Archive of SID

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان

سال هشتم، شمارهٔ ۲ (مسلسل ۳۰)، زمستان ۱۳۸۲

تولید اجسام شبه رویانی از سلولهای بنیادی رویانی با استفاده از پتری دیشهای سیلیکونی

فردین فتحی[۱]، تقی طریحی[۲*]، سیدجواد مولی[۳]، منصوره موحدین[۴]، مجید صادقی‌زاده[۵]

چکیده

- **مقدمه:** اجسام شبه رویانی ساختمانهای رویانی ابتدایی هستند که از سلولهای بنیادی رویانی حاصل شده‌اند و معمولاً تمایز آزمایشگاهی سلولهای بنیادی رویانی مستلزم تهیه اجسام شبه رویانی از این سلولها می‌باشد. تکنیکهای مختلفی جهت تهیه اجسام شبه رویانی بکار می رود. افزایش کارآیی تکنیکهایی که منجر به تولید اجسام شبه رویانی می‌شود می‌تواند منجر به کسب نتایج بهتر در هنگام تمایز سلولهای بنیادی رویانی به سلولهای مختلفی مانند سلولهای عصبی، سلولهای قلبی و سلولهای خونی و... شود. در این پژوهش از ماده‌ای به نام Sigmacote بصورت یک سوبسترای هیدروفوبیک جهت افزایش تعداد اجسام شبه رویانی استفاده شد.
- **مواد و روشها:** به منظور ایجاد یک سوبسترای هیدروفوبیک در کف پتری دیشهای شیشه‌ای، کف پتری دیشها با استفاده از یک روش سه مرحله‌ای و بکارگیری ماده سیگماکت (Sigmacote) سیلیکونیزه شد. سپس پتری دیشهای سیلیکونی شده جهت تولید اجسام شبه رویانی از دودمانهای سلولی P19 و CCE بکار گرفته شدند، سلولهای مذکور با غلظت ۱×۱۰^{۵} سلول در میلی‌لیتر در پنج نوبت غیر همزمان به پتری دیشهای سیلیکونی منتقل شده و بعد از گذشت ۴۸ ساعت اجسام شبه رویانی تولید شده در آنها تحت شمارش قرار گرفتند. از پتری دیشهای باکتریولوژیک پلاستیکی با شرایط مشابهی به عنوان گروه کنترل استفاده شد.
- **یافته‌ها:** نتایج حاصل از شمارش اجسام شبه رویانی بدست آمده از پتری دیشها نشان داد که پتری دیشهای سیلیکونی در مقایسه با پتری دیشهای باکتریولوژیک قادرند با کارآئی بالاتری اجسام شبه رویانی تولید کنند به طوری که اختلاف ما بین گروههای کنترل و آزمایش معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$).
- **نتیجه‌گیری:** نتایج بدست آمده از این پژوهش نشان داد که Sigmacote به عنوان یک سوبسترای هیدروفوبیک قادر است با یک روش ساده و تکرارپذیر اجسام شبه رویانی تولید کند. لذا استفاده از آن جهت افزایش تولید اجسام شبه رویانی و به دنبال آن افزایش تمایز سلولهای بنیادی رویانی توصیه می‌شود.

- **واژه‌های کلیدی**: اجسام شبه رویانی، سلولهای بنیادی رویانی، سلولهای P19، سلولهای CCE، Sigmacote

۱- دانشجوی دکترای علوم تشریح، دانشگاه تربیت مدرس

* ۲- استادیار گروه علوم تشریح، دانشگاه تربیت مدرس، بزرگراه جلال‌آل احمد، تهران، مؤلف مسؤول

