Archive of SID

مجله علمی پزشکی، دوره ٤، شماره ٢، تابستان ١٣٨٤

بررسی وضعیت مورفولوژیک و کاریوتیپ سلول‌های مشتق از کشت توده داخلی جنین موش در طی پاساژهای اولیه

محمود هاشمی تبار* [1]، فاطمه جوادنیا*، محمد علی ملک عسگر**، مریم باعزم*، روشنک غضنفری*

چکیده

هدف: کلونی بدست آمده از توده داخلی جنین قادر است تا در محیط *in vitro* به طور نامحدودی تکثیر پیدا کرده و به صورت تمایز نیافته باقی بماند. همچنین این کلونی سلولی در طی پاساژهای متعدد قادر است کاریوتیپ طبیعی خود را به صورت دیپلوئید حفظ کند. در این تحقیق به منظور جدا سازی سلول‌های بنیادی، جنین موش را در مرحله بلاستوسیستی کشت داده و وضعیت مرفولوژیک سلول‌های حاصل از کشت توده داخلی جنین را در طی مراحل مختلف بیرون زدگی، خرد کردن، گسترش سلولی و تولید کلونی و از نظر وضعیت کروموزومی در طی پاساژهای اولیه مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: تعداد ٢٠ بلاستوسیست کامل غیر فعال شده توسط میتومایسین C از جنین‌های موش صحرایی بر روی لایه فیدر فیبروبلاستی منتقل شدند. پس از رسیدن به مرحله بیرون زدگی، به روش مکانیکی خرد شدند. هر ٣-٢ روز یکبار در محیط DMEM [2] حاوی ١٠٠٠ واحد بین‌المللی LIF [3] و ٢٠ درصد FBS [4] پاساژ داده شدند. سلول‌ها تا پاساژ نهم کشت داده شدند. جهت بررسی وضعیت کروموزومی با روش رنگ آمیزی گیمسا از کلونی سلولی کاریوتیپ در پاساژهای ٧ و ٩ استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داند که در مرحله گسترش سلولی کلونی‌ها به صورت توده‌های پهن یک لایه سلولی با محدوده مشخص، سیتوپلاسم نامشخص و چند عدد هسته واضح مشاهده شد. در مرحله تولید کلونی، سلول‌ها از حالت پهن و یک لایه به صورت یک توده کروی با محدوده مشخص تغییر حالت دادند. از نظر وضعیت کروموزومی ٨٦ درصد سلول‌ها در پاساژ هفتم و ٦٧ درصد سلول‌ها در پاساژ نهم کاریوتیپ طبیعی داشتند. آنیوپلوئیدی بیشتر به صورت مونوزومی و همچنین متاستریک مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: به طور کلی تشخیص کلونی سلول‌های تمایز نیافته از روی معیار مرفولوژی، پاساژ پذیری و سرعت تقسیمات صورت پذیرفت. تشخیص کلونی سلول‌های بنیادی جنین در مرحله گسترش سلولی اولین علامت‌های موفقیت جدا سازی این سلولها است.

کلید واژگان: توده سلولی داخلی، سلول‌های بنیادی جنینی، کاریوتیپ، موش.

---

* اعضاء هیئت علمی گروه تشریح و جنین شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

** عضو هیئت علمی گروه تشریح و جنین شناسی و عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات تالاسمی و هموگلوبینوپاتی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

١ـ نویسنده مسؤول

2 - DMEM

3- Leukemia Inhibitory Factor (LIF)

4 – Fbtal Boein Serum (FBS)

دریافت مقاله: ١٣٨٢/٥/١٣ دریافت مقاله اصلاح شده: ١٣٨٣/١١/١٧ اعلام قبولی: ١٣٨٣/١٢/١٠

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

توده داخلی جنین با خاصیت چند استعدادی pluripotent توانایی دارد تا در محیط *in vitro* به طور نامحدودی تکثیر پیدا کند و به صورت تمایز نیافته باقی بماند. با کشت سلول‌های توده داخلی می‌توان رده‌های مختلفی از سلول‌های بنیادی جنینی را به وجود آورد. این سلول‌ها با بیان مقدار بالای تلومراز، نامیرا بوده و قادرند کاریوتیپ خود را در طی پاساژهای متعدد در حالت طبیعی حفظ کنند (۱ و ۲). از ویژگی‌های منحصر به فرد این سلول‌ها این است که در شرایط خاص این ظرفیت را دارند که در محیط کشت تمایز یابند و طیف وسیعی از سلول‌های مشتق از لایه‌های زایای جنینی را تولید کنند (٤).

استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی در دو دهه اخیر به عنوان یک روش پایه‌ای در ترمیم بافت‌های آسیب دیده (٥) از جمله ترمیم سلول‌های نورونی، مغز استخوان، هپاتوسیت‌ها و غیره کاربرد فراوان پیدا کرده است (۷ و ٦). به طور کلی حوزه کاربرد تکنولوژی تولید سلول‌های بنیادی جنینی عبارت از ژن درمانی، تمایز و طب پیوند اعضا، ساخت حیوانات ترانس ژنیک و مطالعه اثر داروها و سمیت آنهاست (۷).

در انسان سلول‌های بنیادی جنینی از نظر مورفولوژی به شکل کلونی‌های پهن و متراکمی با هسته درشت هستند که در آنها نسبت هسته به سیتوپلاسم (N/C) بسیار زیاد است. سیتوپلاسم آنها نامحسوس است که به شدت بهم چسبیده‌اند؛ به طوری که نمی‌توان محدوده سلول‌ها را از یکدیگر تشخیص داد، اما محدوده کلونی به خوبی مشخص بوده و از قدرت شکست نور برخوردار است. این سلول‌ها جهت مضاعف شدن ۳٦ ساعت زمان لازم دارند (۸ و ۹). در موش نیز مورفولوژی سلول‌های بنیادی جنینی به صورت توده‌های کروی و متراکمی با محدوده صاف و مشخص است که سلول‌ها در حالت متراکم بدون مرز مشخص کنار هم قرار دارند. هسته‌ها نیز به ندرت ممکن است دیده شوند. این توده‌ها جهت مضاعف شدن ۱۲ ساعت زمان لازم دارند و بر خلاف سلول‌های بنیادی جنینی انسان به تریپسیناز به خوبی پاسخ نمی‌دهند (۱۰ و ۱۱).

شاخص آلکالن فسفاتاز در سلول‌های بنیادی جنینی موش و انسان هر دو مثبت است، اما آنتی‌ژن‌های متفاوتی را نشان می‌دهند که اهمیت عملکردی این آنتی ژن‌ها هنوز ناشناخته باقی مانده است. در سلول‌های بنیادی جنینی انسان شاخص SSEA-3,4 مثبت است، در حالی که در موش شاخص SSEA-1 مثبت می‌باشد (۱۲). ناگی[1] و همکاران (۱۳) چندین رده سلول‌های بنیادی جنینی را تهیه کردند و وضعیت کرموزومی آنها را در طی پاساژهای ۳۲ و ۱۱ مورد مطالعه قرار دادند. اگر چه از نظر تعداد کروموزوم‌ها همه رده‌های سلولی بدست آمده بنیادی جنینی ٤۰ کروموزومی و طبیعی بودند، ولی فقط یک رده از آنها به نام R1 قادر به تولید حیوان کایمریک و انتقال لایه‌های زایای جنینی بود (۱۳). در این تحقیق سعی بر آن شد تا مورفولوژی سلول‌های بدست آمده از سلول‌های توده داخلی جنین موش در ضمن مراحل مختلف بیرون زدگی، خرد کردن، گسترش سلولی و تولید کلونی سلول بررسی شده و کلونی‌های فوق طی پاساژهای اولیه از نظر وضعیت کروموزمی مورد مطالعه قرار گیرند.

روش بررسی

تعداد ۲۰ بلاستوسیست کامل از نژاد NMRI در روز پنجم پس از مشاهده واژینال پلاک روی لایه بستری از فیبروبلاسیت‌های جنین موش صحرایی[2] (REF) غیر فعال شده از طریق میتومایسین C منتقل شدند و به مدت

1 - Nagy

2 - Rat embryonic fibroblast

www.SID.ir

Archive of SID

۷۲-۴۸ ساعت از نظر بیرون آمدن از زوناپلوسیدا و رسیدن به مرحله بیرون زدگی کنترل گردیدند.

خرد شدن توده داخلی به روش مکانیکی انجام شد. پس از خرد کردن، سلول‌ها در محیط DMEM (Sigma) 20% FBS (Gibco) + Penicillin (100 IU/ml - Sigma) + Streptomycin (100 µg/ml - Sigma) + LIF (100 IU/ml-Sigma) + L-Glutimine (2 mM-Sigma) در ظرف کشت چهار خانه (NUNC) به مدت ۳ روز کشت شدند (۱٤). طی این مدت هر روز مورفولوژی سلول‌ها کنترل گردید و در صورت عدم مشاهده کلونی سلولی، یکبار دیگر سلول‌ها در جای خود به روش تریپسیناز خرد شده و طی ۳ روز دیگر درهمان خانه کشت داده شدند. در این مرحله ظرف‌هایی که کلونی سلولی نشان ندادند و به مرحلهٔ گسترش نرسیدند، از مطالعه حذف گردیدند.

