مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد
سال یازدهم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۸۲، ص ۴۹

جداسازی سلولهای بنیادی جنین موش در مرحله‌ی بلاستوسیست

علی اکبر موثق پور اکبری [۱]، دکتر مژده صالح‌نیا [۲]، دکتر علی اکبر پورفتح الله [۳]، دکتر سید محمد مؤذنی [٤]

چکیده

مقدمه: سلولهای بنیادی جنین، سلولهای چند ظرفیتی هستند که از جنین در مراحل اولیه تکوین تهیه می‌شوند و دارای ویژگی‌های منحصر به فردی می‌باشند: از جمله توانایی تمایز به انواع رده‌های سلولی و نیز استفاده آنها در آزمایشات دستکاری ژنتیکی که به همین دلیل از این سلولها در تولید جانوران ترانس ژن و نیز سلول درمانی استفاده می‌شود. هدف اصلی این تحقیق جداسازی، کشت‌وتولیدسلول‌های‌بنیادی‌جنینی‌بوده که برای اولین بار در ایران انجام شده، لذا می‌توان در تحقیقات بعدی از آنها استفاده نمود.

روش بررسی: تعداد ۳۸۵ جنین در مرحله بلاستوسیست از موش‌های حامله‌ی نژاد NMRI تهیه شده و در محیط DMEMحاوی ۱۰٪ سرم جنین گاو به مدت ۲٤ ساعت کشت شدند. ۲ تا ٤ روز پس از خروج جنین‌ها از زونا پلوسیدا، سلول‌های توده داخل سلولی (Inter Cell Mass) تشکیل کلون داده که براساس مرفولوژی مورد شناسایی قرار گرفتند. پس از تریپسینه شدن، سلول‌های مذکور با دو روش متفاوت جهت به دست آوردن کلون سلول‌های بنیادی جنینی کشت داده شدند. در روش اول، حدود ۵۰ توده داخل سلولی پس از تریپسینه شدن بر روی سلول‌های فیبروبلاست اولیه جنین موش که قبلاً فعالیت میتوزی آنها با استفاده از میتومایسین متوقف شده بود منتقل شدند. در روش دوم، تعداد ۳۳۵ توده داخل سلولی پس از تریپسینه شدن در محیط کشت DMEMحاوی ۱۰٪ سرم جنین گاو و Leukemia Inhibitory Factor به میزان ۱۰۰۰ U/ml و ۰/۱ میلی‌مول بتامرکاپتواتانول کشت داده شدند. پس از ظهور کلون‌های مربوط به سلول‌های بنیادی جنینی در هر یک از روشهای مذکور، چندین ساب‌کالچر از آنها تهیه و به روش هیستوشیمی آلکالن فسفاتاز مورد شناسایی قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که روش اول موفق نبود اما می‌توان با روش دوم از بلاستوسیست موش نژادNMRI سلول‌های بنیادی را جدا و تکثیر نمود، کرچه درصد کمی کلون سلولی ایجاد شدند. همچنین استفاده از فیبروبلاست اولیه جنین موش به عنوان لایه‌ی پشتیبان به تنهایی در جلوگیری و مهار تمایز و همچنین فرایند تکثیری سلول‌های بنیادی جنینی در نژاد NMRI مؤثر نبود.

نتیجه‌گیری: در مجموع می‌توان با بهبود شرایط، به تولید سلول‌های بنیادی جنین موش پرداخت و از آنها در مطالعات پایه‌ای مثل تمایزشان به رده‌های خاص سلولی، تولید جانوران ترانس ژن، سلول درمانی، ایجاد تغییرات ژنی هدفمند (Gene Targeting) و غیره استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی جنینی ، جنین موش ، فاکتور مهارکننده لوسمی(LIF)

مقدمه

جنین موش در مراحل اولیه تکامل خود به صورت گذرا و موقتی حاوی جمعیتی از سلول‌های بنیادی چند ظرفیتی است که این سلول‌ها در مراحل بعدی فرایند تکوینی و پس از دوران جنینی، مسئول به وجود آوردن بافت‌های مختلف بدن می‌باشند.

۱- دانشجوی دکتری، گروه هماتولوژی
۲-استادیار گروه علوم تشریحی
۳و٤-دانشیار گروه ایمونولوژی و هماتولوژی
دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران [۱و۲و۳و٤]

www.SID.ir

خصوصیات و ویژگی‌های سلول‌های بنیادی جنین موش و توانایی جداسازی و تکثیر آنها در محیط کشت in vitro این امکان را فراهم ساخته تا محققین از این سلول‌ها مستقیماً بهره‌برداری نمایند. کشف این موضوع موجب شده دریچه‌ای در علم بیولوژی برای یافتن علل و مکانیزم‌های کلی و عمومی دخیل در کنترل سلول بنیادی و همچنین تشخیص و تعیین هویت فاکتورهای تنظیمی که نقش کلیدی دارند، کشوده شود. علاوه بر این، دستکاری ژنتیکی سلول‌های بنیادی جنینی مسیری خارق‌العاده و بی نظیر را برای انجام آزمایشات تداخلی در مراحل مختلف تکامل و رشد پستانداران و همچنین ایجاد تغییرات و تبادلات اطلاعات ژنتیکی کنترل شده در germ line موش ایجاد نموده است [۱و۴].

سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌هایی هستند که بالقوه چند ظرفیتی بوده و اغلب از توده داخل سلولی جنین در مرحله بلاستوسیست به دست می‌آیند. این سلول‌ها دارای ویژگی‌های منحصر به فردی هستند از جمله: این سلول‌ها، خاصیت نامیرایی داشته که به صورت طبیعی و بدون ایجاد جهش ژنی و یا آلودکی ویروسی این حالت را از خود نشان می‌دهند و این توانایی را دارند که به انواع رده‌های سلولی تمایز یابند و به راحتی می‌توان در آزمایشات مربوط به دستکاری ژنتیکی استفاده نمود. به همین دلیل از سلول‌های بنیادی جنینی در تحقیقات جدیدی همچون تولید و تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به رده‌های خاص و سپس پیوند آنها به بدن تحت عنوان سلول درمانی و نیز در تولید حیوانات ترانس ژنتیک بهره می‌برند [۵،۶].

کاربرد سلول‌های بنیادی جنینی از سال ۱۹۸۱ شروع شده است[۷و۸] و برای اولین بار این سلولها بوسیله کشت همزمان آنها بر لایه پشتیبان جدا شدند. لایه پشتیبان از فیبروبلاست اولیه جنین موش به دست آمده که قبل از انتقال سلول‌های بنیادی بر روی آنها فعالیت میتوزی شان متوقف شده بود [۷]. سلول‌های مذکور ماده‌ای را ترشح می‌کنند که اثر بازدارندگی قوی بر تمایز سلولی دارد [۹]. این فاکتور ماکرومولکولی، قادر است از تمایز سلول‌های کارسینومای جنینی و سلول‌های بنیادی جنینی به طور کامل جلوگیری نموده و شرایطی را فراهم سازد تا این سلول‌ها به صورت Monoculture کشت داده شوند. خالص‌سازی فاکتور DIA نشان داد که فعالیت آن مربوط به قسمتی از یک گلیکوپروتئین تک رشته‌ای است که دارای وزن مولکولی ۴۳ هزار دالتون بوده و خاصیت آب‌گریزی دارد. بعدها معلوم شد که DIA با فاکتور تنظیم کننده‌ی رده‌ی میلوئیدی که تحت عنوان فاکتور D و یا فاکتوری که قبلاً به عنوان فاکتور مهارکننده لوسمی توصیف شده یکسان می‌باشد [۱۱،۱۲].

در ابتدا وجود لایه پشتیبان برای حفظ سلول‌های بنیادی جنینی ضروری به نظر می‌رسید ولی بعدها با آزمایشات بیشتر مشخص شد که چنانچه به محیط کشت حاوی سرم جنینی گاو ، ماده شیمیایی بتامرکاپتواتانول افزوده شود سلول‌ها دارای طول عمر وبقای طبیعی خواهند بود [۱۳]. در چنین شرایطی، زمانی که سلول‌های بنیادی جنینی در غیاب لایه‌ی پشتیبان کشت داده شوند تمایز وسیعی پیدا می‌کنند که این حالت بیان می‌کند که تکثیر سلول‌هایی با فنوتیپ سلول‌های بنیادی مستلزم سرکوب نمودن تمایز سلولی و سرعت بخشیدن در امر فرایند خود تکثیری آنها می‌باشد.

تاکنون سلولهای بنیادی جنین از گونه‌های مختلف جانوری مثل انسان، موش، میمون، پریماتهاو غیره و بیشتر در مرحله بلاستوسیست تهیه شده [۴،۱۴،۱۸] و استفاده‌های وسیعی از آن‌ها در تحقیقات جدید بیوتکنولوژی حاصل شده است بخصوص که رده‌های خاصی از سلولهای بنیادی جنین انسانی نیز حاصل شده است [۱۹،۲۰]. علی رغم مشکلات فراوان، روز به روز تحقیقات در این خصوص وسعت می‌یابد. با توجه به اهمیت و ضرورت‌های بیان شده در خصوص استفاده‌هایی که می‌توان از سلولهای بنیادی جنین داشت و با عنایت به‌این نکته که تاکنون سابقه‌ای در خصوص تولید و استفاده از این سلولها در ایران بدست نیامده، دراین تحقیق سعی شد پس از تهیه جنین مرحله‌ی بلاستوسیست از موش نژاد NMRI و خروج آنها از زونا، کلونی‌های تشکیل شده از توده داخلی سلولی (ICM) را جدا و با مهار تمایز آنها با استفاده از فاکتور LIF آنها را ایزوله و تکثیر نموده تا بتوان در تحقیقات بعدی از آنها سود جست.

