روشی ساده برای جداسازی سلول‌های بنیادی (نئوبلاست‌ها) از کرم‌های پهن پلاناریا

حامد چیت‌سازان M.Sc.[1]، حمید گورابی Ph.D.[2]، علی جباری ارفعی M.Sc.[3]، حسین بهاروند Ph.D.[4,1*]

۱. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران
۲. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، گروه ژنتیک، تهران، ایران
۳. بیمارستان شهدا، بخش رادیوتراپی، تهران، ایران
۴. دانشگاه علم و فرهنگ، گروه زیست شناسی تکوینی، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی
پست الکترونیک: Email: Baharvand@royaninstitute.com

دریافت مقاله: ۸۷/۱/۳۱، پذیرش مقاله: ۸۷/۴/۱۶

چکیده

* **هدف:** روش ساده و پربازده برای استخراج سلول‌های بنیادی (نئوبلاست‌های) از کرم‌های پهن پلاناریا
* **مواد و روش‌ها:** حدود ۱۲-۱۰ کرم پلاناریا از جنس Dugesia و با اندازه متوسط ۱۸ میلی‌متر به هموژنیزر دستی حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول نمکی پلانارین‌ها منتقل و بعد از خرد شدن، به ترتیب از فیلترهای نایلونی ۶۰، ۴۱، ۳۰، ۲۰ و ۱۱ میکرومتری عبور داده شدند. برای پی بردن به میزان خلوص نئوبلاست‌ها، سوسپانسیون نهایی حاصل کرم‌های سالم و کرم‌های فاقد نئوبلاست - که نئوبلاست‌های آنها با تاباندن ۳۰ گری (Gy) پرتو X نابود شده بودند - مقایسه شدند. برای مشخص شدن سلول‌ها از سایر ذرات از رنگ هوخست و برای مشخص شدن سلول‌های مرده از رنگ پروپودیوم‌یدید و متیلن‌بلو استفاده شد.
* **یافته‌ها:** از هر ۱۲-۱۰ کرم حدود ۳-۲/۶ میلیون سلول حاصل شد. نتایج فلوسیتومتری نشان داد که حدود ۸۳ درصد از ذرات استخراج شده سلول هستند و تیمار با پرتو X حدود ۵۰ درصد از این ذرات را ازبین برده است. ۱۸-۱۶درصد سلول‌های استخراج شده مرده و ۶۶-۶۲ درصد از سلول‌های استخراج شده سلول‌های حساس به اشعه یا همان نئوبلاست‌ها بودند. لیز کردن سلول‌ها با آب دوبار تقطیراستریل و بررسی محلول نهایی با میکروسکوپ اختلاف فاز نشان داد که بخش عمده‌ای از ذرات غیرسلولی موجود در سوسپانسیون نهایی سلولی خارهای کیتینی استحکام بخش مزانشیم و رابدیت‌ها هستند.
* **نتیجه‌گیری:** روش ارایه شده منجر به افزایش خلوص نئوبلاست‌ها تا حدود ۶۶ درصد می‌شود که روشی ارزان، سریع و پربازده برای استخراج نئوبلاست‌ها جهت استفاده در مطالعات پروتئوم و ترانس کریپتوم یا سایر روش‌های نیازمند حجم بالای سلول است.

* **کلیدواژگان:** سلول‌های بنیادی، کرم‌های پهن، پلاناریا، ترمیم

فصلنامه پزشکی یاخته، سال یازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۸، صفحات: ۱۴۱-۱۳۴

مقدمه

پلانارین‌های آب شیرین، کرم‌های پهن و کوچکی از شاخه کرم‌های پهن (Platyhelminthis) و رده تورکیان (Turbellaria) هستند که از ۲۰۰ سال قبل وارد علم زیست‌شناسی شدند (۱، ۲). توانایی ترمیم فوق‌العاده این جانوران در حدی است که طی آن یک قطعه در حدود ۱/۲۷۹ ام اندازه بدن توانایی ساختن یک کرم کامل را دارد (۳). ترمیم در این کرم پدیده مشهوری در زیست شناسی تکوینی کلاسیک است و نظریه‌های موجود در مورد انواع ترمیم در جانوران با مطالعه پلانارین‌ها وارد زیست‌شناسی شده است (۱، ۹-۴). ویژگی منحصر به فردی که پلانارین‌ها را تا این اندازه مورد توجه محققان زیست‌شناسی تکوینی قرار داده است، وجود خزانه‌ای دایمی از سلول‌های بنیادی تمام توان در بدن آنها ست که تقریبا تمامی ویژگی‌های خاص پلانارین‌ها (پلاستیسیته فوق‌العاده مورفولوژی آنها، توان ترمیم و...) به سبب داشتن این سلول‌های بنیادی است (۱، ۱۲-۹). این سلول‌ها برای اولین بار طی مطالعات بافت شناسی کلر و همکاران و تحت عنوان (Stammzellen Stem Cells) معرفی شدند (۴) که به سبب اندازه کوچک، هسته بزرگ و سیتوپلاسم باریکشان از سایر سلول‌ها متمایز شدند. تا دهه اول قرن بیستم نام‌های زیادی برای این سلول‌ها پیشنهاد شده بود که در نهایت نام نئوبلاست (Neoblast) را که یکی از پیشگامان مطالعه ترمیم پلانارین‌ها، هریت راندلف، برای نامیدن سلول‌هایی با مورفولوژی مشابه در کرم خاکی به کار برده بود، برای این سلول‌ها نیز عمومیت یافت (۴، ۱۲، ۱۳). نئوبلاست‌ها را طی مطالعه‌ای با میکروسکوپ نوری می‌توان از سایر سلول‌ها تشخیص داد؛ چون تنها گروه سلول‌های بدن پلاناریا با قطر ۱۰-۵ میکرومتر بوده و بدون اتصال به بستر خاصی تقریبا در سراسر مزانشیم پراکنده‌اند.