ظرف‌هایی که کلونی سلولی نشان دادند، هر ۳ روز یکبار با روش تریپسیناز پاساژ داده شدند و تا ۲ پاساژ پس از رسیدن به مرحلهٔ گسترش سلولی در ظرف کشت ٤ خانه و بر روی لایه فیدر REF[1] کشت داده شدند. در این مدت هر روز سلول‌ها از نظر تشکیل کلونی سلولی کنترل گردیدند و در صورت تشکیل کلونی سلولی، این پاساژ به عنوان پاساژ اول، پاساژ دوم در ظرف ۳۵ میلی‌متری، پاساژ سوم در ظرف ٦۰ میلی‌متری و پاساژهای بعدی تا پاساژ ۹ به نسبت ۱:٤ در ظرف کشت ٦۰ میلی‌متری انجام گرفتند. برای انجام پاساژ از تریپسین EDTA[2] با غلظت ۰/۱۲۵ درصد تریپسین و نیم‌میلی مول EDTA استفاده شد (۱۱و۱٤). سلول‌ها تا پاساژ نهم کشت داده شدند. در پاساژهای هفتم و نهم از این سلول‌ها کاریوتیپ به عمل آمد؛ به این ترتیب که سلول‌ها در ظرف کشت ٦۰ میلی‌متر کشف شده و پس از این که متراکم شدند، جهت متوقف کردن دوک تقسیم، کلسیماید با غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به سلول‌ها اضافه شد. سپس با خارج کردن محیط از روی سلول‌ها، ۱ میلی لیتر تریپسین ۰/۱۲۵ درصد به مدت ۲ دقیقه اضافه شد.

بعد از طریق DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS تریپسین غیر فعال شده و سلول‌ها کنده شده از ظرف به لوله ۱۰ میلی‌لیتری ته مخروطی منتقل گردیدند و در دور rpm[3] ۱۲۰۰ در طی ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. مایع رویی جدا گردید و روی رسوب حاصل محلول هیپوتونیک کلرید پتاسیم با غلظت ۰/٥٦ درصد به مدت ۳۰ دقیقه اضافه شد و با سانتریفوژ کردن لوله ـ مانند روش قبل ـ محلول هیپوتونیک خارج و توسط فیکساتیو کارنوی (متانول و اسید استیک به نسبت ۳ به ۱) به مدت ۲۰-۳۰ دقیقه سلول‌ها فیکس شدند. بعد از سه بار فیکس کردن، سلول‌ها با غلظت مناسب از بالا روی لام ریخته شدند و در نهایت ظرف ۵ دقیقه جهت رنگ آمیزی در گیمسا قرار گرفتند. حداقل ۲۵ متافاز از هر ظرف کشت شمارش شد. از متافازهای سلول‌ها عکس گرفته شد و بر اساس نقشه کروموزومی موش، کروموزوم‌ها جور شدند (۱۵).

یافته‌ها

بلاستوسیست‌های منتقل شده به روی لایه REF ظرف ۷۲-٤۸ ساعت از نظر رسیدن به مرحله بیرون‌زدگی کنترل شدند. جنین‌هایی که توده داخلی آنها کاملاً برآمده و سلول‌های ترفواکتودرمی به صورت هاله‌ای در اطراف آن مشاهده گردید (شکل ۱)، به روش مکانیکی خرد شدند. جنین‌هایی که پس از گذشت ۳ روز به مرحله بیرون زدگی نرسیدند و صرفاً لایه زونا را پاره کرده و یا به صورت یک توده توپر و یا یک توده تو خالی بلاستوسیستس مشاهده شدند (شکل ۲)، عملاً برای انجام خرد شدن مناسب نبودند و تشکیل کلونی سلولی ندادند. در مرحله گسترش سلولی مورفولوژی سلولی بسیار

1 - Rat Embryonic Fibroblast (REF)

2 - Ethylene – Diamin - Tetra Acetic - Acid

3 - Revolutions per minute

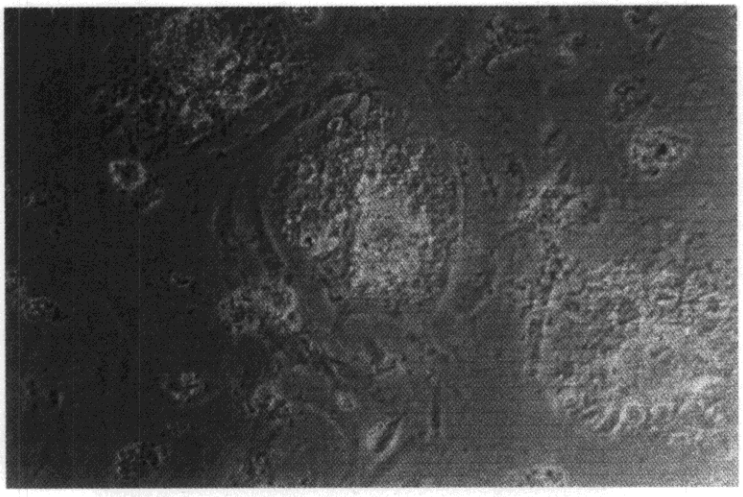
www.SID.ir

Archive of SID

متمایز بود، بدین ترتیب که این سلول‌ها مخلوطی از کلونی‌های تمایز یافته و تمایز نیافته بودند.