Archive of SID

www.SID.ir

روش بررسی

تهیه جنین

در تحقیق حاضر از موش‌های نر و ماده‌ی نژاد NMRI با سن ۱۲-۸ هفته که از انستیتو رازی تهیه شده بودند، استفاده گردید. دوره روشنایی و تاریکی حیوانخانه ۱۲ ساعت بود. به منظور تحریک تخمک‌گذاری موش‌های ماده، مقدار ۷/۵ واحد بین‌المللی HMG (Human Menopausal Gonadotropin) و پس از ٤٨ ساعت ۷/۵ واحد Chroionic (Human Gouadotropin) HCG از طریق داخل صفاقی تزریق شد. پس از جفت‌گیری و تعیین حاملگی با بررسی پلاک واژن و گذشت ٤ تا ٥/٤ روز، موشها با جابجایی مهره‌های گردنی کشته و لوله‌های رحمی آنها خارج و با روش Flushing جنین‌های بلاستوسیست به دست آمده در محیط کشت DMEM قرار داده شدند.

تهیه فیبروبلاست جنینی

پس از تهیه جنین‌های ۱۲/۵ تا ١٤ روزه، موش‌های خارج شده از رحم در پتری دیش شیشه‌ای استریل که حاوی محیط کشت DMEM بدون سرم بود، قرار گرفتند و اندام‌های جنینی به همراه ارگانهای داخلی جداشدند. لاشه جنین‌ها در لوله درب پیچ‌دار پلاستیکی ۵۰ میلی‌لیتری حاوی محیط کشت DMEM ریخته شده و سه بار یا بیشتر با محیط کشت استریل شستشو داده شدند. سپس جنین‌ها در پتری دیش‌های ۱۰ سانتی‌متری قرار گرفته و به وسیله تیغ اسکالپل استریل به قطعات بسیار ریزی تقسیم شدند. جنین‌های قطعه قطعه شده در لوله درب پیچ‌دار ۱۵ میلی‌متری حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محلول تریپسین / EDTA و در انکوباتور $37^{o}C$ به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. مقدار ۵ میلی‌لیتر از محلول رویی لوله انکوبه شده برداشته شده و در لوله استریل ۵۰ میلی‌لیتری که حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM به همراه ۱۰٪ سرم جنین گاو بود، ریخته شد. مجدداً ۵ میلی‌لیتر دیگر از محلول تریپسین / EDTA به لوله مرحله قبل ریخته شد و ۱۰ دقیقه دیگر در انکوباتور انکوبه شد. ۵ میلی‌لیتر از محلول رویی مجدداً برداشته شده و به لوله درب پیچ دار ۵۰ میلی‌لیتری دیگری که حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاو بود، ریخته شد. مراحل آخر را ۵ بار تکرار نموده که در انتهای این مرحله تنها بافت‌های نامحلول مثل غضروف در لوله ۵۰ میلی‌لیتری اولیه باقی‌می‌ماند. محتویات این لوله سانتریفوژ شده و سلولها مجدداً در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی سرم تازه، به حالت سوسپانسیون درآورده شدند. سلول‌ها تقریباً به ۱۰ عدد پلیت پلاستیکی کشت سلولی که حاوی محیط کشت DMEM همراه ۱۰٪ سرم جنین گاو بود، منتقل شدند.

روز بعد، تعویض محیط انجام گرفته و اجازه داده شد تا سلول‌ها کاملاً رشد کرده و کف پلیت را پر کنند. سلول‌های دیگری که علاوه بر فیبروبلاست در محیط کشت دیده شدند با چندین ساب کالچر از بین رفتند[۲۱].

آماده کردن لایه پشتیبان

برای تهیه‌ی لایه پشتیبانی که فعالیت میتوزی آن متوقف شده از میتومایسین C استفاده شد که با اتصال به DNA از تکثیر سلولی جلوگیری می‌کند.

سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش با محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو و ۱۰ µg/ml میتومایسین C تعویض محیط شده و به مدت ۲ تا ۳ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. پلیت حاوی سلول‌ها با PBS چندین بار شستشو شد و به وسیله تریپسینه کردن، سلول‌ها از کف پلیت جدا و بعد سانتریفوژ شدند. محیط رویی کنار گذاشته شده و به جای آن از محیط DMEM حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاو استفاده شد. سپس سلول‌ها مجدداً به حالت تعلیق در آمده و شمارش شدند و غلظت نهایی $۱۰۵/ml \times ۳$ مورد استفاده قرار گرفت. سلول‌ها در پلیت کشت سلولی که قبلاً ژلاتینه شده بودند، کشت داده شدند. عمل ژلاتین زدن با اضافه نمودن محلول ژلاتین ۰/۱٪ به پلیت کشت و قرار دادن آنها به مدت ۲ ساعت در حرارت اتاق انجام گرفت و بعد ژلاتین را دور ریخته و اجازه داده شد تا پلیت کشت کاملاً در زیر هود خشک شود. این عمل به افزایش چسبندگی سلول‌های پشتیبان به کف پلیت کمک می‌کند[۲۱].

Archive of SID
www.SID.ir

جدا کردن سلول‌های بنیادی جنینی

هر یک از جنین‌های بلاستوسیست تهیه شده به یکی از چاهک‌های ۱۰ میلی متری پلیت کشت ۹۶ خانه منتقل شدند. ۱ تا ۲ روز پس از کشت جنین‌ها، غشای Zona Pellucida پاره شده و جنین‌ها به وسیله سلول‌های تروفوبلاستی به کف پلیت کشت اتصال پیدا کردند. اندکی پس از اتصال جنین‌ها به کف پلیت، توده داخل سلولی نمایان شده و در مدت دو روز به سرعت رشد کردند. معمولاً پس از ۲ تا ۳ روز توده داخل سلولی به اندازه کافی بزرگ شده ولی با وجود تفاوت تکوینی جنینها، بررسی روزانه هر یک از جنین‌ها ضروری به نظر می‌رسید.

زمانی که سلول‌های توده داخل سلولی به حد کافی تکثیر پیدا نمود و Clump تشکیل دادند، با استفاده از یک پیپت پاستور ظریف کور شده، توده داخل سلولی از سلول‌های تروفوبلاست زیری جدا و به قطره حاوی تریپسین ۰/۲۵٪ و EDTA ۰/۰۲٪ انتقال داده شدند و به مدت ۳ تا ٤ دقیقه در درجه حرارت $37\ ^{o}C$ انکوبه شد و سپس با استفاده از پیپت پاستور ظریف که با محیط کشت حاوی سرم پر شده بود، توده سلولی از درون قطره حاوی تریپسین / EDTA برداشته و به قطره حاوی محیط کشت منتقل شد، تا ضمن خنثی نمودن تریپسین، با عمل Pipetting باعث جداشدن سلول‌های توده داخل سلولی از هم شده و اجتماعی از سلول‌های کوچک به وجود آیند. تجمعات سلولی حاصل از توده داخلی سلولی، به درون چاهک‌های ۱۰ میلی‌متری پلیت کشت منتقل شدند. هر یک از چاهک‌ها روزانه به طور مرتب مورد بررسی قرار گرفتند. پس از ١٤ روز کشت در حضور LIF (به مقدار ۱۰۰۰U/ml) و بتامرکاپتواتانل (۰/۱ میلی مول) کلونی‌های سلولی برداشته شده و با عمل تریپسین زدن و Pipetting، سلول‌ها از هم جدا شده و مجدداً در محیط کشت حاوی LIF کشت داده شدند. سپس چندین ساب کالچر از سلول‌های بنیادی جنینی تهیه شد[۲۱].

لازم به ذکر است که پس از ساب کالچر سوم و ساب‌کالچرهای بعدی به علت اینکه تنها کلون‌های یکدست و یک شکل در پلیت کشت ظاهر شدند، بنابراین به کل چاهک کشت به یکباره تریپسین زده شد تا سلول‌های تمام کلونها یکجا از هم جدا شده و کشت داده شوند.

روش هیستوشیمیایی برای تشخیص سلول‌های بنیادی جنینی

به علت فعالیت شدیدآلکالین فسفاتاز در سلولهای بنیادی جنین، فعالیت این آنزیم مورد ارزیابی قرار می‌گیرد تا سلولهای مذکور تأیید شوند[۱۸،۲۱،۲۲]. اساس این متد عبارت از تشکیل رنگهای آزوی نامحلول در محل‌های فعالیت آنزیم است. در این تکنیک ازترکیب نفتیل فسفات به عنوان سوبسترا استفاده شد. ابتدا تعدادی از سلولهای بنیادی جنین بدست آمده به کمک دستگاه سیتواسپاین روی لام منتقل شدند و بعد از فیکس کردن در محلول استن فرمالدهید (به مدت یک دقیقه) و شستشو در آب بدون یون بدون اینکه سطح لام‌ها خشک شوند در داخل محلول حاوی سوبسترا (به مدت ۳۵ دقیقه) قرارگرفتند. مجددا" لام‌ها (به مدت ۲ دقیقه) با آب بدون یون شستشو و با رنگ هماتوکسیلین رنگ افتراقی شدند. درانتها لام‌ها با آب معمولی شسته شده و با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

پس از گذشت ۱۲ تا ٤٨ ساعت، جنین‌ها ناحیه‌ی زونا را پاره نموده و از آن خارج شدند. با توجه به اینکه جنین‌های بلاستوسیست در مراحل early وlate قرار داشتند، بنابراین زمان hatching آنها بین ۱۲ تا ٤٨ ساعت متغیر بود.