اولین گزارش موفق از جداسازی نئوبلاست‌ها به حدود ۴۰ سال پیش برمی‌گردد که بر اساس تمایل نئوبلاست‌ها به چسبیدن کف محیط‌های کشت عمل می‌کند (۱۴). متأسفانه نئوبلاست‌هایی که با این روش استخراج می‌شوند بیش از یک هفته در محیط‌های مغذی مخصوص نئوبلاست دوام نمی‌آورند. بیست سال بعد از این مطالعه، روشی مبتنی بر هضم آنزیمی کرم کامل ارایه شد که علاوه بر طولانی

Archive of SID
www.SID.ir

بودن فرایند استخراج، باعث مرگ تعداد زیادی از سلول‌های استخراج شده نیز شد (۱۵). از سوی دیگر، روش‌های نوین جدا سازی سلول‌ها (مثل روش FACS) که بر آنتی‌ژن‌های سطحی مبتنی هستند، به علت فقدان مارکرهای سطحی اختصاصی نئوبلاست‌ها قابل استفاده نیستند. البته اخیرا روشی برای جدا سازی نئوبلاست‌ها بر اساس نسبت نوکلئوپلاسمی آنها معرفی شده (۱۵) که به سبب سمی بودن رنگ‌های استفاده شده، سلول‌های جدا شده برای کارهای سلولی حتی برخی کارهای مولکولی قابل استفاده نیستند. روش دیگری نیز برای جدا سازی نئوبلاست‌ها با سانتریفیوژ سوسپانسیون سلولی در شیب‌های غلظت پرکل است (۱۶) که نسبت به سایر روش‌ها اثر کمتری روی خواص حیاتی نئوبلاست‌ها دارد اما این روش هم به سبب طولانی بودن زمان استخراج و هم محدودیت در تعداد سلول‌های استخراج شده در هر تکرار با مطالعات سلولی و مولکولی – که به تعداد زیادی سلول نیاز دارند – سازگاری ندارد.

همان‌طور که ملاحظه می‌شود، تمام روش‌های استخراج سلول‌های بنیادی پلاناریا دارای نقایصی هستند که باعث شده نتوان در آنالیزهایی با خروجی زیاد (مثل پروتئومیکس) از آنها استفاده کرد. شاید یکی از مهم‌ترین عوامل ناشناخته بودن سلول‌های بنیادی پلانارین‌ها تا به امروز فقدان روش مناسب برای جداسازی نئوبلاست‌ها باشد. به علاوه تنها با آنالیزهای مولکولی است که می‌توان به شناسایی مارکرهای اختصاصی یا مقایسه خواص پدید آورنده بنیادینگی در پلانارین‌ها و سایر موجودات امید داشت (۱).

در این پژوهش، روشی تازه برای جداسازی نئوبلاست‌های زنده در حجم زیاد (تا ده میلیون در ۵-۴ ساعت) معرفی شده است که در طراحی آن سعی شده است تا میزان خروجی هم از نظر کیفی (درصد سلول‌های مرده) و هم از نظر کمی (خلوص نئوبلاست‌ها در سوسپانسیون نهایی) بهینه شود. برای مشخص کردن نئوبلاست‌ها در محلول‌های استخراج شده با کمک حساسیت آنها به دوز های بالای پرتو ایکس (۲، ۴، ۱۷، ۱۸) گروه‌های دارای نئوبلاست و فاقد نئوبلاست (کنترل منفی) جهت اثبات میزان خلوص و کیفیت نئوبلاست‌های استخراج شده طراحی و با نمونه‌های سالم (بدون تابش پرتو ایکس) مقایسه شده‌اند.

مواد و روش‌ها

استخراج سلول

نمونه‌های پلانارین طبق مصوبه گروه اخلاق پزشکی پژوهشکده رویان تهیه شدند.

نمونه‌های پلانارین (*Dugesia sp.*) از چشمه‌ای در نزدیکی شهر دامغان جمع‌آوری و جهت مطالعه به آزمایشگاه منتقل شدند. بعد از انتقال در دمای تقریبی ۱۷-۱۵ درجه سانتی‌گراد و در ظروف ۵۰۰ میلی‌لیتری پلاستیکی حاوی آب چشمه استریل و ۰/۰۲ درصد نئومایسین سولفات نگهداری شدند. برای اطمینان از مناسب بودن گونه مورد مطالعه جهت استخراج نئوبلاست، گروهی از کرم‌ها از وسط نصف شدند تا از وجود و میزان توان ترمیم آنها اطمینان حاصل شود (شکل ۱).