سلول‌های تمایز نیافته به شکل توده‌های پهن سلولی یک لایه با محدوده مشخص بودند (شکل ۳). در بزرگنمایی بیشتر محدوده توده سلولی بسیار واضح دیده شد؛ البته جداره سیتوپلاسمی سلول‌ها قابل مشاهده نبود و چند هسته مشخص در این توده سلولی مشاهده گردید (شکل ٤). مشاهده این مورفولوژی اولین علامت موفقیت کشت سلولی توده داخل بود. در پاساژهای بعدی مورفولوژی سلول‌های بنیادی جنینی تغییر قابل ملاحظه‌ای نمودند؛ بدین ترتیب که به صورت مخلوطی از کلونی‌های سلولی تمایز یافته و تمایز نیافته مشاهده گردیدند و با افزایش پاساژها هر ۳ روز یکبار مرتباً بر تعداد سلول‌های تمایز نیافته افزوده می‌شد (شکل ٥).

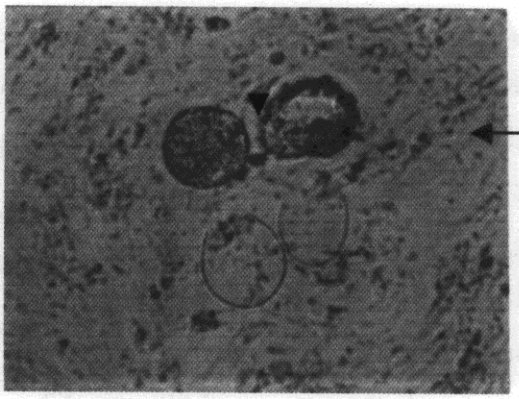
کلونی‌های تمایز نیافته محدوده مشخص و کلونی‌های تمایز یافته محدوده نامشخص داشتند. در شکل ٦، مورفولوژی یک کلونی سلولی بنیادی جنینی نشان داده شده است. در صورتی که کلونی‌های سلولی در این مرحله، تریپسیناز نشده به سمت تمایز پیش می‌رفتند. مشاهده کلونی‌های بزرگ و رسیده یکی از علامت‌های رسیدن زمان تریپسیناز بود، حتی اگر سلول‌ها در روز قبل تریپسیناز شده بودند. برای بررسی وضعیت کروموزمی سلول‌ها در پاساژهای ۷ و ۹ از این سلول‌ها کاریوتیپ تهیه شد و پس از عکسبرداری از گستره‌های متافازی (شکل ۷). کروموزوم‌های سلول‌های بنیادی جنینی موش به ترتیب اندازه کروموزومی از ۱ تا ٤۰ چیده شدند (شکل ۸). در پاساژ هفتم ۸٦ درصد سلول‌ها و در پاساژ نهم ٦۷ درصد سلول‌ها کاریوتیپ طبیعی داشتند. در ۳۳ درصد جمعیت آنیوپلوئیدی پاساژ نهم و ۱٤ درصد جمعیت آنیوپلوئیدی پاساژ هفتم ناهنجاری‌ها به صورت مونوزومی و چند درصد به شکل متاستریک مشاهده شد.



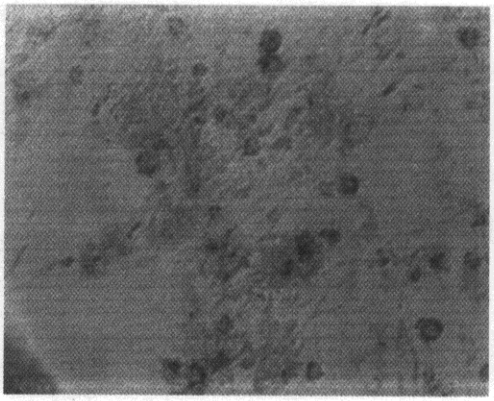
شکل۱: بلاستوسیست‌های منتقل شده بر روی لایه بستر در مرحله بیرون‌زدگی، مناسب برای خرد کردن (×۱۰۰)