۳- استادیار گروه ژنتیک، دانشگاه تربیت مدرس

۴- استادیار گروه علوم تشریح، دانشگاه تربیت مدرس

۵- استادیار گروه ژنتیک، دانشگاه تربیت مدرس

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سلولهای بنیادی رویانی سلولهای پر استعدادی محسوب می‌شوند که از توده سلولی داخلی بلاستوسیست جنین منشاء می‌گیرند (٤-١). تمایز سلولهای مذکور به سلولهای بالغ مختلفی نظیر سلولهای عصبی، سلولهای قلبی، سلولهای اندوتلیال و سایر سلولهای سازنده بدن (٨-٥) احتمال استفاده بالینی از این سلولها را در درمان بیماریهای متعددی نظیر بیماریهای تخریبی سیستم عصبی، سکته قلبی، دیابت و بیماریهای مختلف دیگر افزایش داده است (١٢-٩). در اکثر مطالعات، فرآیند تمایز سلولهای بنیادی رویانی به سلولهای مختلف از طریق کشت این سلولها به صورت توده‌های سلولی کوچکی که تجمعات سلولی[1] یا اجسام شبه رویانی EBs[2] نامیده می‌شوند، شروع می‌شود معمولاً EBها زمانی تشکیل می‌شوند که سلولهای بنیادی رویانی در پتری دیشهای باکتریولوژیک به عنوان یک سوبسترای غیر چسبنده و در محیط کشت فاقد فاکتور مهار کننده لوسمی (LIF)[3] کشت داده می‌شوند (١٣). علاوه بر پتری دیشهای باکتریولوژیک از تکنیکهای دیگری نظیر روش قطره آویزان (١٤,١٥) و بکارگیری سوبسترای نیمه جامد متیل سلولز (١٦) نیز جهت تهیه اجسام شبه رویانی استفاده می‌شود. از جمله سلولهائی که جهت تمایز آنها از EBها به صورت استاندارد استفاده می‌شود سلولهای عصبی می‌باشد. بسیاری از محققین قادر به القای سلولهای بنیادی رویانی به سلولهای نوروایی تلیال، با استفاده از مواد شیمیائی نظیر اسید رتینوئیک، محیط کشت نوروژنیک و غیره بوده‌اند (١٣,١٧,١٨). معمولاً به منظور القای تمایز سلولهای بنیادی رویانی، ابتدا بایستی از سلولهای بنیادی رویانی اجسام شبه رویانی تهیه نموده و آنها را از عواملی نظیر فاکتور مهارکننده لوسمی (١٩) و سلولهای تغذیه کننده‌ای نظیر STO (٢٠) یا سلولهای فیبروبلاست جنینی اولیه (٢١) محروم کرد. رایج‌ترین روش جهت تولید اجسام شبه رویانی بکارگیری پتری دیشهای باکتریولوژیک است که بعد از انتقال سلولهای بنیادی رویانی به آنها، این سلولها قادر به چسبیدن به کف پتری دیشها نبوده و در نتیجه به شکل معلق در محیط کشت رشد کرده و اجسام شبه رویانی را تولید می‌کنند، اما از آنجائیکه معمولاً درصدی از سلولها به کف پتری دیشها چسبیده و گاهی زیاد بودن درصد سلولهای چسبنده منجر به کاهش تولید اجسام شبه رویانی می‌شود. لذا نظر به بروز مشکل مذکور در تولید اجسام شبه رویانی از یک طرف و اهمیت تولید انبوه و سریع اجسام شبه رویانی در فرآیند تمایز سلولهای بنیادی رویانی از طرف دیگر، در پژوهش حاضر سیلیکونیزیشن پتری دیشهای شیشه‌ای به عنوان روش جدیدی جهت تهیه اجسام شبه رویانی(EBs) از سلولهای بنیادی رویانی EC[4] و ES[5] معرفی شده است. به این منظور با استفاده از ماده‌ای به نام Sigmacote که یکی از محصولات شرکت Sigma می‌باشد پتری دیشهای شیشه‌ای سیلیکونی شده و توانائی آنها جهت تهیه EB در هر دو دودمان سلولی P19 و CCE در مقایسه با پتری دیشهای باکتریولوژیک، بعنوان یک روش رایج مورد ارزیابی قرار گرفت.

1. Aggregates
2. Embryoid bodies
3. Leukemia inhibitory factor
4 - Embryonal Carcinomal Cells
5 - Eembryonic Stem Cells

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روشها

کشت سلولهای P19 و CCE: جهت رشد و تکثیر سلولهای P19 از محیط کشت RPMI[1]، سرم FBS[2] (۵٪) و سرم NCS[3] (۵٪) و جهت ساب کالچر سلولها از تریپسین با غلظت ۰/۲۵ درصد و EDTA ۰/۰٤ درصد استفاده شد. جهت انجماد سلولها از محیط انجماد حاوی ۹۰ درصد سرم و ۱۰ درصد DMSO استفاده شد. هنگام کشت، این سلولها به تراکم سلولی بسیار پایین و بسیار بالا خیلی حساس بوده و تحت این شرایط بطور ناگهانی تمایز پیدا می‌کنند. لذا سلولها هر دو الی سه روز یک بار قبل از اینکه فلاسک کشت از سلول پر شود به نسبت ۱ به ۳ ساب کالچر داده شدند. توصیه شده است که بعد از چندین بار پاساژ متوالی سلولها، از سلولهای تازه ذوب شده استفاده شود لذا منجمد کردن و ذخیره مرتب سلولها نیز یک امر ضروری می‌باشد (۱۵). در این پژوهش پاساژ بیستم دودمان سلولی CCE (هدیه از دکتر احمدرضا بهرامی، دانشگاه شفیلد) مورد استفاده قرار گرفت. جهت کشت این سلولها از محیط کشت DMEM[4]، سرم FBS به میزان ۱۵٪، پنی‌سیلین ۱۰۰u/ml، استرپتومایسین ۵۰u/ml، ۲ مرکاپتواتانول 5×10^{-5}M و LIF با غلظت ۱۰ng/ml استفاده گردید (۲۰,۲۱) سلولها در دیشهای ٦۰ میلیمتری که کف آنها بوسیله ژلاتین ۱٪ حل شده در PBS پوشانده شده بود کشت داده شدند. دمای انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و میزانCO_2 آن ۵٪ بود. جهت انجماد سلولها از محیط انجماد حاوی ۹۰ درصد سرم و ۱۰ درصد DMSO استفاده شد. سلولها هر دو الی سه روز یکبار قبل از اینکه دیش محتوی سلولها از سلول پر شود به نسبت یک به سه یا یک به چهار ساب کالچر داده شدند. جهت کشت هر دو دودمان سلولی مذکور دمای انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و میزانCO_2 آن در حد ۵٪ تنظیم شد.