همانگونه که در جدول (۱) مشخص شده است، ۷۸٪ از کل جنین‌ها عمل hatching را انجام دادند.

تشکیل کلونی اولیه از جنین‌ها

پس از اینکه جنین‌ها از غشای زونا خارج شدند (تصویر ۱) سلول‌های تروفواکتودرم شروع به رشد نموده و به کف پلیت چسبیدند. سپس توده داخل سلولی بر روی آن شروع به رشد کرد که اولین آثار از شکل‌گیری آن ٢٤ ساعت پس از خارج شدن از غشای زونا قابل مشاهده بود. در ضمن با توجه به اینکه رشد توده داخل سلولی از جنینی به جنین دیگر متفاوت بود، بنابراین به مدت ۵ روز پلیت‌های کشت مورد بررسی قرار گرفتند. نمایی از کلونی‌های شکل گرفته پس از گذشت ٢٤ ، ٤٨، و ۷۲ ساعت به ترتیب در تصاویر ۲،۳و٤ ارایه شده است. با توجه به جدول (۱)

Archive of SID

www.SID.ir

حدود ۸۹ درصد از جنین‌هایی کـه غشـای زونـا را پـاره نمـوده و hatchکرده‌اند، توانایی ایجاد کلون سلولی را داشته‌اند.

کشت سلول‌های جدا شده از توده داخل سلولی در محیط کشت حاویLIF

پس از انتقال سلول‌های به دست آمده از توده داخل سلولی بـه محیط کشت DMEM حاوی LIF ۱۰۰۰ U/ml و بررسی روزانـه هر یک از چاهک‌های پلیت کشت، نتایج زیر بدست آمد:

۱-تعدادی از سلول‌ها پس از انتقال به محیط کشت، دچـار مـرگ سلولی شده و از بین رفتند.

۲ـ یکسری از سلول‌ها در همان هفته اول به سرعت رشـد نمـوده و کلون سـلولی بـه وجـود آوردنـد کـه معمـولاً پـس از یـک هفتـه گـرانوله شدند.

۳- تعـدادی از سـلول‌ها نـیز دچـار تمـایز شـده و انـواع مختلـف سلول‌ها را ایجاد کردند کـه چنـدان دوام و پـایداری را در محیـط کشت از خود نشان ندادند.

٤ـ پس از گـذشت ۲ تـا ۳ هفتـه در برخـی از چاهک‌هـای پلیـت، کلون‌های سلولی با مرفولوژی شـبیه بـه کلـون سـلول‌های بنیـادی مشاهده شدند که از این مقدار تنها تعداد اندکی قادر به ادامه رشد و تکثیر و ایجاد کلون مناسب جهت انجام عمل Subculturing بودند.

در جـدول (۱) تعـداد کلون‌هـای ایجـاد شـده در ایـن تحقیـق آورده شده است. تصویـر(٤) نـیز نمـایی از مرفولـوژی کلون‌هـای اولیه مربوط به سلول‌های بنیادی جنین را نشان می‌دهد.

تصویر ۱: بلاستوسیست hatch کرده (بزرگنمایی ٤۰۰ ×)

تصویر ۲: توده داخل سلولی ۲٤ ساعت پس از خروج از زونا (بزرگنمایی ۱۰۰×)

تصویر۳: توده داخل سلولی ٤۸ ساعت پس از خروج از زونا (بزرگنمایی ۱۰۰×)

تصویر ٤: توده داخل سلولی ۷۲ ساعت پس از خروج از زونا (بزرگنمایی ۱۰۰ ×)

Archive of SID

www.SID.ir

کشت سلول‌های جدا شده از توده داخل سلولی بر سطح فیبروبلاست اولیه جنین موش

سلول‌های حاصل از حدود ٥٠ توده داخل سلولی بر سطح سلول‌های فیبروبلاست اولیه جنین موش که فعالیت میتوزی آن با استفاده از میتوتایسین C غیرفعال شده بود، کشت داده شدند.

هدف از این آزمایش، بررسی میزان تأثیر سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش بر مهار تمایز سلول‌های بنیادی جنینی و ایجاد کلون سلولی حاصله بود که با ٣ هفته بررسی روزانه پلیت‌های کشت آثاری از ایجاد کلون سلولی مشاهده نشد.