www.SID.ir

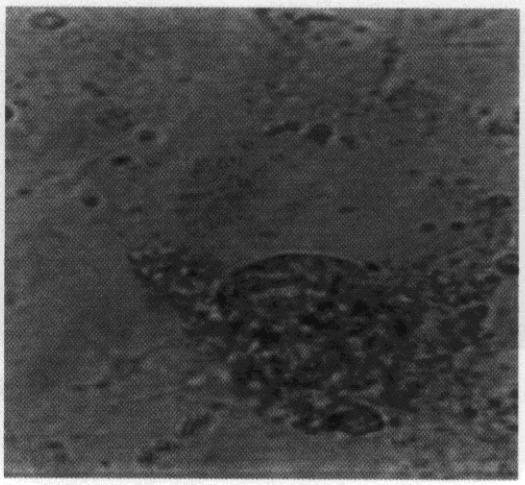
Archive of SID



شکل۲: بلاستوسیست‌های بیرون آمده از جسم شفاف. بلاستوسیست پهن شده با حفره مرکزی (پیکان) بلاستوسیست پهن شده به صورت یک حفره توپر(نوک پیکان) هر دو نامناسب برای خرد کردن (×۱۰۰)



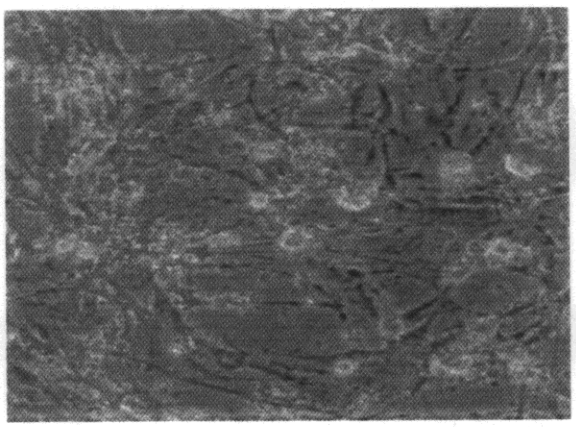
شکل ۳: سلول‌های توده داخلی خرد شده به روش مکانیکی در مرحله گسترش سلولی (×۱۰۰)



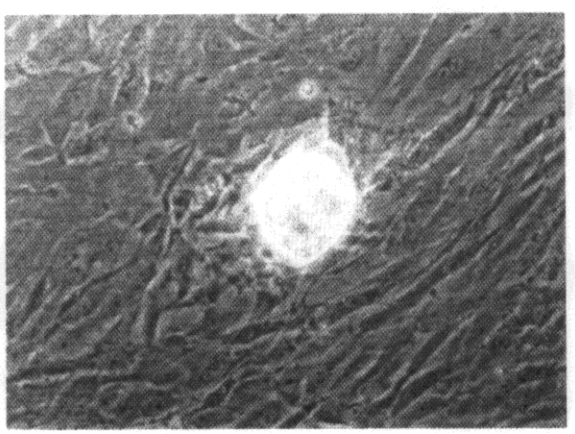
شکل ٤: مرحله گسترش سلولی. کلونی‌های پهن با محدوده مشخص، سیتوپلاسم نامشخص و چند عدد هسته واضح (×۲۰۰)

www.SID.ir

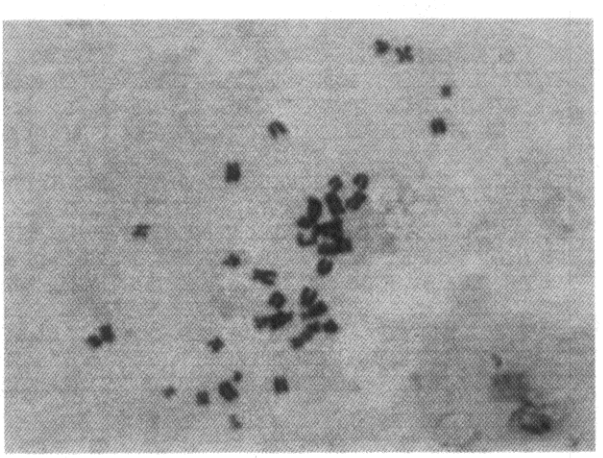
Archive of SID



شکل ۵: مرحله تولید کلونی. مورفولوژی کلونی سلول‌های تمایز نیافته با محدودهٔ مشخص و سلول‌هایی که با پهن شدن به روی لایه بستری شروع به تمایز یافته‌اند ـ پاساژ ٤ (×۱۰۰)