روش سیلیکونیزه کردن پتری دیشهای باکتریولوژیک شیشه‌ای[5]: جهت سیلیکونیزه کردن پتری دیشهای باکتریولوژیک شیشه‌ای از یک روش سه مرحله‌ای که هر کدام از مراحل آن ۳۰ دقیقه به طول می‌انجامید استفاده شد. در مرحله اول پتریهای تمیز و تازه با مقداری محلول رقیق نشده Sigmacote پر شد بطوریکه لایه‌ای از محلول کف پتری را در بر بگیرد. از آنجایی که محلول مذکور به سرعت تبخیر می‌شود لازم بود در پتریها گذاشته شود. در این مرحله پتریها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. در پایان این مرحله لایه نازکی از سیلیکون کف پتریها را می‌پوشاند. در مرحله دوم محلول از پتری دیشها خارج شده و برای استفاده مجدد نگهداری شد. سپس پتریها را به مدت ۳۰ دقیقه زیر هود گذاشته تا لایه نسبتاً محکمی از سیلیکون در کف پتریها تشکیل شود. پس از پایان ۳۰ دقیقه کف پتریها را فقط یکبار به آرامی با آب مقطر شستشو داده تا مقداری اسیدکلریدریک که در اثر واکنش محلول با کف شیشه بوجود آمده، شستشو داده شود. مرحله سوم جهت افزایش استحکام لایه سیلیکونی صورت گرفت که بر روی کف پتریها تشکیل شده بود. این مرحله شامل پوشاندن پلیتها با

1 - Roswell park memorial institute
2 - Fetal bovine serum
3 - Neural stem cells
4 - Dulbeco`s modified eagle medium

۵- روش استفاده شده جهت سیلیکونیزیشن پتری دیشهای شیشه‌ای، روش توصیه شده از طرف شرکت سیگما می‌باشد که با مقداری تغییر انجام گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

فویل آلومینیومی و قرار دادن آن به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد بود. هنگام گذاشتن پلیتها در انکوباتور، انکوباتور می‌بایست از دمای مذکور برخوردار باشد. بعد از این مرحله پتریها برای استفاده آماده بودند.

ارزیابی کارآیی پتری دیشهای سیلیکونیزه در تولید EB: در این پژوهش کارآیی پتری دیشهای سیلیکونیزه جهت تولید EB از دودمان‌های سلولی P19 و CCE مورد ارزیابی قرار گرفت. به این منظور هرکدام از دو دودمان سلولی مذکور، در پنج نوبت متفاوت به پتریهای شیشه‌ای سیلیکونیزه و پتری دیشهای باکتریولوژیک منتقل شده و ۴۸ ساعت بعد تعداد EBهای تولید شده از آنها، شمارش و ثبت شد (۲۷)، به عبارت دیگر هر کدام از رده‌های سلولی مذکور گروههای آزمایش و کنترل داشتند بطوریکه هرکدام از گروههای مذکور دارای پنج زیر گروه بودند. جهت شمارش EBها بعد از ۴۸ ساعت محیط کشت حاوی EBها از هر کدام از پتری دیشها جمع‌آوری شده و به آرامی به یک لوله ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شدند. پس از طی مدت چند دقیقه EBها در ته لوله‌ها ته‌نشین شدند، به آرامی محیط کشت آنها را دور ریخته و در هر کدام از لوله‌ها یک میلی‌لیتر محیط کشت تازه ریخته و پس از پی‌پتاژ بسیار آرام و مختصر با استفاده از پی‌پت پاستور دهانه گشاد مخلوط یکنواختی تهیه نموده و بلافاصله محیط مذکور به یک پتری دیش تازه منتقل گردید. با استفاده از میکروسکوپ لوپ تعداد EBها شمارش شدند. سپس از آزمون مقایسه میانگین T-test جهت ارزیابی آماری و مقایسه نتایج بدست آمده در گروههای آزمایش و گروههای کنترل استفاده گردید.