از بین نمونه‌هایی که جهت انجام استخراج انتخاب شدند بعد از حداقل یک هفته گرسنگی، کرم‌هایی با اندازه تقریبی ۲۰-۱۷ میلی‌متر از بقیه جدا شده و به مدت ۲۴ ساعت در آب حاوی ۰/۰۵ درصد نئومایسین سولفات نگهداری شدند. در هر بار تکرار ۱۲-۱۰ کرم، بسته به میزان سلول مورد نیاز و اندازه، انتخاب و در ۱ سی‌سی محلول استریل نمکی مخصوص پلانارین‌ها که از ترکیب ۲۱۸۸ میلی‌گرم کلریدسدیم، ۳۱ میلی‌گرم کلرید کلسیم، ۶۳ میلی‌گرم بی‌کربنات سدیم، ۱۲۵ میلی‌گرم کلرید پتاسیم در یک لیتر آب تهیه شده بود، دو بار شسته شدند. سپس این کرم‌ها به یک هموژنیزر دستی (Sigma, D9938) حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر محلول نمکی منتقل شدند. با ۱۵-۱۲ بار جابه‌جایی پستل شل تر هوموژنیزر کرم‌ها کاملا خرد شده سپس به داخل لوله حاوی ۱۱-۱۰ میلی‌لیتر محلول نمکی منتقل شدند. این سوسپانسیون سلولی در ۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۶ دقیقه سانتریفیوژ شد و پلت حاصل با کوکتیل آنزیمی حاوی ۶۰۰ واحد بر میلی‌لیتر کلاژناز (Sigma, type IV C5138) و (460 Sig DNase -U/ml ma, DN-25) به مدت ۴۵-۳۰ دقیقه در دمای اتاق (بسته به دمای اتاق) تیمار شد. طی این مدت، نمونه‌ها هر ۸-۷ دقیقه توسط سمپلر ۱۰۰۰ پیپتاژ شدند. بعد از اتمام این مرحله، حجم سوسپانسیون به ۱۲ میلی‌لیتر رسانده شده و توسط محلول شست‌وشو دوبار در ۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۶ دقیقه شست‌وشو داده شد. پلت نهایی در ۱۰ میلی‌لیتر محلول نمکی حل شد سپس به ترتیب، از صافی‌های نایلونی با روزنه‌های 60 (Millipore) ،30 (Millipore NY60) ،41(Millipore NY41) ،20 (Millipore NY20) (NY30) و 11 (Millipore NY11) میکرومتر که توسط یک نگهدارنده (Millipore SX0002500) پلاستیکی به یک سرنگ ۵ میلی‌لیتری متصل شده بود، گذرانده شد. در همه مراحل سوسپانسیون بدون هیچ فشاری از صافی رد شد و بعد از عبور از هر صافی، ۲ میلی‌لیتر محلول نمکی نیز از صافی گذرانده شد. سوسپانسیون حاصل بعد از دو بار شست‌وشو در دور ۲۰۰۰ به مدت ۶ دقیقه به صورت پلت سلولی در آمده و قابل استفاده گشت.

شکل ۱: اثبات وجود ترمیم در گونه مورد مطالعه. علاوه بر ایجاد سر، تغییرات دستگاه گوارش و مراحل ایجاد حلق تازه نیز قابل مشاهده است (فلش‌های کوچک) خط مقیاس ۱۰ میلی‌متر

Archive of SID
www.SID.ir

ارزیابی کمی و کیفی سلول‌ها

گروه‌های آزمایشی

بر اساس مطالعات قبلی (۲، ۴، ۱۷، ۱۸) پرتو ایکس با دوز کافی باعث نابودی نئوبلاست‌ها می‌شود و سایر سلول‌ها بر اثر اشعه به ظاهر صدمه‌ای نمی‌بینند. به همین علت با تاباندن مقادیر کافی اشعه به کرم‌ها، می توان به نمونه‌هایی دست یافت که ۴۸-۲۴ ساعت بعد از پرتودهی، تمامی نئوبلاست‌های خود را از دست دهند. استفاده از چنین نمونه‌هایی از مدت‌ها پیش به عنوان کنترل منفی در مطالعه پلانارین‌ها مرسوم بوده و هست (۲، ۴، ۲۳-۱۹). با توجه به اختلافاتی که گاهی در دوز مناسب برای نابودی کل نئوبلاست‌ها وجود دارد، برای ایجاد گروه کنترل منفی از بالاترین دوز پیشنهاد شده، یعنی Gy30 - که ثابت شده تمامی فعالیت‌های وابسته به نئوبلاست‌ها را از بین می‌برد (۲)، استفاده شد. بدین‌منظور یک گروه از کرم‌ها که در معرض Gy30 پرتو X حاصل از چشمه کبالت ۶۰ قرار گرفته بودند، بعد از گذشت ۴۸ ساعت در دمای ۱۷-۱۵درجه سانتی گراد به همراه یک گروه کرم سالم وارد فرایند استخراج شده مقایسه شدند و در نهایت سوسپانسیون‌های حاصل از این دوگروه (کرم‌های پرتو دیده به عنوان کنترل منفی و کرم‌های سالم به عنوان گروه مثبت) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

تشخیص سلول‌های زنده و مرده

برای افزایش دقت و مشخص شدن سلول‌ها از سایر ناخالصی‌ها، سلول‌ها با هوخست ۳۳۳۴۲ (Sigma, St Louis, MO, USA) رنگ‌آمیزی شدند. با توجه به اهمیت جداسازی سلول‌های مرده از سلول‌های زنده برای انجام بسیاری از مطالعات و هم‌چنین برای اثبات کارایی روش ارایه شده در این مقاله، سلول‌های مرده با دو رویکرد شناسایی شدند. در رویکرد اول سلول‌های مرده با تریپان بلو رنگ‌آمیزی و با لام نئوبار شمارش شدند؛ در رویکرد دوم برای مشخص کردن سلول‌های مرده سوسپانسیون به مدت یک ساعت و نیم در دمای ۴درجه سانتی‌گراد با محلول ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر پروپودیوم یدید (Propidium Iodide) (Sigma, St Louis, MO, USA) تیمار شد و بعد از دوبار شست‌وشو با محلول نمکی مخصوص پلاناریا، فلوسایتومتری انجام شد.

فلوسایتومتری

در تحلیل‌های فلوسایتومتری، چهار پارامتر ثبت و بررسی شد که عبارتند از: میزان جذب هوخست ۳۳۳۴۲، میزان جذب پروپودیوم یدید، پراکنش مستقیم نور (Forward Scatter; FCS) (میزان نوری که به طور مستقیم از سلول عبور می‌کند و مؤید اندازه سلول است) و نورهای پراکنش یافته جانبی (Side Scatter; SSC) (یا پرتوهایی که بعد از برخورد با ذرات درون سلول به اطراف پراکنده می‌شوند و نشانگر چگالی و جنس مواد درون سلول هستند). رنگ هوخست برای مشخص کردن سلول‌ها از ذرات غیرسلولی و پروپودیوم یدید برای رنگ‌آمیزی سلول‌های مرده به کار برده شد. FSC، نشانگر اندازه و شکل ذرات و SSC، بیانگر میزان گرانولیتی (به عنوان مثال چگالی ذرات درون سلول) است. فلوسایتومتری با دستگاه Partech مدل PAS (پژوهشکده رویان) انجام گرفت.