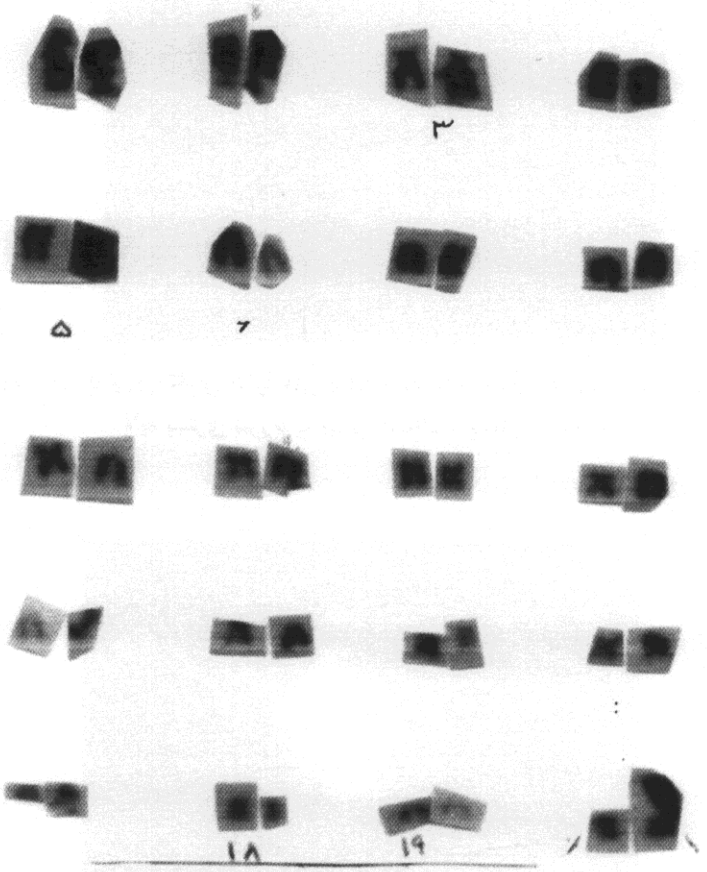
شکل ٦: موروفولوژی کلونی سلول‌های تمایز نیافته بنیادی جنینی در مرحله بعد از گسترش سلولی (×۱۰۰)



شکل ۷: گستره کروموزوم‌های سلول‌های بنیادی جنینی ـ رنگ آمیزی گیمسا (×۱۰۰۰)

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۸: کاریوتیپ سلول‌های بنیادی جنینی به ترتیب اندازه از شماره ۴۰- ۱

بحث و نتیجه‌گیری

برای تهیه کلونی سلولی و همچنین پاساژ آنها محیط کشتی که پیشنهاد می‌شود که شامل محیط DMEM به همراه LIF می‌باشد (۱۰). حضور این عامل در محیط کشت شرط استحصال کلونی سلولی بنیادی جنینی با حفظ خاصیت تمایز نیافتگی است. اسچونجانس[1] با تهیه محیط مشروط از فیبروبلاست‌های جنینی خرگوش که با دستکاری ژنتیکی قادر بودند مقدار LIF بیشتری به محیط کشت ترشح کنند، راندمان ساخت سلول‌های بنیادی جنین در بین نژادهای مختلف را حدود ۵۰ـ۳۰ درصد افزایش داده است (۱۶).

محیط DMEM باید حاوی گلوکز بالا باشد. البته جنین تا قبل از هشت سلولی احتیاج به گلوکز ندارد ولی به دلیل فعال شدن ژنوم آن از مرحله هشت سلولی به بعد نیاز سلول‌های توده داخلی به گلوکز افزایش می‌یابد (۱۷)؛ لذا در بعضی از منابع احتیاج بالا به گلوکز را در محیط کشت سلول‌های بنیادی جنینی با اضافه کردن سدیم پیرویک جبران می‌کنند (۱۱).

2ME یک ماده احیا کننده می‌باشد و برای جلوگیری از افزایش غلظت رادیکال‌های آزاد در محیط کشت ضروری است. اضافه کردن L-Glutamine و غلظت مناسب سرم

1 - Schhoonjans

www.SID.ir

Archive of SID

جنین گاوی و اسید آمینه‌های غیر ضروری به محیط کشت باعث بهبود کیفیت کلونی حاصل از سلول‌های توده داخلی و افزایش کارآیی آنها در بروز خواص ذاتی خود از جمله قدرت تمایز به هر یک از بافت‌های زایای مشتق از دیسک سه لایه جنینی می‌شود. استفاده از این مواد باعث افزایش کارایی سلول‌های بنیادی جنین در ساخت حیوان کایمریک و ترانس ژن می‌گردد (۱۱ و ۱٤).

شاخص مورفولوژی کلونی سلول‌های توده داخلی با خاصیت تمایز نیافتگی و چند استعدادی به صورت یک توده با محدوده مشخص و جداره سیتوپلاسمی نامشخص یک معیار اولیه است که در بسیاری از مطالعات از آن نام برده می‌شود (۱٤و۱۵). همچنان که پاساژ پذیری سلول‌های بنیادی، سرعت تقسیمات سلولی و زمان دو برابر شدن سلول‌های بنیادی نیز از معیارهای مهم تشخیص کلونی سلول‌های بنیادی است که البته یک معیار قطعی نیست.