تصویر (٥) سلول‌های فیبروبلاست اولیه جنین موش را ٢٤ ساعت پس از کشت آنها در محیط DMEM حاوی ١٠٪ سرم جنین گاو نشان می‌دهد.

ساب کالچر های بعدی کلون سلول‌های بنیادی

در ساب کالچر بعدی کلون‌های مشابه که فنوتیپ سلول‌های بنیادی را داشتند، برداشت شده و سلول‌های آنها با عمل تریپسین از هم جدا شده و مجدداً در محیط LIF دار کشت داده شدند که حدود یک هفته بعد کلون‌های یکدست با مرفولوژی یکسان در محیط کشت ظاهر شدند. تصویر (٦) کلون‌های سلول‌های بنیادی در ساب کالچرهای مختلف را نشان می‌دهد.

بررسی هیستوشیمیایی سلول‌های بنیادی جنینی

پس از رنگ‌آمیزی هیستوشیمی، مناطقی که با آنزیم واکنش نشان داده بودند به شکل نقاط قرمز تا قهوه‌ای در درون سیتوپلاسم سلول‌ها نمایان شدند. همچنین پس از استفاده از رنگ رقابتی، نقاط آبی رنگ که نشانگر محل و موقعیت هسته این سلول‌ها بود نیز مشخص گردید. تصویر ٧ فعالیت آلکالن فسفاتازی سلول‌های بنیادی جنینی را نشان می‌دهد.

تصویر ٦. کلون سلول‌های بنیادی جنینی در ساب کالچر چهارم به بعد (بزرگنمایی ٢٥٠ ×)

تصویر ٥: لایه پشتیبان فیبروبلاست اولیه جنین موش (بزرگنمایی ١٠٠ ×)

تصویر٧: رنگ‌آمیزی آلکالن فسفاتاز کلون سلول‌های بنیادی با رنگ افتراقی هماتوکسیلین (بزرگنمایی ٤٠٠ ×)

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱: تعداد و درصد جنین‌هایی که توده داخل سلولی آنها ایجاد کلون سلولهای بنیادی نموده است

دفعات آزمایش	تعدادجنین	جنینهای خارج شده از زونا(٪)	جنینهایی که کلون ایجادکردند (٪)	تعداد کلون سلولهای بنیادی (٪)
۱	۱۱۵	۹۵ (۸۲)	۸٦ (۹۰)	۸ (۹)
۲	۱۰۰	۸۰ (۸۰)	۷۱ (۸۸)	۷ (۱۰)
۳	۱۲۰	۷۱ (۸۸)	۸۲ (۸۹)	۹ (۱۰)
جمع کل	۳۳۵	۲۳۹ (۸۹)	۲۳۹ (۸۹)	۲٤ (۱۰)

بحث

از مهمترین اهداف تحقیق حاضر، تولید سلول‌های بنیادی جنینی از گونه موش بود که برای اولین بار در ایران صورت پذیرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که سلول‌های بنیادی ناشی از توده داخل سلولی (ICM) در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاو رشد کرده و کلونی‌های اولیه در مدت ۲ تا ۳ هفته ظاهر گردیده و حدود ۱۰ درصد از کلون‌های حاصله توانایی کشت در ساب‌کالچرهای بعدی را داشتند و از نظر مرفولوژی و شکل ظاهری کلونی‌های بدست آمده مشابه با کلونی‌های شکل گرفته توسط محققین دیگر بود که از جنین پستانداران رده‌های مختلف از جمله انسان و یا دیگر پریمات‌ها استفاده شده بود [۱۸،۲۱،۲۳]. لازم به ذکر است در گزارشات محققین دیگر که از نژادهایی مثل موش و یا گونه‌های مختلف آن استفاده کرده‌اند، اعلام شده که تکثیر سلول‌های حاصل از توده داخل سلولی بسیار سریع بوده و درصد بالایی از آنها ایجاد کلون سلول‌های بنیادی جنینی می‌نمایند [۱]. این تفاوت احتمالاً می‌تواند مربوط به نژاد و گونه‌ی جانور مورد مطالعه باشد. اگرچه شرایط آزمایشگاهی و محیط انجام آزمایش نیز در این مورد بی‌تأثیر نیست. در این خصوص نیاز به تحقیقات بیشتری بوده و لازم است در مراحل بعدی این تحقیق، مطالعه‌ای بین نژادهای مختلف موش‌های سوری انجام پذیرد تا بهترین نژاد از نظر سرعت رشد جنین، سرعت رشد سلول‌های حاصل از توده داخل سلولی و ساب‌کالچرهای بعدی آن به دست آید.

