بررسی توانای حفظ و نگهداری سلولهای بنیادی جنینی توسط سلولهای بنیادی مزانشیمی خون بند ناف بعنوان لایه تغذیه کننده

سعید حیدری کشل[1,2,3*]، مصطفی رضایی طاویرانی[2]، مریم ابراهیمی[2] مسعود سلیمانی[4]، رضا روز افزون[3]، سعید کاویانی[4]، غلامرضا بهروزی[2]، شهرام محمد پور [5]، اردشیر معیری[5]

1)کمیته تحقیقات دانشجویی، مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

2)مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

3)گروه مهندسی بافت و سلول درمانی، دانشکده فن آوریهای نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

4)گروه هماتولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

5)گروه آناتومی، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ دریافت: **تاریخ پذیرش:**

چکیده

مقدمه: از سلولهای فیبروبلاستی جنینی موش (MEFs) برای حمایت از رشد سلولهای بنیادی جنینی موشی (mESCs) و یا سلولهای بنیادی جنینی انسانی (hESCs) استفاده می شود. تکثیر پیوسته وپی درپی سلولهای mESCبطور معمول توسط هم کشتی این سلولها با MEF بدست می آید. سلولهای MEF بعنوان یک لایه پشتیبان برای سلولهایmESC عمل می کنند. احتمال انتقال رتروویروسها و دیگر پاتوژنها در اثر همجواری سلولهای MEF(که منشاء موشی دارند) با سلولهای ES وجود دارد.

مواد و روش ها: سلولهای سوماتیک نامحدود، مشتق شده ازخون بند ناف انسان (ussc) ازاهداکنندگان متعددی بدست آمد. از این سلولها بعنوان لایه پشتیبان جهت حمایت از رشد سلول C4 mESC مورد استفاده قرار گرفت.

یافته های پژوهش: کلونی های سلولهای mESC که برروی hUSSC غیر فعال شده کشت یافته بودند در طی 30 روز کشت پی درپی بیش از 600 برابر تکثیر یافتند (درطی 10 پاساژ) در سلولهای mESC گسترش یافته برروی hUSSC ، مشاهده گردید که مورفولوژی این سلولها و مارکرهای مولکولی ویژه سلولهای mESC تمایز نیافته، همگی همانند سلولهای mESC هستند که برروی MEF گسترش یافته است. این سلولها از نظر فاکتورهای رونویسی همچون OCT4 ، nanog و همچنین آنزیم تلومراز و LIFR , LIF , Brachyury , B2m , BMP4 , Rex1 مثبت بودند.

بحث و نتیجه گیری: سلولهای mESC کشت داده شده برروی hUSSC دارای پتانسیل تمایزی جهت تمایز به هر 3 لایه زاینده سلولی (آندودرم، مزودرم، اکتودرم) می باشند ودارای کاریوتایپ دیپلوئید طبیعی نیز هستند. انجام مطالعات بیشتر برروی hUSSC شاید منجر به توسعه و بهبود روشهای کلینیکی برای گسترش سلولهای hESC در سلول درمانی نوین گردد.