یافته‌ها

کارآیی پتری دیشهای سیلیکونیزه در تولید EB: دودمانهای سلولی P19 و CCE (شکلهای ۱و۲) با غلظت ۱×۱۰^{۵} سلول در میلی‌لیتر، در پنج نوبت مختلف به پتری دیشهای باکتریولوژیک و سیلیکونیزه منتقل شده و تعداد اجسام شبه رویانی حاصل از آنها ۴۸ ساعت بعد شمارش شد. درمورد هر دو دودمان سلولی P19 و CCE میانگین تعداد اجسام شبه رویانی (شکلهای ۱و۲) تشکیل شده در پتری دیشهای سیلیکونیزه بیشتر از پتری دیشهای باکتریولوژیک بود (جدول شمارهٔ ۱). با توجه به تشابه کامل گروههای مورد مطالعه در هر دودمان سلولی، از آزمون گروههای جفت و همچنین با توجه به محدود بودن تعداد دیشها (هر گروه ۵ دیش) از آزمون غیر پارامتریک ویلکاکسون جهت تحلیل داده‌ها استفاده شد که در مورد هر دو دودمان سلولی مورد استفاده اختلاف بین گروههای تجربی و کنترل معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). مقدار Z در مورد گروههای متشکل از سلولهای P19 و CCE مساوی ۲/۰۲۳- بوده است.

همچنین در بررسی کیفی و مورفولوژیک اجسام شبه رویانی با استفاده از میکروسکوپ معکوس Olympus، اجسام شبه رویانی تولید شده در پتری دیشهای سیلیکونیزه مشابه اجسام شبه رویانی تولید شده در پتری دیشهای باکتریولوژیک بود و هیچگونه تفاوت مورفولوژیکی مشخصی بین آنها مشاهده نشد.

هرکدام از شماره‌های۱ تا ۵ واقع در ستون زیر "پتری دیشهای مورد استفاده" یکی از گروههای آزمایش با کنترل محسوب شده و اعداد ثبت شده در خانه‌های جدول بیانگر تعداد اجسام شبه رویانی شمارش شده در گروههای مختلف

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعه است. در مورد هر کدام از دودمان‌های سلولی مورد استفاده تعداد EBهایی که پس از گذشت دو روز تشکیل شده‌اند در پتریهای سیلیکونیزه نسبت به پتریهای باکتریولوژیک بیشتر است.

شکل ۱. تصاویر میکروسکوپی از کشت تک لایه ای سلولهای CCE و اجسام شبه رویانی (Embryoid bodies) تهیه شده از این سلولها. (بزرگنمایی ۲۰۰X)، A : تک لایه سلولهای CCE که معمولاً از ظاهری کروی شکل و کوچک برخوردارند. B: چند جسم شبه رویانی تهیه شده از سلولهای CCE که در اثر کشت سلولها در پتری دیشهای سیلیکونیزه تشکیل شده‌اند (روز سوم).

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۲. تصاویر میکروسکوپ نوری از کشت تک لایه‌ای سلولهای P19 و تجمعات سلولی تشکیل شده از این سلولها (بزرگنمایی ۲۰۰X)
A: تک لایه سلولهای P19 که بیشتر ظاهر چند وجهی دارند. B: چند تجمع سلولی (aggregates) از سلولهای P19 که در اثر کشت سلولها در پتری دیشهای سیلیکونیزه در روز دوم تشکیل شده‌اند. در این روز حاشیه تجمعات سلولی نامنظم است اما بتدریج این نامنظمیها از بین رفته و اکثر تجمعات حالت کروی شکل با حاشیه منظم به خود می‌گیرند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شمارهٔ ۱: نتایج شمارش تعداد اجسام شبه رویانی تشکیل شده در پتری دیشهای باکتریولوژیک و سیلیکونیزه

سلولهای P19	سلولهای P19	سلولهای CCE	سلولهای CCE	دودمانهای سلولی مورد استفاده
پتری دیش باکتریولوژیک	پتری دیش سیلیکونیزه	پتری دیش باکتریولوژیک	پتری دیش سیلیکونیزه	پتری دیشهای مورد استفاده
۳۲۰	۳۴۰	۲۱۲	۲۹۶	۱
۲۰۲	۳۲۴	۲۰۴	۳۲۰	۲
۱۸۸	۳۵۰	۲۰۶	۳۰۲	۳
۲۰۴	۳۳۰	۱۸۴	۲۸۸	۴
۲۴۰	۳۱۲	۱۹۶	۲۹۰	۵
۵۳ ± ۲۳۰	*۱۵ ± ۳۵۰	۱۱ ± ۲۰۰	*۱۳± ۲۹۹	میانگین

*در گروههایی که با علامت ستاره مشخص شده‌اند میانگین تعداد اجسام شبه رویانی شمارش شده در مقایسه با گروههای کنترل معنی‌دار است.