یافته‌ها

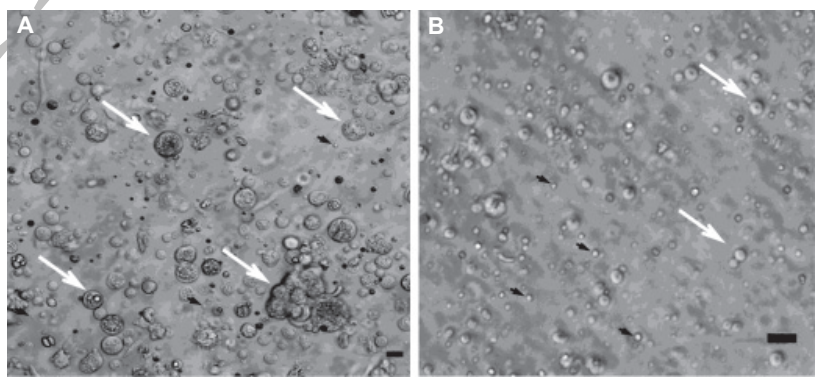
جداسازی سلول‌های نئوبلاست

کرم های پلانارین‌های مورد نظر به دنبال دو نیمه شدن، طی دو هفته به طور کامل ترمیم شدند (شکل ۱).

از هر ۱۲-۱۰ کرم با اندازه تقریبی ۱۸ میلی متر حدود ۳/۰-۲/۶ میلیون سلول استخراج شد. از نظر ظاهری سلول‌های استخراج شده با سوسپانسیون سلول قبل از فرایند استخراج تفاوت زیادی دارند که نشان دهنده افزایش قابل ملاحظه خلوص سلول‌های بنیادی در پایان فرایند استخراج است (شکل۲).

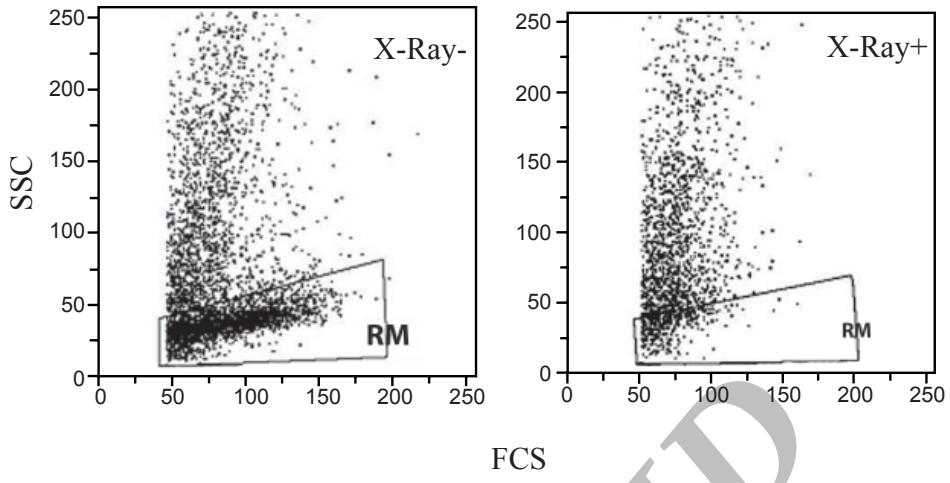
خلوص نئوبلاست‌ها در سوسپانسیون نهایی

برای اینکه بتوان به طور قطع و اطمینان، نئوبلاست‌ها را در سوسپانسیون نهایی تخمین زد، یک راه استفاده از پرتو X موجود است که در صورت استفاده از دوزهای مناسب، می‌توان آنها را از بین برد (۲، ۱۴). در این مطالعه نیز از پلانارین‌هایی که Gy ۳۰ پرتو X دریافت کرده بودند به عنوان کنترل منفی استفاده شد. سوسپانسیون سلولی این کرم‌ها، ۴۸ ساعت بعد از دریافت پرتو به همراه یک گروه از کرم‌های سالم، در شرایط مساوی استخراج شد و سلول‌های حاصل با فلوسایتومتری مقایسه شدند. در این بررسی علاوه بر اندازه و گرانولیته از رنگ‌آمیزی با هوخست ۳۳۳۴۲ نیز استفاده شد. (برای اطمینان بیشتر آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند.) همان طور که در شکل ۳ ملاحظه می‌شود، تفاوت زیادی بین سلول‌های استخراج شده از نمونه‌های سالم و پرتو دیده وجود دارد.



شکل ۲: مقایسه ویژگی‌های ظاهری سوسپانسیون استخراج شده پیش (چپ) و پس (راست) از طی فرایند استخراج.
فلش‌های سفید سلول‌های تمایز یافته و مواد غیرسلولی و پیکان‌های تیره و کوچک نئوبلاست‌ها را نشان می‌دهند (خط مقیاس ۲۰ میکرومتر).

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۳: مقایسه سوسپانسیون حاصل از پلانارین‌های پرتو دیده و طبیعی بر اساس FSC و SSC. گیت R1 ناحیه‌ایی را که نئوبلاست‌ها در آن قرار دارند را نشان می‌دهد.