واژه های کلیدی: سلولهای بنیادی جنینی, خون بند ناف, لایه تغذیه کننده, کاریوتایپ

***نویسنده مسئول:** مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

Email: Saeed_Heidari@spu.ir

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

مقدمه

سلولهای بنیادی جنینی، سلولهای بالقوه چند ظرفیتی (totipotential) بوده واغلب از توده داخل سلولی (inner cell mass) جنین در مرحله بلاستوسیست بدست می آید. این سلولها دارای ویژگی های خاصی می باشند که از آن جمله می توان به قابلیت تمایز به انواع رده های سلولی ونامیرایی آنها اشاره نمود. استفاده وکاربرد سلولهای بنیادی جنینی از سال 1981 آغاز شده است. برای مطالعه in vitro سلولهای جنینی به دو روش عمل می کنند. 1) کشت سلولهای بنیادی جنینی بر سطح سلولهای فیبروبلاست جنینی موش که قبلاً توسط اشعه γ یا میتومایسین C ، فعالیت میتوزی آن متوقف شده است. 2) کشت سلولهای بنیادی جنینی در حضور LIF (Leukemia inhibitory factor) که بصورت نوترکیب فراهم گردیده است. از نظر مورفولوژی، کلونیهای فشرده ای ازسلولهای کوچک با سیتوپلاسم اندک وهستک واضح می باشند. این سلولها درطی تکثیرهای پی درپی، کاریوتایپ نورمال (46XX , 46XY) خود را حفظ میکنند. این سلولها درعین حال که قابلیت حفظ حالت تمایز نیافته رادر شرایط in vitro دارا می باشند، می توانند به گستره وسیعی از سلولهای بالغ، تحت شرایط خاص متمایز گردند. این سلولها درطی 18 تا 12 ساعت تقسیم می شوند. مدت زمان تقسیم دراین سلولها به تطبیق آنها با محیط پیرامون خود در in vitro بستگی دارد. لایه پشتیبان از جنس فیبروبلاست اولیه موش 13/5 روزه (MEF) به دفعات جهت کشت وجداسازی سلولهای بنیادی جنینی مورد استفاده قرارگرفته است. MEF از جمله مهمترین حمایت کننده های رشد و تکثیر سلولهای ES تلقی می شود. با گذشت سالیان سال از کشف MEF به عنوان لایه پشتیبان، هنوز جایگزین مناسب با منشاء انسانی برای آن یافت نشده است. از دیگر لایه های پشتیبان که برای حمایت از ESاستفاده می شود، می توان به فیبروبلاست پوست جنین، سلولهای اپیتلیال لوله فالوپ، سلولهای مزانشیمال مغز استخوان، سلولهای فیبروبلاست ناحیه ختنه گاه (foreskin) ، سلولهای فیبروبلاست پوست بالغ، STO (mouse SIM embryonic fibroblast) اشاره کرد(1،2). سلولهای بنیادی جنینی چنانچه در محیط کشتی قرار گیرند که فاکتورهای مهارکننده تمایز را نداشته باشد به سرعت به رده های مختلف سلولی متمایز می گردند(3). براین اساس جهت جلوگیری از تمایز ناخواسته سلولهای بنیادی جنینی در in vitro ، از فاکتورهای مختلفی استفاده می شود که از آن جمله می توان به LIF یا DIA (Differetiation inhibitory activity) ، TPO ، SCF ، 1L-6 ، اشاره نمود. از این رو سلولی که به عنوان یک لایه پشتیبان پیشنهاد داده می شود، می بایست، این فاکتورها رابه صورت سطحی یا ترشحی داشته باشد. mESCsاز نظر مارکرهایی همچون Oct-4، Nanog ، SSEA-1تلومراز ، آلکالین فسفاتاز مثبت می باشد(4). با استفاده از LIF و پلیتهای پوشانده شده با ژلاتین یا استفاده از ECM (extra cellular matrix) تا حدودی فقدان لایه پشتیبان را جهت حمایت از ESCs در حالت تمایز نیافته برطرف خواهد کرد. اثر فاکتور LIF برسلولهای بنیادی جنینی، مثالی آشکار از عوامل کنترل کننده فعالیت سلولی می باشد. درحضور LIF معمولاً به مقدار اندک، سلولهای ES دچار تمایز می گردند و افزایش مقدار LIF نیز تاثیری برجلوگیری از این حداقل تمایز ندارد(5-1). دراین مطالعه ازسلولهای USSCs(Unrestricted somatic stem cells) به عنوان لایه پشتیبان جهت حمایت از تکثیر و رشد سلولهای بنیادی جنینی موش استفاده گردید. سلولهای USSC برای اولین بار در سال 2003 از خون بند ناف توسط Jager جداسازی و قابلیت های تمایزی آن جهت Transplantation مورد ارزیابی قرار گرفت. در سال 2004 نیز Koghler این سلولها از نظر تولیدات سایتوکاینی مورد بررسی قرارداد. سلولهای USSC فی نفسه pluripotent و (پرتوان) بوده و جزء جمعیتهای سلولی بسیار نادر وکمیاب خون بند ناف محسوب می شوند. سلولهای USSC قدرت تکثیر وظرفیت تمایزی بسیار بالایی دارد و بدین دلیل، از جمله منابع با ارزش در سلول درمانی محسوب می شوند(1). USSC یک سلول چسبنده ، CD43- و HLA II- با تلومری طویل می باشد. این سلول دارای الگوی سایتوکاینی منحصر به فردی می باشد و درصد بالایی از تولیدات مربوط به