برای تشخیص کلونی‌های تمایز نیافته بهتر است از مارکرهای سطحی مثل OCT4 و SSEA-1 و تکنیک‌های ایمونوهیستوشیمی استفاده شود (۱۲). البته این شاخص هم نمی‌تواند یک معیار قطعی در تشخیص کلونی سلول‌های بنیادی باشد؛ از این رو امروزه بیشتر از معیار کارایی سلول‌های فوق در توانایی ایجاد تراتوما و در ساخت حیوان کایمر به عنوان شاخص قطعی استفاده می‌شود (۱۸ و ۱۷). جداسازی رده‌های سلولی از کلونی سلول‌های بنیادی جنینی با استفاده از معیار مورفولوژی، پاساژ پذیری و سرعت تقسیم آنها اولین قدم در راه تولید سلول‌های بنیادی جنینی است که در مطالعات مختلف به آن اشاره شده است (۱۰و۱٤و۱۵).

ناگی (۱۳) چندین رده سلول‌های بنیادی از موش بدست آورد که در پاساژهای اولیه طبیعی و زنده بودند، ولی کشت طولانی مدت اثر منفی بر خاصیت چند استعدادی آنها داشت. در پاساژ ۱٤ اکثر رده‌های سلولی بدست آمده دیگر قادر به بروز خاصیت چند استعدادی خود نبودند و در صورت امتزاج آنها با سلول‌های توده داخلی یک بلاستوسیست دیگر، جنین به دنیا آمده بود و یا از بین رفته بود و یا این که سلول‌های بنیادی جنینی به هیچ عنوان در ساختار ژنتیکی و انتقال خصوصیات لایه‌های زایا شرکت نمی‌کردند. ناگی پیشنهاد نمود که اختلالات کروموزومی و موتاسیون‌های ژنی نقش مهمی در ناکارامدی سلول‌های بنیادی جنینی در طی پاساژهای طولانی دارد. سلول‌ها بنیادی جنینی به دلیل بیان مقدار بالای تلومراز، سرعت تکثیر و دو برابر شدن بیشتری نسبت به سلول‌های تمایز یافته دارند؛از طریق کوتاه کردن زمان پاساژها این شانس به کلونی سلول‌های تمایز نیافته می‌دهند که در محیط کشت تعداد این کلونی‌ها افزایش یافته و به صورت جمعیت غالب در آیند (۱۳).

دوشمنت[1] و همکاران (۱۹) اولین بار دو رده سلولی از سلول‌های بنیادی چنین را از نظر وضعیت کروموزومی مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که این سلول‌ها به ترتیب ٤۵ و ٦۲ درصد کاریوتیپ طبیعی را دارا هستند. دل‌هایس[2] وهمکاران (۲۰) نیز در مطالعه روی یک رده از سلول‌های پایه جنینی در طی پاساژهای متعدد نشان دادند که ۷۰ درصد سلولها کاریوتیپ طبیعی داشته‌اند (۲۰).

با توجه به اختلاف درصدکروموزوم‌های طبیعی در تحقیقات مختلف چنین برمی‌آید که درصد آنیوپلوئیدی در تحقیق حاضر تقریباً در محدوده فوق است و قابل قبول می‌باشد. البته باید توجه داشت که کروموزوم‌های موش نسبت به انسان کوچک می‌باشند و تقریباً هم اندازه و از نوع تلوسنتریک هستند (۱٤)؛ لذا کاریوتیپ و جداسازی آنها بسیار مشکل است. به نظر می‌رسد درصدی از کروموزوم‌های متاسنتریک به دلیل افتادن کروموزوم‌ها روی هم است و در واقع طبیعی می‌باشند. در این صورت درصد آنیوپلوئیدی در این تحقیق باز هم کمتر می‌شود اما به دلیل استفاده از روش رنگ آمیزی ساده این احتمال وجود دارد که اگر با تکنیک‌های دقیق‌تر

1 - Doetschman

2 - Delhaise

www.SID.ir

Archive of SID

مانند G-banding و FISH بررسی صورت بگیرد، میزان خطا کمتر گردد و حذف‌های کوچک، جابجایی، مضاعف شدن و مونوزومی به همراه تریزومی در این جمعیت کروموزومی راحت‌تر تعیین گردد. از طرفی شمارش کروموزوم‌های هنجار که به غلط ناهنجار شمارش شده‌اند کمتر شود.

مطالعه رابطه بین سرعت رشد سلول‌های بنیادی جنینی، کاریوتیپ و همچنین توانایی آنها در تولید بافت‌های مشتق از هر یک از لایه‌های زایای دیسک جنین و یا تمایز سمت سلول‌های تخصص یافته بزرگسالی حاکی از آن بوده است که با افزایش تعداد پاساژها، توانایی سلول‌های بنیادی جنینی جهت مشارکت آنها در تشکیل لایه‌های زایا جنینی کاهش پیدا می‌کند؛ همچنان که قدرت تمایز آنها نیز کم می‌شود (۱۳).