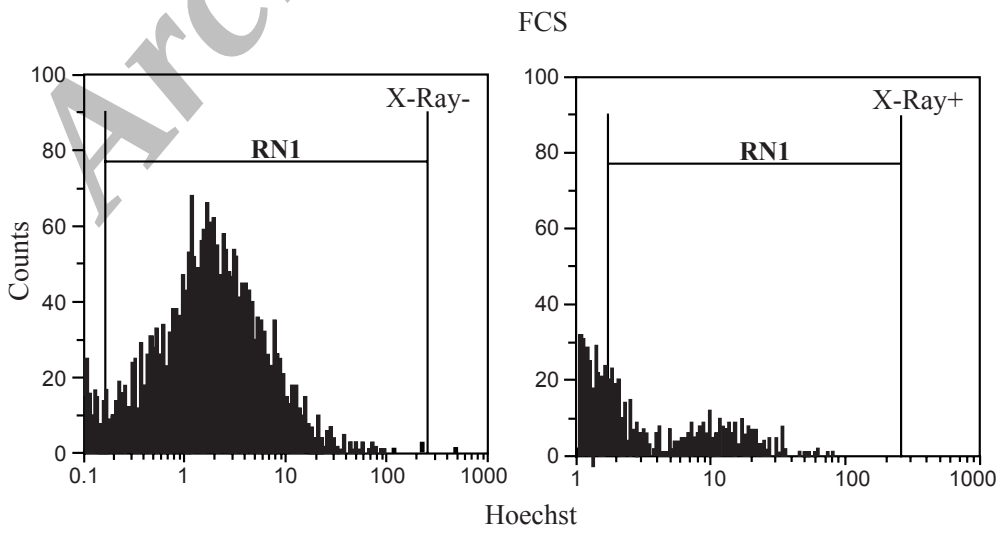
نتایج بررسی، کمتر نشان می‌دهد که در کرم‌های سالم حدود ۵/۴ ± ۶۰/۳ درصد از ذرات در ناحیه R1 قرار می‌گیرند در حالی که در نمونه‌های پرتو دیده این مقدار ۲/۶ ± ۷/۸ درصد بود. به علاوه، میانگین مقادیر FSC این ذرات در ناحیه R1 در کرم‌های سالم ۱۷/۸ ± ۸۴/۷ و در کرم‌های پرتو دیده حدود ۹/۵ ± ۶۴/۳ است. مقادیر SSC نیز از ۶/۳ ± ۲۹/۹ در نمونه سالم به حدود ۴/۹ ± ۲۷/۳ در نمونه‌های پرتو دیده رسیده است. برای اینکه مشخص شود ذرات مشاهده شده در شکل ۲ سلول هستند، از رنگ هوخست ۳۳۳۴۲ استفاده شد. نتایج فلوسایتومتری در شکل ۴ ارایه شده است.

در نمونه‌های طبیعی حدود ۸۳ درصد ذرات با رنگ هوخست که به DNA متصل می‌شود، رنگ شده‌اند که بعد از پرتودهی حدود ۵۰ درصد ذرات هوخست مثبت است یا سلول‌ها از بین رفته‌اند.

ارزیابی کمی و کیفی سلول‌ها

بیش از ۸۳ درصد از ذرات موجود در سوسپانسیون نهایی، سلول و کمتر از ۱۷درصد ذرات غیرسلولی بودند. بیش از ۶۰ درصد از سلول‌های استخراج شده (۶۶-۶۲ درصد) سلول‌های حساس به پرتو هستند و بر اثر تیمار با پرتو از بین می‌روند. سوسپانسیون سلولی در دور ۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و سلول‌ها با آب دوبار تقطیر استریل لیز شدند. بررسی محلول نهایی با میکروسکوپ اختلاف فاز نشان داد که بخش عمده‌ای از این ذرات غیرسلولی خارهای کیتینی استحکام بخش مزانشیم و رابدیت‌ها (میله‌های داخل سیتوپلاسم برخی از سلول‌های مزانشیمی که در بستن زخم نقش دارند) بوده‌اند که قطر آنها بین ۵ تا ۲۰ میکرومتر است (شکل ۵).

رنگ‌آمیزی سلول‌های استخراج شده با تریپان بلو برای ۶ استخراج هم‌سان انجام شد که در هر یک حداقل ۱۰ بار شمارش انجام شده بود.



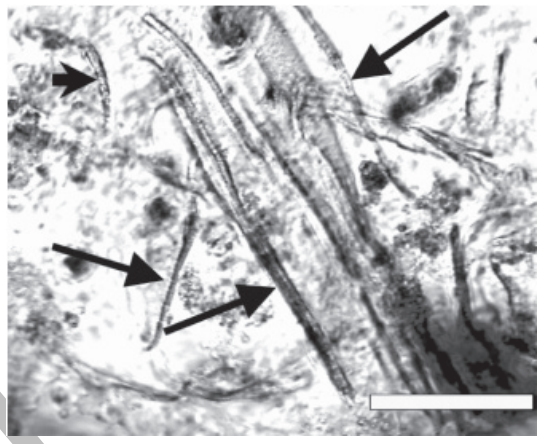
شکل ۴: مقایسه سوسپانسیون حاصل از پلانارین‌های پرتو دیده و طبیعی بر اساس میزان جذب رنگ هوخست ۳۳۳۴۲. گیت RN1 در سوسپانسیون حاصل از نمونه‌های وحشی ۸۳/۴ درصد و در نمونه‌های پرتو دیده ۲۹/۹ درصد از کل ذرات را شامل می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

این شمارش‌ها نشان می‌دهند که بین ۱۲/۳۶ تا ۲۴/۵۳درصد (به طور متوسط ۱۸/۲۵درصد) از سلول‌های استخراج شده مرده هستند. علاوه بر رنگ‌آمیزی با تریپان‌بلو از پروپودیوم‌یدید نیز برای رنگ‌آمیزی سلول‌های مرده استفاده و نتایج آن توسط فلوسایتومتری تحلیل شد.

نتایج این آنالیز نیز تا حدی نزدیک به نتایج شمارش سلول‌ها با میکروسکوپ نوری و بین ۹/۸ تا ۱۸/۲ با میانگین ۱۶/۶ درصد است.