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

فاکتورهای خودسازی را دارا می باشد (1و2). از این رو گزینه ای مناسب برای حمایت از سلولهای ES در نظر گرفته شده است.

مواد و روش ها

جداسازی و کشت سلولهای USSC ازخون بند ناف :

با توافق مادران، خون بندناف آنها از سیاهرگ بند ناف جمع آوری شد. تنها 40% ازنمونه های خون بند ناف، سلول USSC را دارا بودند. میانگین سنی افراد اهداءکننده 28 سال بود. پس از جمع آوری نمونه ها، با استفاده ازآمونیوم کلراید ، RBS لیز شده و با فایکول ، عمل جداسازی ادامه یافت، سپس با PBS استریل (PH=714) دوبار شستشو داده بعد از سانتریفیوژ سلولهای بدست آمده در محیط کشت DMEM کم گلوکز غنی شده با دگزامتازون 100 نانومولار، 15% FBS و آنتی بیوتیکهای پنی سیلین و استرپتومیسین قرار گرفت. اولین تعویض محیط پس از گذشت 24 ساعت انجام گرفت. بعد از آن هر 4 روز یکبار تعویض محیط انجام گرفت. پس از آنکه سلولها 80% از سطح فلاسک را پر کردند با استفاده از 0,25% تریپسین و EDTA پاساژ انجام گرفت. سلولهای USSC در محیط کشت بطور یکنواخت گسترش یافته و به منظور رشد به دمای $37^{o}C$ و 5% Co2 نیاز دارد.

آنالیز کاریوتایپ برای سلولهای mESC و USSC :

قبل و بعد از همکشتی سلولهای mESC با USSC، هر دوی آنها را مورد انالیز قرار می دهیم. ترجیحاً اولین و آخرین پاساژها مورد آنالیز کاربوتایپ قرار گرفت. ابتدا سلولها را برای مدت 4-3 ساعت با g 0,1µlml کولسمید درون آنکوباتور قرارداده سپس سلولها را تریپسینه کرده و 75% محلول kcl را به سلولها اضافه نموده و به مدت 20 دقیقه در دمای C 37° و 5% Co2 درون آنکوباتور قرارداده شد. در مرحله بعد، متانول و اسید استیک را به نسبت 3 به 1 جهت فیکس کردن نمونه ها اضافه شده سپس سلولها را از ارتفاعی بر سطح لام گسترانیده و کروموزومها مورد آنالیز کاریوتایپ قرارگرفتند.

آماده سازی لایه پشتیبان ازجنس USSC :