بحث

نتیجهٔ مهم این پژوهش ارائه روشی جدید جهت تهیه EB از سلولهای بنیادی رویانی(CCE) و بنیادی رویانی کارسینوما (P19) می‌باشد. یکی از روشهای شایع جهت تهیه EB بکارگیری پتریهای باکتریولوژیک پلاستیکی است (۵,۱۴,۲۰,۲۸). هنگام کشت سلولهای بنیادی رویانی در دیشها، این سلولها قادر به چسبیدن به کف آنها نبوده و به شکل معلق رشد می‌کنند در این صورت بتدریج در اثر تکثیر سلولها و احتمالاً اتصال سلولهای مجاور هم به همدیگر توده‌های سلولی در محیط کشت بوجود می‌آیند که به دلیل رفتار مشابهی که این توده‌های سلولی با بلاستوسیست اولیه دارند به آنها اصطلاحاً اجسام شبه رویانی گفته می‌شود. این عمل در حقیقت شبیه سازی یکی از مراحل تکوین جنینی در محیط آزمایشگاه به منظور مطالعه فرآیند تکوین جنین است. اما معمولاً درصد کم یا زیادی از سلولها به کف پتری دیشها متصل می‌شوند و بدین ترتیب روند تهیه اجسام شبه رویانی با اختلال مواجه می‌شود. لذا برای رفع این مشکل بعضی از محققین(ارتباط شخصی با MC Bueney)، [این مسئله در سایت اینترنتی Gottlieb[1] که یکی از محققین معروف در زمینه کشت و تمایز سلولهای P19 و ES به سلولهای عصبی است (۱۳,۲۹) هم اشاره شده است] تولیدات شرکت خاصی را برای این منظور توصیه می‌کنند. روش دیگری که جهت تهیه EB بکار گرفته می‌شود استفاده از روش قطره آویزان (Hanging drop) است در این روش محیط کشت حاوی سلول بر روی در وارونه شده پتری دیشها، به صورت قطرات کوچکی قطره‌گذاری شده و به آرامی در پتریها به حالت اولیه بر گردانده شده و بر روی پتری گذاشته می‌شود جهت جلوگیری از تبخیر مایع موجود در قطرات مقداری محیط کشت یا بافر فسفات استریل در کف پتری ریخته شده و بدون هیچگونه دستکاری پتریها درون انکوباتور گذاشته می‌شوند. معمولاً پس از طی مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در ته

1. http://thalamus.wustl.edu/gottlieblab/gottlieb_lab_3.html

www.SID.ir

Archive of SID

قطرات آویزان تجمعات سلولی تشکیل می‌شود. از ویژگیهای این روش این است که از طریق کنترل تعداد سلولهای موجود در هر قطره می‌توان EBهایی با اندازه‌های مورد نظر تهیه نمود (۱۵,۳۰). از اشکالات این روش مورد نیاز بودن تعداد زیادی ظرف کشت جهت تهیه اجسام شبه رویانی می‌باشد. ضمن اینکه معمولاً بعد از ۲۴ الی ۴۸ ساعت جهت ادامه آزمایش اجسام شبه رویانی تولید شده بایستی به پتریهای باکتریولوژیک پلاستیکی منتقل شود. متیل سلولز که از مغز چوب تهیه شده و در بعضی از موارد بصورت ماتریکسی جهت حمایت از سلولهای پیش ساز خونی استفاده می‌شود (۳۱) گاهی با غلظتهای خاصی به صورت یک محیط نیمه جامد جهت تهیه EB هم بکار گرفته می‌شود. زمانیکه سلولها در چنین محیطی کشت داده می‌شوند تمایل دارند بصورت ایستا و فاقد حرکت در محلی باقی مانده و با تکثیر خود کلونی‌های سلولی خاصی را تولید کنند. در هنگام استفاده از این محیط جهت تهیه EB، سلولهای بنیادی رویانی قادر به چسبیدن به کف پتریهای پلاستیکی نبوده و به صورت توده‌های سلولی یا EB، در محیط کشت تکامل می‌یابند. از ویژگیهای این روش این است که در محیط MCM[1]، معمولاً هر EB در نتیجه تکثیر یک سلول تکامل پیدا می‌کند که این منجر به ایجاد یک حالت همگن و یکنواخت در کشت می‌شود. بر عکس در هنگام استفاده از پتریهای باکتریولوژیک و فاقد محیط MCM، EB ها گاهی در اثر اتصال به همدیگر، توده‌های سلولی بزرگی را بوجود می‌آورند که نواحی نکروتیکی هم در آنها تکامل پیدا می‌کند. این توده‌های سلولی که از نظر اندازه غیر یکنواخت هستند قادر به پیروی از فرآیند همزمانی تمایز نیستند. ویژگی دیگر روش مذکور آن است که با استفاده از این روش می‌توان تکامل EBهای خاصی را در محیط کشت مشاهده و ردیابی کرد. استفاده از محیط MCM معایبی هم دارد یکی از معایب این است که کارآیی بعضی از دودمان‌های سلولهای بنیادی رویانی (DAB2 و BAM3) جهت تولید EB در محیط MCM بسیار پایین گزارش شده است، اگرچه می توان هنگام بکارگیری این دودمان‌های سلولی جهت تولید EB در ۲۴ الی ۴۸ ساعت اول از پتری دیشهای باکتریولوژیک استفاده کرد و سپس EBها را به محیط MCM منتقل کرد اما این عمل منجر به از دست رفتن ویژگی همزمانی[2] در تمایز سلولها می‌شود. یکی دیگر از معایب مهم روش مذکور این است که بررسی اثر فاکتورهای رشد بر روی سلولها،۲ الی ۳ روز پس از شروع آزمایش مشکل است چون فاکتورهای رشد به آرامی در محیط کشت توزیع می‌شوند. همچنین در بعضی از آزمایشها مانند فعالیتهایی که جهت جایگزینی بافت خونساز حیوانات درمان شده با اشعه (به منظور ساپرس کردن سیستم ایمنی) با بافت خونساز حاصل از تمایز سلولهای بنیادی رویانی صورت می‌گیرد، وجود محیط MCM می‌تواند بر پیچیدگی کار بیفزاید. نهایتاً اینکه هرگونه عامل اضافی همیشه می‌تواند منشاء مشکلاتی واقع شود (۳۲,۳۳).