شکل ۵: عکس خارهای مزانشیمی (پیکان‌های بزرگ) و رابدیت‌ها (فلش کوچک) در سوسپانسیون استخراج شده بعد از لیز کردن سلول‌ها در آب مقطر استریل با استفاده از میکروسکوپ اینورت (خط مقیاس میکرومتر ۲۰).

بحث

بررسی سلول‌های استخراج شده با کمک میکروسکوپ اختلاف فاز، قبل و بعد از فیلتر شدن نشان می‌دهد که اکثر سلول‌های تمایز یافته از صافی‌ها عبور نکرده‌اند. البته نمی‌توان با قطعیت درباره میزان خلوص نئوبلاست‌ها در سوسپانسیون نهایی اظهار نظر کرد، به علاوه با میکروسکوپ اختلاف فاز نمی‌توان بین برخی از سلول‌ها و سایر مواد مثل خار های مزانشیمی تفاوت چندانی ملاحظه کرد به همین علت نیز برای اطمینان از کارایی روش ارایه شده از آنالیزهای فلوسایتومتری استفاده شده است. سوسپانسیون نهایی دارای ذراتی با اندازه و گرانولیتی بسیار متنوع است. در این بین سلول‌های بنیادی از سایر ذرات، گرانولیتی کمتری دارند که به سبب سیتوپلاسم بسیار کم و فاقد ناحیه بندی آنهاست (۴) که باعث ایجاد حداقل پراکندگی در پرتوهای تابشی می‌شود. با این حال باید توجه داشت که در نمونه‌های پرتو دیده نیز مقداری از ذرات (۷/۸ درصد) از نظر SSC مشابه نئوبلاست‌ها هستند. این تشابه با توجه به عدم تغییر معنی‌دار در SSC در نمونه‌های سالم (۶/۳ ± ۲۹/۹) و پرتو دیده (۴/۹ ± ۲۷/۳) بهتر مشخص می‌گردد. باید توجه داشت که سلول‌های حساس به پرتو، از نظر FSC تنوع قابل ملاحظه‌ایی دارند (۱۷/۸ ± ۸۴/۷ درصد). این تنوع در FSC نشان دهنده تنوع اندازه این سلول‌هاست که نشان می‌دهد علاوه بر نئوبلاست‌ها، احتمالا تعدادی از سلول‌های حاصل از تقسیم نامتقارن آنها وجود دارد که از نظر مورفولوژی و بیان مارکرهای شناخته شده اختصاصی نئوبلاست‌ها تفاوتی با آنها نشان نمی‌دهد. اما نسبت به نئوبلاست‌ها توان کمتری دارند. باید توجه داشت که این گروه از سلول‌های به احتمال زیاد متعهد، تا کنون به طور خالص جدا نشده‌اند و ویژگی‌های آنها نیز ناشناخته است (۱۴). این نئوبلاست‌ها به میزان اندکی بزرگترند (۱۴). همان طور که ذکر شد رنگ هوخست ۳۳۳۴۲ به طور خاصی هسته را رنگ‌آمیزی می‌کند به همین علت جذب آن نیز می‌تواند نشانه خوبی برای جدا سازی سلول‌ها از مواد غیرسلولی باشد. با توجه به شکل ۴ ملاحظه می‌شود در کرم‌های سالم، حدود ۸/۱ ± ۸۳ درصد از ذرات استخراج شده هوخست مثبت و به عبارت دیگر سلول هستند. قرار گرفتن در معرض Gy30 پرتو، موجب نابودی حدود ۶/۹ ± ۵۳/۵ درصد از سلول‌ها شده است. با در نظر گرفتن این مسئله که حدود ۱۷ درصد از کل ذرات، غیرسلولی و اغلب از جنس کیتین هستند، مشخص می‌شود در سوسپانسیون‌های حاصل از این روش ۶۶-۶۲درصد از سلول‌ها نئوبلاست هستند که نشان دهنده کارایی بالای این روش برای دست‌یابی به سلول‌های بنیادی پلانارین است. شایان ذکر است که حضور این ذرات در سوسپانسیون سلولی، چه در آنالیز پروتئین‌ها و اسیدهای نوکئیک و چه در استخراج سلول برای مطالعات سلولی اختلالی ایجاد نمی‌کند زیرا در آنالیزهای مولکولی، این ذرات کربوهیدراتی در مرحله استخراج حذف می‌شوند و در مطالعات سلولی هم بعد از اندک مدتی با شست‌وشوی محیط از محیط خارج می‌شوند.