از پاساژهای 2 تا 55 سلولهای hUSSC بمنظور لایه پشتیبان برای سلولهای C4mESC(Royan C4) استفاده گردید. ابتدا سلولهای USSC را با استفاده از 10µg/ ml میتومایسین C sigma-chemical co (st.louis) به مدت 90min، از نظر تقسیمات میتوزی غیر فعال نموده سپس با استفاده از PBS استریل 3 بار شستشو نموده تا میتومایسین C حذف گردد. با استفاده از1x Trypsin (Grand Island ™Gibco) EDTA/به مقدار 0.25% سلولها را از فلاسک جدا کرده و سانتریفیوژ انجام گردید. سپس با استفاده از DMEM(Grand Island ™Gibco) و 15% FBS(Gibco™) و 15% FBS (Gibco™) رسوب سلولی را سوسپانسیون نموده، سلولها را با استفاده از هموسایتومتر مورد شمارش قرارداده، پس از چسبیدن سلولهای USSC به کف فلاسک، محیط کشت آنها را با محیط کشت سلولهای بنیادی جنینی تعویض می نمائیم. این محیط حاوی KO-DMEM (Gibco™ Grand Island)، ESFCS (Gibco™) وگلوتامکس 100x (Glutamax 100x) (Gibco™) و 0.1mM β مرکاپتواتانول (sigma- chemical st-louis) و اسیدهای آمینه غیر ضروری (Gibco™ Grand Island 1% v/v NNAA) و EGLF (LIF) (sigma-chemical st-10) به مقدار 1000 U/ml, استرپتومایسین 100µg/ml (Gibco™Grand Island) می باشد. 24 ساعت سلولهای USSC غیر فعال شده را در مجاورت محیط کشت ES قرارداده تا شرایط جدید سازگار گردند.

کشت سلولهای mESC برروی لایه پشتیبان انسانی:

پس از آماده سازی سلولهای USSC به عنوان یک لایه پشتیبان و سازگار شدن این سلولها با محیط کشت سلولهای بنیادی جنینی، سلولهای mESC را از فریزر $-80^{o}C$ خارج نموده وروی لایه پشتیبان USSC ، انتقال یافت. مناسب ترین شرایط جهت پاساژ، زمانی است که قطر کلونی های سلولهای mESC µm 400-200 و تعداد این سلولها 45×10^8 باشد. حدود 24ساعت قبل از پاساژ سلولهای mESC ، محیط کشت سلولهای USSC را با محیط کشت سلولهای

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

بنیادی جنینی جایگزین نموده ، کشت سلولهای بنیادی جنینی موش نیازمند دمای 37^oC و 5% Co2 می باشد. محیط کشت این سلولها نیز می بایست هرروز تعویض گردد.

آماده سازی RNA و آنالیز بیان ژن :

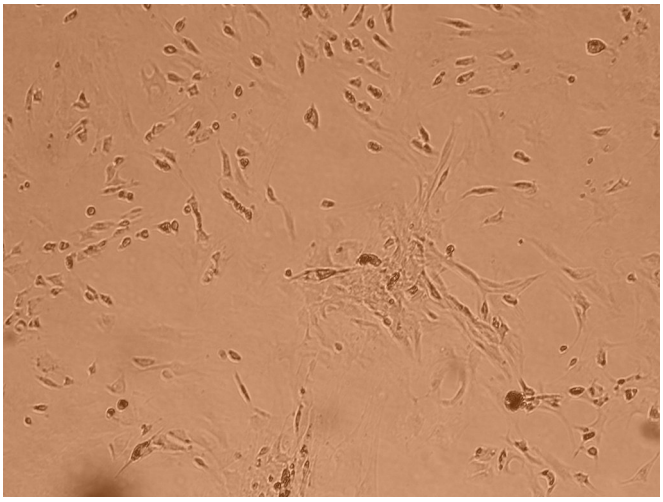
برای این منظور RNA سلولهای مورد نظر با استفاده از پروتکل شرکت Fermentas جدا سازی شد. در ادامه ساختcDNA با استفاده از کیت H minus first strand cDNA synthesis kit (Fermentas) Revert Aid واکنش رونویسی معکوس انجام شد.

یافته های پژوهش:

کشت سلولهای USSC انسانی:

جداسازی و کشت سلولهای USSC انسانی از خون بند ناف انجام شد. این سلولها تا 50 پاساژ به طور پیوسته کشت داده شدند. سلولهای USSC از سرعت تکثیر بسیار بالایی برخوردار بوده بطوری که مرتبا نیاز به پاساژ دارند. میزان تکثیر و مورفولوژی این سلولها قبل از فریز کردن و بعد از خارج نمودن از فریز کاملاً یکسان و مشابه می باشند.