لذا مروری بر روشهای مورد استفاده جهت تهیه EB از سلولهای بنیادی رویانی نشان می‌دهد که اگرچه انتخاب روش کار وسیستم تمایز بستگی به اهداف و سؤالات اصلی پژوهش دارد اما نظر

1. Methyl Cellulose Media

2. Synchrony

www.SID.ir

Archive of SID

به کارآیی روشها، سهل الوصول بودن آنها و معایب و مزایایی که هر کدام از آنها دارند می‌توان گفت که روش مبتنی بر استفاده از روشهای باکتریولوژیک از اهمیت بیشتری برخوردار است و عملاً هم در آزمایشگاههای مختلف بیشتر استفاده می‌شود (۵,۱۴,۲۰,۲۸) از طرف دیگر هنگامی که از روش قطره آویزان جهت تهیه EB استفاده می‌شود بعد از گذشت ۲۴ الی ۴۸ ساعت معمولاً بستگی به پروتکل مورد استفاده، توده‌های سلولی جهت ادامه روند تمایز به پتریهای باکتریولوژیک منتقل می‌شوند. بکارگیری محیط MCM به خاطر مشکلاتی که مورد اشاره قرار گرفت عملاً از عمومیت کمتری برخوردار است ضمن اینکه تهیه آن هم هزینه‌بردار است. لذا نظر به ضرورتی که تهیه EB در هنگام بکارگیری سلولهای بنیادی رویانی و سلولهای بنیادی رویانی کارسینوما در گونه‌های مختلفی مانند موش، میمون و انسان جهت انجام مطالعات مختلف دارد یافتن روشهایی جدید و یا تعدیل روشهای قبلی به نحوی که قادر به رفع مشکلات موجود در تهیه EBها باشند از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. رخداد جالبی که منجر به تشکیل EB از سلولهای بنیادی رویانی می‌شود ایجاد شرایطی است که مانع از اتصال این سلولها به سوبسترا (ظروف کشت) می‌شود که این ویژگی تا حد زیادی در پتری دیشهای باکتریولوژیک وجود دارد. در راستای ارتقاء کمی این ویژگی که تا به حال منحصر به پتری دیشهای باکتریولوژیک بوده است، در این پژوهش برای اولین بار از sigmacote به عنوان یک ماده هیدروفوب جهت تهیه پتری دیشهائی با ویژگی مذکور استفاده شد. این ماده یکی از تولیدات شرکت sigma بوده و به شکل یک حلال بی‌رنگ و شفاف به بازار عرضه می‌شود. ماده مذکور قادر است با گروههای Silaniol واقع در سطح ظروف شیشه‌ای واکنش داده و یک لایه نازک میکروسکوپیک، هیدروفوب و خنثی را تولید نماید. لایه مذکور مانع از اتصال آب، لخته‌های خونی یا پلاسمایی به ظروف شیشه‌ای شده و از absorption بسیاری از پروتئینهای بازی جلوگیری می‌کند که معمولاً در آزمایشگاههای انتقال خون هم بکار گرفته می‌شود. نتایج حاصل از استفاده از sigmacote در پژوهش حاضر، با روشی که جزئیات آن در بخش روشها اشاره شده است، نشان داد که این ماده می‌تواند از طریق لایه هیدروفوبیک نازکی که در کف ظروف شیشه‌ای ایجاد می‌کند مانع از اتصال دودمان‌های سلولی بنیادی مورد استفاده در این پژوهش به کف پتری دیشهای شیشه‌ای شده و بدینوسیله با کارآیی بالایی قادر به تولید EB باشد. این ویژگی با بکار گیری سلولهای P19 و CCE به ترتیب به عنوان یکی از انواع متعدد دودمانهای سلولی EC و ES تحت ارزیابی قرار گرفت و نتایج معنی‌داری حاصل شد. نتایج مشابهی هم در مورد دودمان سلولی NT_2 حاصل شد (اطلاعات نشان داده نشده است). این دودمان سلولی یکی از دودمان‌های سلولی بنیادی و کارسینومای انسانی است که کاربرد زیادی درتحقیقات داشته و از یک نوع تومور بیضه‌ای انسانی کلون شده است. توانایی آن در تمایز به سلولهای عصبی نسبت به بقیه سلولهای بدن بیشتر است (۳۴). لذا به کارگیری sigmacote مطابق روش مذکور در این مطالعه، جهت تولید اجسام شبه رویانی در مطالعات مبتنی بر تمایز سلولی برای انواع مختلف و متعدد دودمانهای سلولی EC و ES پیشنهاد می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