تریزومی کروموزوم شماره ۸ بیشترین آنومالی سلول‌های بنیادی جنینی طی پاساژهای طولانی مدت است. البته سلول‌های که این آنومالی را دارند، کمتر در تشکیل لایه‌های جنینی شرکت می‌کنند (۹). اگر سلول بنیادی جنینی را که تا حد زیادی خصوصیات چند استعدادی خود را به واسطه کشت طولانی مدت از دست داده است، مجدداً ساب کلون کنیم این سلول می‌تواند توانایی‌های از دست رفته خود را به مقدار زیادی مجدداً بدست آورد (۱۳).

در این تحقیق کلونی سلول‌های توده داخلی با روش خرد کردن به شیوه مکانیکی تهیه شد و در مرحله گسترش سلولی مورفولوژی آنها به صورت توده پهن یک لایه سلولی با محدوده مشخص و جدارهٔ سیتوپلاسمی نامشخص و چند عدد هسته واضح به عنوان اولین علامت موفقیت کشت سلول‌های توده داخلی موش تعیین گردید. کاریوتیپ این سلولها در طی پاساژهای اولیه تقریباً طبیعی گزارش شد. در صورتی که این سلول‌ها در پاساژهای بالاتر بتوانند کاریوتیپ طبیعی خود را حفظ کنند و همچنین در بررسی‌های بعدی از این سلولها بتوان حیوان کایمر تهیه کرد، در این صورت می‌توان از رده‌های کلونی سلولی به دست آمده از توده داخلی به عنوان سلول بنیادی جنینی با کارایی بالا نام برد.

منابع

1- Rossant A. Stem cells from the mammalian blastocyst. Stem Cells, 2001; 19:477- 82.

2- Thomson JA, Odonio JS. Human embryonic stem cell and embryonic germ line. Focus 2000; 18:53-57.

3- Odorico JS, Kaufman DA, Thomson J. Multilinage differentiation from human embryonic stem cell lines. Stem Cells 2001; 19: 193-204.

4- Rathjen PD, Lake J, Whaatt LM, Bettess MD. and Rathjen J. properties and uses of embryonic stem cells: prospects for application tohuman biology and gene therapy. Reprod Fertile Dev 1998, 10: 31-47.

5- Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M, Mckay RDG. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neuron from embryonic stem cells in vitro. Mech Dev 1996; 59: 89-102.

6- Bhatia M, Bonnet D, Wu D, Murdoch B, Wrana J, Gallacher L, Dick JE. Bone morphogenetic protein regulate the developmental program of human hematopoietic stem cell. J Exp Med 1999; 7(5): 1139-47.

7- Rathsen J, Rathjen PD. Mouse ES cells: experimental exploitition of pluripotent defferentiation potential. Curr Opin Genet Dev 2001;11:587-94.

8- Pera MF, Reubinoff B, Trouson A. Human embryonic stem cells. J Cell Sci 2000; 113:5-10.

9- Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Haris CP, Waknitz MA, et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged period of culture. Dev Boil, 2000; 271-78.

10- Hogan B, Bendington R, Costantini F, Lacy E. Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1994:194-95.

www.SID.ir

Archive of SID

11- Evans M.Tissue culture of embryonic stem cells. Cell biology: a laboratory handbook. Julio E Celis. Second ed, Academic Press Sydney; 1998: 88-89.
12- Gander RL. Stem cell: potency, plasticity and public perception. J Anat 2002; 227- 82.
13- Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90:8424-28.
14 - Abbondonzo SJ, Gadi I, Stewart CL. Derivation of embryonic stem cell lines. Meth. Enzymol.1993; 225: 803-23.
15- Brook FA, Gardner RL. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. Proc Natl Acad Sci 1997; 94:5709-12.
16- Schoonjans L, Kreemers V, Danloy S, Moreadth W, Laroche Y. Improved generation of germ line-competent embryonic stem cell lines from inbred mouse strains. Stem Cells 2003; 21:90-97.
17 - Amit M, Ltskovitz-Eldor J. Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. J Anat 2002; 200(3):232-55.
18 - Robertson EJ. Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach. England, IRL Press of Oxford University Press.; 1987: 71-112.
19- Doetschman TC, Elistter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R. The *in-vitro* development of blastocyst derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. J Embryol Exp Morph 1985; 87: 27-45.
20- Delhaise F, Bralion V, Schuurbiers N, Dessy F. Establishment of a stem cells line from 8-cell stage mouse embryos. Eur Morphol 1996; 34:237-43.

www.SID.ir