در طی مراحل مختلف کار با سلول USSC هیچ گونه علامتی مبنی بر آلودگی این سلولها با ویروسها یا مایکوپلاسماها مشاهده نگردید. از آنجایی که سلولهای USSCمی بایست به عنوان یک لایه پشتیبان در مدت زمان طولانی عمل کنند بنابراین پاساژهای ابتدای آن ، مقداری فریز نموده تا ذخیره مناسب از این سلولها موجود باشد. سلولهای USSC از نظر مورفولوژی ، سلولهای چسبنده و دوکی شکل هستند که دارای اندازه هایی معادل 20-25µm می باشد (تصویر شماره 1).

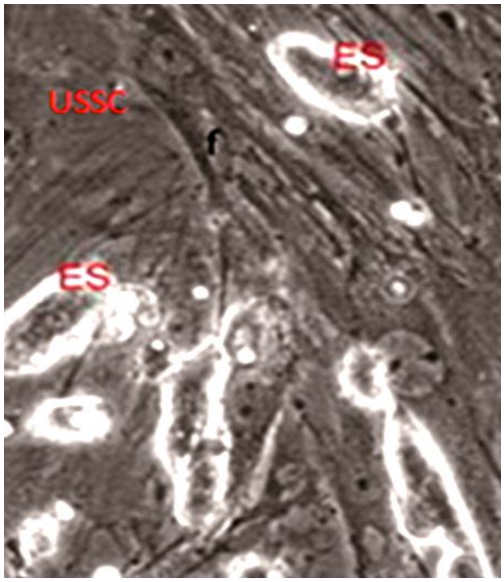


تصویر شماره 1: سلول های بنیادی مزانشیمی خون بند ناف (USSC) در پاساژ 3 که دارای مورفولوژی تیپیک دوکی شکل می باشند (میکروسکوپ اینورت- بزرگنمایی 20).

مورفولژی سلولهای mESC:

سلولهای mESC برروی لایه پشتیبان انسانی ، بخوبی توانایی تکثیر پیوسته خود را حفظ نمودند. C4mESCs برروی hUSSC ، بیش از 30 پاساژ پی درپی را پشت سر گذاشته و توانستند در حالت تمایز نیافته باقی بمانند. سلولهای mESCs رروی لایه پشتیبان MEF دارای مورفولوژی تیپیک می باشند که شامل نسبت بالایی هسته به سیتوپلاسم ، هستک واضح ، سلولهای بهم فشرده و عدم وجود فضای بین سلولی. مورفولژی سلولهای mESC برروی USSC نیز کاملا شبیه سلولهای MEF می باشد و دارای همان مورفولوژی تیپیک است (تصویر شماره 2).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

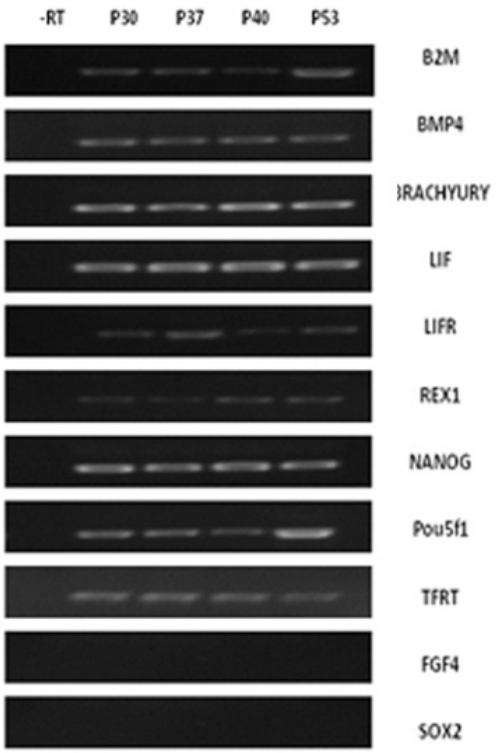


تصویر شماره 2: سلول های بنیادی جنینی به شکل کلون های مجتمع و مشخص بر روی لایه تغذیه کننده USSCs کشت یافته اند (میکروسکوپ اینورت – فاز کنتراست ، بزرگنمایی 40).