References:

1. Evans, M.,and M.H. Kaufman. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. Nature 1981, 292:154-156.
2. Thomson, J. A., J. Kalishman, T.G. Golos, M. Durning, C. P. Harris, R. A. Becker and et al. Isolation of a primate emberyonic stem cell line. Proc Natl Acad Sci 1995, 92:7844-7848.
3. Park, S., Y. J. Lee, K. S. Lee, H. A, Shin, H. Y. Cho, K. S. Chung, E. Y. Kim and et al. Establishment of human embryonic stem cell lines from frozen-thawed blastocysts using STO cell feeder layers. Hum Reprod 2004, 9(3):676-684.
4. Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall, and et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998, 282:1145-1147.
5. Bain, G., D. Kitchenes, M. Yao, J.E. Huettner, and D. I. Gottlieb. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. Dev Biol 1995, 163:342-357.
6. Maltsev, V.A., A. M. Wobus, J. Rohvedel, M. Bader, and J. Hescheler. Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. Circ Res 1994, 75: 233-244.
7. Hirashima, M., H. Kataoka, S. Nishikawa, N. Matsuyoshi, and S. Nishikawa. Maturation of embryonic stem cells into endothelial cells in an in vitro model of vasculogenesis. Blood 1999, 93:1253-1263.
8. Lumelsky, N., O. Blondel, P. Laeng, I.Velasco, R. Ravin, and R. McKay. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. Science 2001, 293(5529):428.
9. Bjorklund, L. M., R. Sanchez-Pernaute, S. Chung, T. Andersson, I.Y. C. Chen., K. St. P. McNaught, A.L, and et al. Embryonic cells develop in to functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. Proc Natl Acad Sci 2002, 99:2344-2349.
10. Johkura, K., L. Cui, A. Suzuki, R. Teng, A, Kamiyoshi, S. Okamura, S., and et al. Survival and function of mouse embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in ectopic transplants. Cardiovasc Res 2003, 58(2):435-43.
11. Bernat, S, B. Soria, E. Roche, G. Berná, T. León-Quinto, J. A. Reig, and et al. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice.Diabetes 2000, 49:157-162.
12. Liu, S., Y. Qu, T.J. Stewart, M.J. Howard, S. Chakrabortty, T.F. Holekamp,and et al. Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. Proc Natl Acad Sci 2000, 97: 6126-6131.
13. Gottlieb, D.I., and , J.E. Huettner. An in vitro pathway from embryonic stem cells to neurons and glia. Cells Tissues Organs 1999, 165: 165-172.
14. Fraichard A., Chassande O., Bilbaut G., Dehay c., Savatier P., Samarut J. In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. J cell Sci 1995, 108:3181-3188.