لازم به یاد آوری است، روش‌هایی که تا کنون برای جداسازی نئوبلاست‌ها پیشنهاد شده، بیشتر بر مبنای اندازه کوچک این سلول‌ها شکل گرفته است. از آنجا که این روش‌ها برای مطالعات سلولی طراحی شده، دو مورد در آنها لحاظ نشده است؛ نخست اینکه زنده ماندن سلول‌های استخراج شده در درجه اول اهمیت نبوده (چون سلول‌های استخراج شده در محیط کشت از سلول‌های مرده جدا می‌شوند) و دوم آنکه در اکثر آنها تعداد سلول استخراج شده حداکثر چندصدهزار بوده است. این دو ویژگی که در استخراج سلول جهت بهینه‌سازی شرایط کشت، آزمایش اثر برخی از مواد و یا برای مطالعه فراساختار اهمیت چندانی ندارد، در آنالیزهای مولکولی پر بازده (High Throughput) باعث ایجاد خطا در نتایج می‌گردد (۱). از سوی دیگر، بیشتر این روش‌ها یک فرایند چند ساعته تا چند روزه را شامل می‌شود که در دمای اتاق یا دمای ۱۸درجه سانتی‌گراد پیش برده می شود. توقف چند ساعته سلول ها در این شرایط استرس زا می تواند موجب بروز تغییرات پایداری در ترانس‌کریپتوم و پروتئوم آنها بشود. بدین ترتیب، روش استخراجی که برای مطالعات مولکولی نئوبلاست‌ها به کار می رود، باید علاوه بر خروجی زیاد با خلوص قابل قبول، زیاد طولانی نباشد و از نظر دمایی، شرایط مناسبی برای فعالیت آنزیم‌های پروتئاز، RNase و غیره را فراهم نیاورد. روشی که در این مقاله معرفی شد از نظر تعداد سلول‌های استخراج شده محدودیتی ندارد. به عنوان مثال همان طور که ذکر شد در گونه مورد بررسی از هر ۱۲-۱۰ کرم با اندازه متوسط ۱۸ میلی متر بین ۳-۲/۶ میلیون سلول در زمانی کمتر از دو ساعت استخراج می‌شود. اگر فرایند استخراج در دمای اتاق پیش برده شود، حدود ۱۶/۶ (آنالیز فلوسایتومتری) تا ۱۸/۲۵درصد (رنگ‌آمیزی با متیلن‌بلو و شمارش با لام‌نئوبار) از سلول‌ها می‌میرند. اگر محلول‌ها، ظروف و کرم‌ها حدود ۲ ساعت پیش از استخراج در یخچال قرار داده و در طول آزمایش به تدریج از یخچال خارج و استفاده شوند،

Archive of SID

www.SID.ir

تعداد سلول‌های مرده حدود ۵- ۴ درصد کاهش می‌یابد (نتایج نشان داده نشده است). بدین ترتیب با توجه به نتایج فلوسیتومتری، از هر ۱۲-۱۰ کرم بین ۲-۱/۵ میلیون نئوبلاست استخراج می‌شود. اخیرا، روش تازه‌ای برای جداسازی نئوبلاست‌های حساس به پرتو X بر اساس نسبت نوکلئوپلاسمی سلول‌ها با روش FACS یا (Florescent Activated Cell Sorting) معرفی شده است (۱۵) که خلوص نئوبلاست‌ها را با این روش به حدود ۶۷ درصد رسانده‌اند اما باید توجه کرد که در گیت‌های مشخص شده در این روش از کرم‌هایی که تنها Rad 12 پرتو دریافت کرده‌اند استفاده شده است. مطالعات اخیر نشان داده که گروهی از نئوبلاست‌ها حتی در دوز 5 Gy هم زنده می‌مانند (۲).

نتیجه‌گیری

پس با استفاده از RAD 12 پرتو که تنها بخشی از نئوبلاست‌ها را از بین می‌برد، نمی‌توان مطمئن بود که در آنالیز های فلوسایتومتری و FACS تمامی نئوبلاست‌ها مشخص و جدا شده‌اند. به همین علت، این روش باید اصلاح شده و با استفاده از دوزهای مختلف و به اندازه کافی و قوی، نمونه‌های کنترل منفی مناسب برای آن طراحی شود سپس کارایی آن مورد ارزیابی قرار گیرد. این نقص در روش ارایه شده در این مقاله وجود ندارد زیرا جزو روش‌هایی است که نئوبلاست‌ها را بر پایه اندازه جدا می‌کند و همه نئوبلاست‌های پلاناریا، اعم از حساس به پرتو و غیرحساس به پرتو که از نظر اندازه و مورفولوژی تفاوت زیادی ندارند، در سوسپانسیون نهایی وجود دارند. به علاوه مدت زمان کوتاه فرایند استخراج، خلوص مناسب و حجم قابل تنظیم سلول‌های استخراج شده به همراه شست‌وشوهای متوالی هم باعث حداقل مرگ و میر در سلول‌های استخراج شده می‌گردد و هم استرس وارد به سلول‌ها را تا حد زیادی کاهش می‌دهد. بدین‌ترتیب، این روش جدید علاوه بر اینکه می‌تواند به عنوان راهی برای استخراج سلول جهت انجام مطالعات سلولی به کار برده شود، درصورت استفاده در کنار نمونه‌های پرتو دیده به عنوان کنترل منفی (۲) و استفاده از دودمان‌های تک نیا، بالقوه، مناسب‌ترین روش جهت آماده‌سازی سلول برای انجام مطالعات مولکولی مختلف که نیاز به تعداد زیادی سلول دارند نیز می‌باشد.

تقدیر و تشکر

هزینه‌های انجام این طرح از سوی پژوهشکده رویان پرداخت شده است.