بیان مارکرهای اختصاصی سلولهای Pluripotent:

در این مطالعه از β گلوبولین به عنوان کنترول منفی استفاده شد. سلولهای بنیادی جنینی موش کشت داده شده برروی لایه پشتیبان انسانی از نظر ژنهای pluripotency مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمون RT-PCRبرای ژنهای Oct-4، Nonog TERT، LIFR ، LIF ، Brachyury ، Rex1 ، B2m ، به شدت مثبت بودند (شکل1).آزمون RT-PCR برای سلولهای ESکه – پاساژهای 30-37- 40- 53 را پشت سر گذاشته بودند ، انجام پذیرفت. بنابراین مشخص گردید که تمام کلونی های ES که برروی لایه پشتیبان hUSSC قرار داشتند ، بیان ژنهای Pluripotency در آنها حفظ شده است. این بیان ژنی مشخص می کند که سلولهای ES برروی لایه پشتیبان USSC کاملاً در شرایط عدم تمایز قرار داشته و سلولهای hUSSC به عنوان لایه پشتیبان ، حمایت بسیار مناسب و در خور توجه ای داشته اند. آزمون ایمونوسیتوشیمی نیز برای Oct-4انجام گرفت (شکل4). مطابق شکل ...تمامی کلونی هایی ES که برروی لایه پشتیبان hUSSCقرارداشتند از نظر این مارکرهای اختصاصی سلولهای بنیادی جنینی به شدت مثبت بودند (تصویر شماره 3).

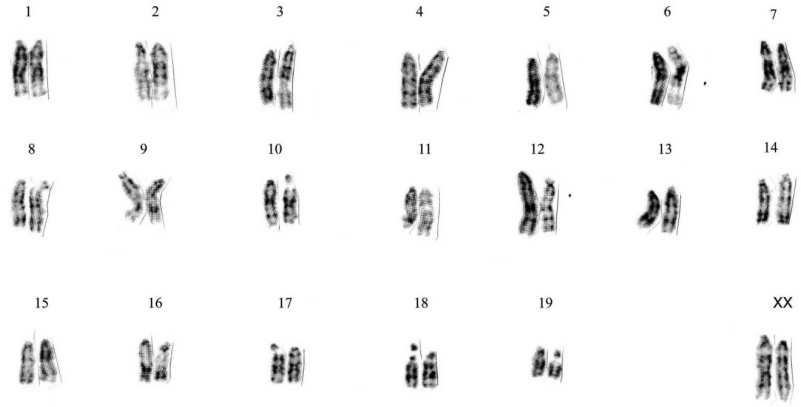
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]



تصویر شماره 3: نتایج بیان ژنهای پلوریپوتنسی را در سلول های بنیادی جنینی رشد یافته بر روی لایه تغذیه کننده انسانی (USSC) را نشان میدهد.

آنالیز کاربوتایپ برای سلولهای USSC:

سلولهای USSC را قبل از شروع آزمایشات در پاساژ2 مورد آنالیز کاربوتایپ قرار داده ، مشخص گردید که دارای کاربوتایپ کروموزومی نورمال 44xx می باشد. پس از گذشت 48 پاساژ دیگر ، این سلولها دوباره مورد آنالیز کاربوتایپ قرار گرفتند و مشخص گردید که دارای کاربوتایپ کوروموزومی نورمال 44xx هستند. شکل 4 کاربوتایپ کوروموزومی سلولهای USSC را نمایش می دهد.