به چند روش می‌توان از تمایز سلول‌های بنیادی جنینی ممانعت به عمل آورد که در این تحقیق دو روش به کار گرفته شد. با استفاده از لایه‌ی پشتیبان فیبروبلاست اولیه جنین موش و یا محیط حاوی LIF ، هر دو مسیر به طور موازی انجام شد تا کفایت هر کدام از آنها مورد ارزیابی قرار گیرد. نتیجه حاصل نشان داد که استفاده از لایه پشتیبان به تنهایی نمی‌تواند از تمایز سلول‌های بنیادی جلوگیری نماید و رشد سلول‌ها را تحرک کند. بنابراین شاید ضروری باشد تا از لایه‌های پشتیبانی استفاده شود که از نظر ریزمحیطی (microenvironment) نزدیک به شرایط in vivo باشند. برای رسیدن به این هدف می‌توان از سلول‌های اپی‌تلیال لوله فالوپ و یا رحم استفاده نمود [۱۸]. گزارشات موجود حاکی از آن است که در سلول‌های اپی‌تلیال لوله‌های فالوپ هنگام لانه‌گزینی جنین، ژن مربوط به LIF فعال شده و به مقدار زیادی نمایان می‌شود. پس به طور طبیعی این ترکیب در محتویات و ترشحات موجود در لوله فالوپ یافت می‌شود [۲٤،۲۵]. بنابراین به نظر می‌رسد فیبروبلاست اولیه جنین موش حاصله از نژاد NMRI که به عنوان لایه پشتیبان در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت، احتمالاً مقدار مناسب و کافی از فاکتور LIF را تولید و ترشح نمی‌کند. با این‌حال استفاده از فاکتور LIF در محیط کشت سلول‌های حاصل از توده داخل سلولی به میزان ۱۰۰۰ u/ml مؤثر واقع شد. محققین دیگری نیز تأیید کرده‌اند که حضور LIF به تنهایی از روند تمایزی سلول‌های بنیادی جلوگیری نموده و همچنین در تکثیر سلول‌های مذکور نیز مؤثر می‌باشند [۱۰،۱۲]. در این خصوص Pease و همکارانش طی مطالعاتی نشان داده‌اند که سلول‌های فیبروبلاست اولیه تنها به میزان ۵۰۰U/ml فاکتور LIF را در محیط ترشح می‌نمایند و حتی با تعویض محیط کشت، میزان واقعی آن به کمتر از مقدار ذکر شده نیز تقلیل می‌یابد [۲۱].

همان گونه که قبلاً ذکر شد، یکی از روشهای افتراق و شناسایی سلول‌های تمایز نیافته جنینی، استفاده از تکنیک هیستوانزیمولوژی آلکالن فسفاتاز است [۱۸،۲۱،۲۲]. در این تحقیق نیز سلول‌های تولید شده با استفاده از این تکنیک رنگ‌آمیزی شدند و واکنش

Archive of SID
www.SID.ir

شدیدی از این آنزیم را نشان دادند که بیانگر عدم تمایز سلول‌های فوق می‌باشد. در همین ارتباط Pease و همکارانش نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی جنینی بدست آمده از جنین موش که در حضور LIF کشت داده شده‌اند از نظر واکنش هیستوشیمیایی آلکالن فسفاتاز مثبت هستند [٢١]. آنها همچنین نشان دادند که چنانچه سلول‌های بنیادی جنینی را در محیطی فاقد LIF کشت دهند، تقریباً ٨٠٪ سلول‌های مذکور علاوه بر تغییرات مرفولوژی که در اثر تمایز از خود بروز می‌دهند، واکنش آلکالن‌فسفاتاز آنها نیز منفی می‌شود. Bongso و همکاران نیز نتایج مشابهی را از سلول‌های بنیادی جنینی مشتق شده از بلاستوسیست انسان نشان داده‌اند [١٨]. تحقیق دیگری نیز توسط Thomson و همکاران صورت گرفته که با استفاده از تکنیک آلکالن فسفاتاز، سلول‌های بنیادی جنینی بدست آمده از پرایمات‌ها را مشخص کردند [١٥،٢٢]. البته در صورت امکان می‌توان از روشهای تشخیصی کاملتری برای بررسی ویژگی‌های سلولهای بنیادی استفاده نمود از جمله تعیین کاریوتیپ و تعیین مارکرهای سطح سلولی. با توجه به اینکه سلولهای بنیادی به دست آمده در این تحقیق از کیفیت مناسبی برخوردار بوده و سرعت رشد نسبتاً خوبی داشتند، می‌توان از این روش در تولید سلولهای بنیادی استفاده کرد و از سلولهای حاصله در تحقیقات آتی استفاده نمود از جمله: سلول درمانی، ژن درمانی، ردیابی ژن، بررسی روند تمایز آنها در محیط کشت و مکانیسمهای مؤثر بر تمایز آنها لذا با توجه به دامنه و وسعت تحقیقاتی که در این زمینه در حال انجام است، می‌توان افق روشنی را در آینده بر آن متصور بود.