References

1. Sanchez Alvarado A. Regeneration in the metazoans: why does it happen? Bioessays. 2000; 22: 578-590.
2. Rossi L, Salvetti A, Marincola FM, Lena A, Deri P, Mannini L, et al. Deciphering the molecular machinery of stem cells: a look at the neoblast gene expression profile. Genome Biol. 2007; 8: R62.
3. Morgan TH. Experimental studies of the regeneration of Planaria maculata. Dev Genes Evol. 1898; 7: 364-397.
4. Reddien PW, Sanchez Alvarado A. Fundamentals of planarian regeneration. Annu Rev Cell Dev Biol. 2004; 20: 725-757.
5. Funayama N, Nakatsukasa M, Hayashi T, Agata K. Isolation of the choanocyte in the fresh water sponge, Ephydatia fluviatilis and its lineage marker, Ef annexin. Dev Growth Differ. 2005; 47: 243-253.
6. Sanchez Alvarado A, Kang H. Multicellularity, stem cells, and the neoblasts of the planarian Schmidtea mediterranea. Exp Cell Res. 2005; 306: 299-308.
7. Sanchez Alvarado A, Newmark PA, Robb SM, Juste R. The Schmidtea mediterranea database as a molecular resource for studying platyhelminthes, stem cells and regeneration. Development. 2002; 129: 5659-5665.
8. Asami M, Nakatsuka T, Hayashi T, Kou K, Kagawa H, Agata K. Cultivation and characterization of planarian neuronal cells isolated by fluorescence activated cell sorting (FACS). Zoolog Sci. 2002; 19: 1257-1265.
9. Reddien PW, Bermange AL, Murfitt KJ, Jennings JR, Sanchez Alvarado A. Identification of genes needed for regeneration, stem cell function, and tissue homeostasis by systematic gene perturbation in planaria. Dev Cell. 2005; 8: 635-649.
10. Newmark PA, Sanchez Alvarado A. Not your father's planarian: a classic model enters the era of functional genomics. Nat Rev Genet. 2002; 3: 210-219.
11. Peter R, Gschwentner R, Schürmann W, Rieger RM, Ladurner P. The significance of stem cells in free-living flatworms: one common source for all cells in the adult. Journal of Applied Biomedicine. 2004; 2: 21-35.
12. Salo E, Baguna J. Regeneration in planarians and other worms: New findings, new tools, and new perspectives. J Exp Zool. 2002; 292: 528-539.
13. Chandebois R. General mechanisms of regeneration as elucidated by experiments of planarians and by a new formulation of the morphogenetic field concept. Acta Biotheor. 1973; 22: 2-33.
14. Betchaku T. The cellular mechanism of the formation of a regeneration blastema of fresh-water planaria, Dugesia dorotocephala. I. The behavior of cells in a tiny body fragment isolated in vitro. J Exp Zool. 1970; 174: 253-279.
15. Hayashi T, Asami M, Higuchi S, Shibata N, Agata K. Isolation of planarian X-ray-sensitive stem cells by fluorescence-activated cell sorting. Dev Growth Differ. 2006 ;48: 371-380.
16. Ziller-Sengel C. [Investigation of the inhibition of the regeneration of the planarian pharynx. II. Variations of the amount of the inhibitor dependent on the species and the phase of regeneration]. J Embryol Exp Morphol. 1967; 18: 107-119.
17. Krichinskaia EB. Cellular origins of regeneration in planarians. Current concepts of neoblasts. Arkh Anat Gistol Embriol. 1980; 79: 102-109.
18. Sato K, Shibata N, Orii H, Amikura R, Sakurai T, Agata K, et al. Identification and origin of the germline stem cells as revealed by the expression of nanos-related gene in planarians. Dev Growth Differ. 2006; 48: 615-628.
19. Rossi L, Salvetti A, Lena A, Batistoni R, Deri P,

Archive of SID

www.SID.ir

Pugliesi C, et al. DjPiwi-1, a member of the PAZ-Piwi gene family, defines a subpopulation of planarian stem cells. Dev Genes Evol. 2006; 216: 335-346.
20. Orii H, Sakurai T, Watanabe K. Distribution of the stem cells (neoblasts) in the planarian Dugesia japonica. Dev Genes Evol. 2005; 215: 143-157.
21. Salo E, Baguna J. Cell movement in intact and regenerating planarians. Quantitation using chromosomal, nuclear and cytoplasmic markers. J Embryol Exp Morphol. 1985; 89: 57-70.
22. Steele VE, Lange CS. Effects of irradiation on stem cell response to differentiation inhibitors in the planarian Dugesia etrusca. Radiat Res. 1976; 67: 21-29.
23. Kalafatic M, Kopjar N, Besendorfer V. The impairments of neoblast division in regenerating planarian Polycelis felina (Daly.) caused by in vitro treatment with cadmium sulfate. Toxicol In Vitro. 2004; 18: 99-107.

Archive of SID

www.SID.ir

Original Article

A Simple Method for Isolation of Neoblasts from Planaria

Hamed Chitsazan, M.Sc.[1], Hamid Gourabi, Ph.D.[2], Ali Jabbary Arfae, M.Sc.[3], Hossein Baharvand, Ph.D.[1, 4*]

1. Stem Cells and Developmental Biology Department, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran
2. Genetics Department, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran
3. Radiotherapy Department, Shohada Hospital, Tehran, Iran
4. Developmental Biology Department, University of Science and Culture, Tehran, Iran

** Corresponding Address: P.O.Box: 19395-4644, Stem Cells and Developmental Biology Department, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran*
Email: Baharvand@royaninstitute.com

Received: 2/Apr/2007, Accepted: 6/Jul/2008

Abstract

Objective: Freshwater planarians were used as models for studying metazoan regeneration and stem cell biology. Here a simple, fast and high throughput method for extracting their stem cells (neoblasts) is represented.

Materials and Methods: Specimens of the Dugesia sp with an average length of 18 mm were homogenized by a glass Dounce tissue grinder which contained about 1 ml of planarian saline solution. The extracted suspension was serially filtered by 60, 41, 30, 20 and 11 µm nylon meshes. In order to obtain purified neoblasts in the final suspension; this suspension has been compared with a cell suspension from 30 Gy irradiated worms. Hoechst 33342 was used to determine cells from non-cellular particles; methylene blue and propidium iodide were used to detect the number of dead cells in each extraction.

Results: About 2.6-3 million cells were extracted from 10-12 worms. Flow cytometry analysis showed about 83% of the extracted particles were cells. In suspensions from irradiated animals, about 50% of the cells were absent, the final suspension contained about 62-66% neoblasts and about 17% non-cellular particles. When these extracts were treated with distilled water to destroy the cells, only rabdites and chitinous spines of the parenchyma were observed in the extract.

Conclusion: Results show that the purity of neoblasts in the final suspension is about 66%. Non-cellular particles have a carbohydrate nature and, therefore, this extraction method is completely compatible with molecular (e.g. proteomics and transcriptomics) and cellular methods (e.g. neoblast culture).

Keywords: Stem Cells, Flatworms, Planarian, Regeneration

Yakhteh Medical Journal, Vol 11, No 2, Summer 2009, Pages: 134-141

Archive of SID

www.SID.ir