تصویر 4: کاریوتایپ سلولهای بنیادی USSC را نشان میدهد که دارای کاریوتاپینگ نورمال بودند.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

بحث و نتیجه گیری

سلولهای USSC ، سلولها ی بنیادی چسبنده ، $CD43^-$هستند که از خون بند ناف (CB) جداسازی شده اند. این سلولها دارای تکثیر نامحدود بوده و جزءسلولهای بنیادی pluripotent تقسیم بندی می شوند (6). برخلاف دیگر انواع سلولهای مزانشیمال موجود در خون بند ناف که تنها به استئوبلاست ، کندریوسیت و چربی (8 و 7) و یا به سلولهای عصبی (10،11) متمایز می گردند، سلولهای USSC قادر هستنددر شرایط exvivo به استخوان ، غضروف ، سلولهای خونی ، عصب ، کبد ، بافت قلبی متمایز گردند. (6) این سلول فاکتورها ی متعددی را بیان می کندکه شامل مولکولهای چسبنده ، فاکتورهای رشد و سایتوکاین های متعدد می باشد.refl a new(SCF VEGFو GM-CSF و M-CSF و TGF-1β و 1L-6 و G-CSF و LIF (Flt3 liyand و TPO و HGFو SDF-1α و 1L-5 و 1L-12 و 1L-8 و1L-1β(7). در این مطالعه مشخص گردید که برایند ترشحات سایتوکاینی سلول USSC درقالب یک لایه پشتیبان (feeder layer) منجر به حفظ سلولهای mESCدر حالت عدم تمایزی می گردد. این سلول فراوانی اندکی در CB دارد ولی قدرت تکثیر بسیار بالایی در in vitro دارد که همچنان در پاساژهای بالا هم دارای کاریوتایپ طبیعی می باشند. سلولها ی mESCو hESC معمولا برروی لایه پشتیبان MEF حفظ و نگهداری می شوند. این سلولها می توانند لایه پشتیبان بسیار مناسبی برای ES باشند آنها را در طی پاساژهای پیوسته و متوالی نگهداری کرده و در شرایط عدم تمایز حفظ نماید. اما کار با MEF همواره با احتمال ریسک انتقال آلودگی های ویروسی و دیگر پاتوژنها ی حیوانی همراه می باشد. این نقیصه زمانی که از سلولهای ES برای کارها ی کلینیکی بخواهند استفاده کنند نمود پیدا کرده بطوری که خود یکی از علل محدود بودن استفاده از ES در کارهای کلینیکی می باشد. مطالعات متعددی در این زمینه انجام شده و از سلولهای نخستین انسانی همچون فیبروبلاست پوست جنین ، سلولها اپیتلیال لوله فالوپ ، سلولهای بالغ مغز استخوان ، سلولهای فیبروبلاست ناحیه ختنه گاه (foreskin) ، سلولهای فیبروبلاست پوست بالغ به عنوان لایه پشتیبان و نگهدارنده استفاده شده است (Richards et.al 2002 , 2003) (11و12و 13و 14) اخیرا به منظور بهبود شرایط کشت های بدون لایه تغذیه کننده ای که درآن از ECM (ماتریکس خارج سلولی) و MEF-cm (محیط سلولهای MEF که حاوی ترشحات سایتوکاینی این سلولها می باشند) و عوامل دیگر دخیل در رشد و نگهداری این سلولها در حالت عدم تمایز می باشد ، استفاده شده است(17 و 16و 15و 18) بدین ترتیب باز هم از ترشحات سلولهای MEF جهت رشد و نگهداری سلولهای ES استفاده شده است و فاکتورهای دخیل در کنترول مراحل self-renewal سلولهای ES ، که این سلولها را در فاز عدم تمایز حفظ می کند بطور کامل شناخته نشده اند. سلولهای بنیادی جنینی موش در فاز تمایز نیافته دارای مورفولوژی تیپیک خاصی می باشند که درآن نسبت هسته به سیتوپلاسم زیاد و هسته آشکار و سلولهای بنیادی جنینی در کلونی های خود بسیار به هم فشرده هستند. کلونی ها به حالت بیضوی و صاف آرایش می یابند. در مطالعات گذشته مورفولوژی سلولهای mESC برروی لایه های حمایت کننده مختلف ، تفاوت فاحشی با مورفولوژی این سلولها برروی لایه تغذیه کننده MEF داشتند. در این مطالعه از سلولهای hUSSC mESC مشتق شده از CB انسانی به منظور تکثیر پیوسته سلولهای mESC استفاده شد. سلولهای USSC که از اهداء کنندهای متعددی جمع آوری شده اند توانستند در پاساژهای 2 تا 50 سلولهای mESCرا در شرایط عدم تمایزی حفظ و تکثیر آنها را تضمین نمایند. تکثیر سلولهای mES بروی hUSSCاز نظر بیان مارکرهای مولکولی و مورفولوژی سلولی بسیار شبیه سلولهای mESC است که بروی MEF گسترش یافته اند. این سلولها توانایی تمایز به تمام رده های سلولی را دارند و کاربوتایپ آنها نیز نورمال می باشد. Rechard at al گزارش کردند که سلولهای پوست جنین و سلولهای عضله که از جنین 14 هفته ای بدست می آید نیز توانایی حمایت از رشد و تکثیر پیوسته سلولهای ES را دارند (19). نکته بسیار مهم که در این باب قابل بحث می باشد این مقوله