www.SID.ir

Archive of SID

15. Robertson, E. J. Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach, 1 st ed, Publisher: Oxford; Washington, D.C. : IRL Press, 1987:1-100.
16. Wiles M., Keller G. Multiple Hematopoietic Lineages develop from embryonic stem cells (SE) in culture. Development (Cambridge , UK) 1991; 111:259.
17. Brustle, O., K. N. Jones, R. D. Learish, K. Karram, K. Choudhary, O. D. Wiestler and et al. Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. Science 1999, 285: 754-756.
18. Chung, S., K.C. Sonntag, T. Andersson, L. M. Bjorklund, J.J. Park,D.W. Kim, and et al. Genetic engineering of mouse embryonic stem cells by Nurr1 enhances differentiation and maturation into dopaminergic neurons. Eur J Neurosci 2002, 16(10):1829-38.
19. Yamada, T., M. Yoshikawa , S. Kanda, Y. Kato, Y. Nakajima, S. Ishizaka, and et al. In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green stem cells. Stem Cells 2002; 20: 146-154.
20. Xian, H., E. McNichols, A. S. Clair, and D.I. Gottlieb. A subset of ES-cell-derived neural cells marked by gene targeting. Stem Cells 2003;21(1):41-9.
21. Nishikawa, S, S. Nishikawa, M. Hirashima, N. Matsuyoshi , and H. Kodama. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VEcadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. Development 1998, 125: 1747-1757.
22. Preston S.L., Alison M.R., Forbes S.J., Direkze N.C., Poulsom R. and Wright N.A. The new stem cell biology: something for everyone. Mol Pathol 2003, 56(2): 86-96.
23. D'Amour K., and Gage F.H. New tools for human developmental biology. Nature Biotechnology 2000, 18: 381- 382.
24. Odorico J.S., Kufman D.S., Thomson J.A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. Stem Cells 2001, 19:193-204.
25. Andrews P.W., Damjanov, I., Simon, D., Banting, G.S., Carlin, C., Dracopoli, N.C., and et al. Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. Lab Inves 1984, 50: 147-162.
26. Shamblott M.J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E.M.,Littlefield, J.W., Donovan, P.J., and et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. Proc Natl Acad Sci 1998,95*:* 13726-13731.
27. Stephen M. D., M. Kybe, R. Perlingeiro, G. Q. Daley, P.W. Zandstra. Effeicency of embryoid body formation and hematopoietic development from embryonic stem cells in different culture systems. Biotechnol Bioeng 2002, 78(4):442-53.
28. Elizabeth ,M. V., J. Villeneuve, M. W. McBurney, K. A. Rogers, and V. I. Kalnins. Retinoic Acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. The journal of cell 1982, 253-262.

www.SID.ir

Archive of SID

29. Ding, S., T. Y. H. Wu, A. Brinker, E. C. Peters, W. Hur, N. S. Gray, and et al. Synthetic small molecules that control stem cell fate. PNAS 2003, 100(13): 7632-7637.
30. Dony, C., M. Kessel, P. Gruss. An embryonal carcinoma cell line as a model system to study developmentally regulated genes during myogenesis.Cell Differ 1984, 15(2-4): 275-9.
31. Menge L, Larysa P., Robin L., Austin Smith. Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. Current Biology 1998, 8:971–974.
32. McBruney MV, Jones V. Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line. Nature 1982, 299:165-168.
33. Yao M., Bain G., and Gotttieb D.I. Neuronal differentiation of P_{19} embryonal carcinoma cells in defined media. Journal of Neurosciemoe Research 1995, 41: 792-804.

www.SID.ir

Archive of SID

Producing Embryoid Bodies from Embryonal Stem Cells Using Siliconized Petri Dishes

Fathi, F., M.Sc[1], Torihi, T., Ph.D.[2], Mola, S.j., Ph.D.[3], Movahedin, M., Ph.D.[4], Sadeghizadeh, M., Ph.D. [5]*

ABSTRACT

Introduction: Embryoid bodies (EBs) are primitive embryonic structures derived from differentiating embryonic stem cells (ESCs). Many techniques have been used to obtain EBs, the improvement of the technique of EBs formation can help in achieving better results in ESCs differentiation into neurons, myocardiocytes, hemopoietic cells and others. In this investigation Sigmacote was used as a hydrophobic substrate to improve EBs formation.

Material and Methods: Petri dishes` floor was been siliconized by a three-step procedure and with sigmacote. Then CCE and p19 cell line were used to obtain EBs in these siliconized petri dishes. These cells were transmitted to petri dishes, the concentration of them was 1×10^5 cells/ml, after 48 hours embryoid bodies were counted. Control group was bacteriologic petri dishes with same conditions.

Results: The results of EBs calculation showed that siliconized petri dishes in comparison with bacteriological petri dishes can be produced EBs with high efficiency and statistically it was significant ($p<0.05$).

Conclusion: Results of this research indicated that sigmacote as a hydrophobic substrate can improve EBs formation by an easy and reproducible method. Therefore it is suggested to increase EBs formation and differentiation of ESCs.

Key words: Embryoid body, Hydrophobic substrate, Sigmacote, P19 cell line, CCE cell line

* 1. Master of Anatomy, Ph.D Student, Antomy Department, Tarbiat Modares University.
2. Professor in Anatomy, Anatomy Department, Tarbiat Modares University, Tehran, Corresponding Author.
3. Assistant Professor of Genetic, Tarbiat Modares University.
4. Assistant Professor in Anatomy, Tarbiat Modares University.
5. Assistant Professor in Genetic, Tarbiat Modares University.

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir