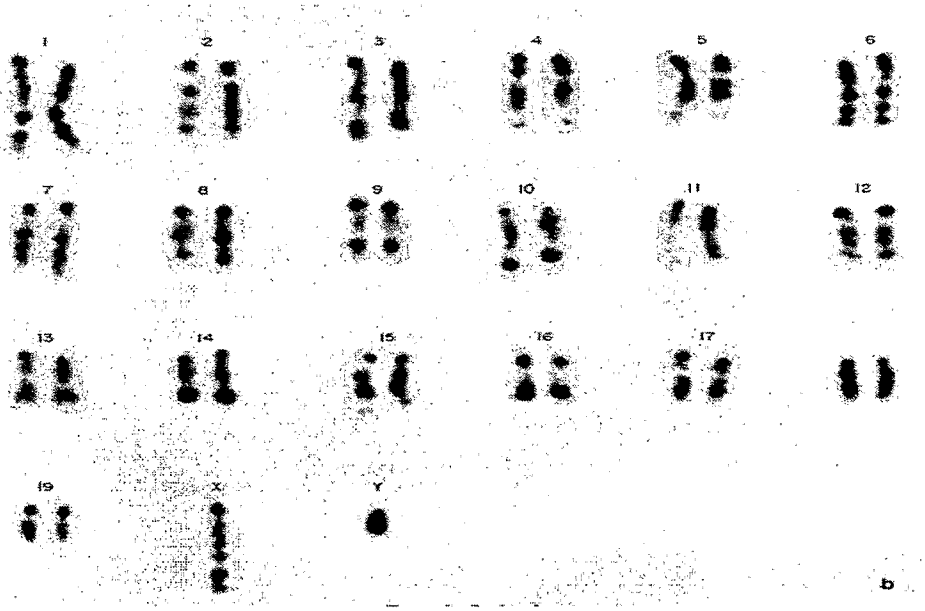
تراتوکارسینوما از گونوسیت های غیر طبیعی درون لوله های منی ساز[۱۵] منشأ می گیرد (۱۰). ساختار بافت شناختی این نوع تومور یکنواخت نیست و غالباً انواع بافتهای سوماتیک مثل عصب، استخوان، ماهیچه و در آن مشاهده می شود (شکل۱-۲). گاهی اوقات نیز اجسام شبه جنینی در آن دیده می شود که سازمان سلولی آنها مشابه سلولهای اولیه جنینی است (۱۱). این تومورها حاوی سلولهای تمایز نیافته EC نیز هستند که عامل بدخیمی این تومورها محسوب می شوند. تراتوماهای خوش خیم و غیر قابل انتقال فاقد این نوع سلولها هستند. از نظر زیست شناسی سلولی تنها تفاوت تراتوکارسینوما نسبت به تراتوما داشتن همین سلولها است ؛ که به آنها این امکان را می دهد که پس از انتقال به میزبان دوم، تومور ثانویه ایجاد کنند. به عبارت دیگر کلمه تراتوکارسینوما درمورد تراتومایی به کار می رود که حاوی سلولهای EC است (۱۲).

۱-۴-۲. منشا سلول P۱۹

همان طور که ذکر شد در برخی از گونه های موش با انتقال جنین ابتدایی به یک جایگاه خارج رحمی تراتوکارسینوما شکل می گیرد . سلول P۱۹ از تراتوکارسینومایی که با انتقال جنین۷/۵ روزه به بیضه یک موش بالغ دیگر بوجود آمد بدست آمده است. بدین نحو که در سال ۱۹۸۲ MCBurney و Rogers جنین مرحله ۷/۵ روزه را به بیضه یک موش بالغ حدوداً ۴ ماهه پیوند زدند. بعد از حدود ۶ ماه توموری به اندازه ۲cm شکل گرفت. حیوان میزبان را کشتند و تومور را از آن استخراج کردند. لاین P۱۹ از این تومور بدست آمده است که کاریوتایپ آن کاملاً طبیعی است (شکل ۱-۳).

---

[۱۵] SeminiFerous



شکل ۱-۳. کاریوتایپ سلول P۱۹. (۱۳)

بزرگترین امتیاز سلولهای کارسینومای جنینی نسبت به سلولهای ES کشت آسان، دستکاری ژنتیکی آسان و مهمتر از همه امکان تمایز کنترل شده آنهاست. با توجه به وجود مشکلات علمی و اخلاقی موجود در مطالعهٔ جنین های انسانی ، با کمک این سلولها امکان شناخت مولکولها و ژنهای مهم اصلی دخیل در فرایند تکوین فراهم شده است. نقص عمدهٔ سلولهای EC ، قابلیت محدود تمایزی آنها در مقایسه با سلولهای ES است، که خود موضوعی بحث انگیز و قابل بررسی می باشد. جدا از ارزش سلولهای بنیادی به عنوان ابزار آزمایشگاهی، می توان از آنها برای تولید انواع سلولهای تمایز یافته جهت درمان بیماریها و مهندسی بافت استفاده کرد.

سلولهای ES از جنبه های بسیاری مشابه سلولهای EC هستند. گرچه تنها تعداد کمی از رده های EC هستند که موش های کایمر تولید می کنند؛ اما بسیاری از آنها می توانند به انواع سلولهای هر ۳ لایه زاینده جنینی هم *in vivo* و هم *in vitro* تمایز پیدا کنند. با این وجود توانایی تمایز بهترین سلول تراتوکارسینومای انسانی، محدود تر از قدرت تمایز سلول بنیادی جنینی موشی است (۱۴).حتی

بسیاری از رده های EC به طور کامل این توانایی خود را از دست داده و فاقد توان[۱۶] هستند. این تفاوتها چندان تعجب آور نیست، چرا که به واقع سلولهای EC برای تومورزایی انتخاب شده اند (۱۵). یکی از ویژگیهای سلول بنیادی پر توان این است که می تواند از یک طرف تولید سلولهای دختر (خود نوزایی) و از طرف دیگر تمایز را انتخاب کند. از آنجا که مشتقات تمایز یافتهٔ سلولهای EC توانایی اندکی برای تقسیم وبقاء دارند ؛ چنین استنباط می شود که در روند تشکیل تومور جهشهایی در این سلولها رخ می دهد که توانایی تمایز این سلولها را محدود می کند. در واقع به نظر می رسد که آن دسته از سلولهای EC در محیط کشت انتخاب می شوند که توانایی محدودی برای تمایز دارند. مشابه همین انتخاب درکشت های طولانی سلولهای ES نیز رخ می دهد. پس از کشت های طولانی تغییراتی درکاریوتایپ سلولهای ES انسانی رخ می دهد که در سلولهای EC انسانی نیز دیده می شود. این سلولها سازگار می شوند؛ سرعت تکثیر آنها افزایش پیدا کرده و زیر رده هایی بدست می آیند که نیازشان به لایهٔ تغذیه کنندهٔ فیبروبلاستی و FGF[۱۷] (فاکتور لازم برای رشد سلولهای ES انسانی) متفاوت است ؛ درحالیکه هنوز ویژگیهای اصلی سلولهای پر توان ES را حفظ می کنند (۱۶). با این دیدگاه، می توان سلولهای EC تراتوکارسینوما و سلولهای ES جنین را در دو نقطهٔ متفاوت از یک طیف پیوستهٔ سازگاری از « طبیعی بودن[۱۸] » کامل در یک انتها (مشابه سلولهای ICM جنین) تا نهایت « ناقص بودن[۱۹] » در انتهای دیگر در نظر گرفت. به این ترتیب سلولهای ES و EC کامل کنندهٔ یکدیگر هستند و برای حل مسایل پرتوانی ، زیست شناسی سلولهای بنیادی و سرطان ابزار کاملی را با یکدیگر می سازند (۱۶).

---

[۱۶] Nullipotent
[۱۷] Fibroblast Growth Factor
[۱۸] Normality
[۱۹] Abnormality

۱-۵. تمایز سلولهای EC به سلولهای عصبی

۱-۵-۱. تشکیل خود به خود دودمانهای عصبی از سلولهای EC

یکی از راههای موثر در القا تمایز هدفمند در سلولهای EC، کشت این سلولها در ظروف غیر چسبنده است. دراین شرایط سلولها مجتمع شده و ساختار هایی به نام اجسام شبه جنینی[۲۰](EBs) را پدید می آورند؛ که شبیه ICM جنینی هستند. تشکیلEBها کارآمدترین روش تمایز سلولهای بنیادی جنینی است. این ساختارها مراحل ابتدایی تکوین پستانداران را به سرعت پشت سر نهاده و نسبت به زمانی که در کشت تک لایه تمایز پیدا می کنند طیف گسترده تری از سلولهای تمایز یافته را تولید می کنند. بیشترین مطالعات انجام شده در مورد چگونگی تشکیل اجسام شبه جنینی در آزمایشگاه بر روی سلولهای بنیادی کارسینومای جنینی انجام شده است (۱۷). بر اساس مطالعات انجام شده اولین مراحل تشکیل EB بسیار یکنواخت صورت می گیرد و ساختار سلولی و مشخصات ظاهری جسم تشکیل شده مشابه توده سلولی داخلی است. طی مراحل آغازین تشکیل EB، سلولهای EC تمایز پیدا کرده و در سطح بیرونی یک لایه سلول شبه آندودرمی را تشکیل می دهند. هنگامی که این ساختار بزرگ می شود؛ تبدیل به یک جسم شبه جنینی توخالی می شود. در این مرحله بسیاری از سلولهای درونی شکلی به خود می گیرند که بسیار مشابه اکتودرم جنینی است. این سلولها مثل سلولهای اکتودرم جنینی کمپلکس های اتصالی تشکیل داده، طویل شده و یک لایه بسیار سازمان یافته از سلولهای اپیتلیالی را حول یک حفره تشکیل می دهند. این حفره یادآور حفره پرو آمنیوتیک جنین ابتدایی است. درون این اجتماعات چند سلولی برهمکنشهای پیچیده بین انواع سلولها منجر به القاء تمایز در سلولهای بنیادی و تشکیل هر ۳ لایه زاینده جنینی می شود. وقتی این اجسام به ظروف پلاستیکی کشت بافت منتقل می شوند، پس از مدتی انواع مختلف سلولها پدیدار می شوند که نشانگر رگزایی، نورون زایی و قلب زایی می باشند (۱۸). جزئیات تشکیل دودمانهای عصبی در EBها بررسی

---

۱ Embryoid Body