سپاسگزاری

تحقیق حاضر بخشی از پروژه مصوب معاونت پژوهشی سازمان انتقال خون ایران می‌باشد و بدین‌وسیله از زحمات آقایان مسعود سلیمانی و سعید کاویانی تشکر می‌شود.

References

1- Smith AG. ***Mouse embryo stem cells: their identification, propagation and manipulation.*** Seminars in Cell Biology, 1992, 3: 385-399.

2- Odorico JS., Kaufman DS. & Thomson JA. ***Multilinage differentiation from human embryonic stem cell lines.*** Stem Cells, 2001, 19(3): 193-204.

3- Rathjeh PD. Lake J. Whyatt.Bettess MD.& Rathjeh J. ***Properties and uses of embryonic stem cells: Prospects for application to human biology and genetherapy.*** Reprod Fertil Dev, 1998, 10:31-47.

4- Thomson JA, Odorico JS. ***Human embryonic stem cells and embryonic germ cell lines.*** Trends in Biotechnology, 2000, 18: 53-60.

5- Smith AG. Celltherapy: ***In search of pluripotency.*** Current Biol, 1998, 8(22): 802-804.

6- Rathjen J, Rathjen P. ***Mouse ES cells: Experimental exploitation of pluripotent differentiation potential.*** Curr Opinion in Genet Develop, 2001, 11: 587-594.

7- Evans M.J. & Kaufman M. ***Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.*** Nature, 1981, 242: 154-156.

8- Martin G.R. ***Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium contained by teratocarcinoma stem cells.*** Proc. Nat. Sci., USA, 1981, 78: 7634-7638.

9- Smith AG. Hooper L. ***Buffalo liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells.*** Dev. Biol, 1987, 121: 1-9.

Archive of SID
www.SID.ir

10- Smith AG. Heath JK. Donaldsmon DD. Wong GG., Moreau J. Stahl M. Rogers D. ***Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides.*** Nature, 1988, 336:688-690.

11- Gearing PD., Gough NM., King JA., Hilton DJ. Nicola NA & et al. ***Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukemia inhibitory factor (LIF).*** EMBO. J, 1987, 6:3995-4002.

12- Williams RL. Hilton DJ. Pease S. Willson TA. Stewart CL. & et al. ***Myeloid leukemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells.*** Nature, 1988, 336: 684-687.

13- Oshima R. ***Stimulation of the colonal growth and differentiation of feeder layer dependent mouse embryonal carcinoma cells β-mercaptoethanol.*** Differentiation. 1978, 11: 149-155.

14- Pera MF., Reubinoff BE. & Trounson A. ***Human embryonic stem cells.*** Cell Science, 2000, 113: 5-10.

15- Thomson JA & Marshal VS. ***Primate embryonic stem cells.*** Curr Topics Dev Biol. 1998, 38: 133-165.

16- Thomson JA. Itskovitzeldor J. Shapiro SS., Waknitz MA. Swiergiel JJ. Marshall VS. & Jones JM. ***Stem cell lines drived from human blastocysts.*** Science, 1998, 282: 1145-1147.

17- Reubinoff BE. Pera MF. Fong CY. Trounson A. & Bongso A. ***Embryonic Stem cell lines from human blastocysts: Somatic differentiation in vitro.*** Nature Biotech, 2000,18: 399-404.

18- Bongso A., Fong CY., NG Sc. & Ratnam S. ***Isolation and culture of inner cell mass cells from human blactocysts.*** Hum Reprod, 1994, 9(1): 2110-2117.

19- Gardner RL. ***Stem cells: Potency, plasticity and public perception.*** J Anat 2002, 200: 277-282.

20- Sato M, Nakano T. ***Embryonic stem cell***.Intern Med 2001, 40, 195-200.

21- Pease S. Braghetta P. Gearing D. & Grail D. Williams RL. ***Isolation of embryonic stem cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF).*** Dev. Biol. 1990, 141: 344-352.

22- Thomson JA., Kalishman J., Golos TG., Durning M., Harris CP., Becker RA. & Hearn JP. ***Isolation of a primate embryonic stem cell line.*** Proc Natl Acad Sci USA. 1995, 92: 7844-7848.

23- Doetschman T., Williams P. and Maeda N. ***Establishment of hamster blastocyst derived embryonic stem (ES) cells.*** Dev Biol, 1988, 127: 224-227.

24- Bongso A., NG SC., Sathananthan H., NG DL., Rauff M. & Ratnam SS. ***Improved quality of human embryos when cocultured with human ampullary cells.*** Hum Reprod. 1989, 4: 706-713.

25- Yeung WSB. Ho PC. Lau EYL. & Chan STH. ***Improved development of human embryos in vitro by a human oviductal cell coculture system.*** Hum Reprod. 1992, 7: 1144-1149.

Archive of SID

www.SID.ir