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

است که بدست آوردن این سلولها از جنین انسان از نظر اخلاقی مشکلات فراوانی داشته و با اصول اخلاقی مغایرت دارد که خودعامل محدودیت در استفاده از این سلولها نیز می باشد (19). محققین همچنین از سلولهای پشتیبان انسانی بدست آمده از لوله فالوپ (AFT) نیز برای حمایت از سلولهایES استفاده نموده اند. سلولهای AFT را به حالت نامیرا در محیط in vitro کشت داده پس از آنها به منظور حمایت از سلولهای ES بهره بردند که البته چندان سودمند نبود. در قیاس با دیگر سلولهای کاندید برای لایه پشتیبان ، سلولهای USSC را می توان از اهداءکننده گان سالم و بالغ بدست آورده و قبل از همکشتی آنها با سلولهای ESجهت حمایت از سلولهای بنیادی جنینی موش ، می توانند چندین میلیون برابر تکثیر یابند. ازجمله مزایای استفاده از سلولهای USSC در گسترش سلولهای mESو یا حتی hESC hES آن است که سلولهای USSC غیر خودیی در محیط کشت و یا حتی حیوانات بزرگ هیچگونه واکنش ایمنی مبنی بر برانگیختن سلولهای لموفوسیت T نخواهد داشت. تازه ترین اطلاعات ، آشکار ساخت که سلولهای hUSSC دارای توانمندی قابل ملاحظه ای در ایجاد پس نورد تنظیمی پاسخ ایمنی میزبان می باشند که در طی 3 پیوند مشخص گردید(6). USSCقادر است در in vitro پاساژها ی متعددی را برای مدت زمان طولانی پشت سر گذاشته و خللی در قدرت تکثیرش بوجودنیاید. USSCمی تواند بیش از 50 پاساژ را پشت سر گذارد بدون آنکه تمایز خود به خودی و ناخواسته ای پیداکنند. این درحالی است که سلولهای لایه تغذیه کننده MEF تنها تعداد محدودی پاساژ (حدودا 7پاساژ) قادر به حمایت از ES می باشد پس از آن وارد فاز پیری شده و موجب القاء تمایز ناخواسته در سلولهای ES می گردد. سلولهای USSC قابلیت حمایت از سلولهای بنیادی جنینی را از همان ابتدای جداسازی دارد ، در دیگر لایه های پشتیبان ، معمولا سلولهای ES را ابتدا رویی MEF برده و سپس ESCs را به لایه پشتیبان جدید منتقل می کنند (1). نکته جالب توجه در مورد روند حمایتی سلولهای USSC از سلولهای mES این مطلب می باشد که این سلولها در پاساژهای بالا فرایند حمایت از سلولهای mES رابسیار بهتر از پاساژهای پائین انجام می دهند که تداعی کننده این مطلب است که شاید الگوی سایتوکاینی این سلولها در طی پاساژهای بالاتر تکامل یافته و کیفیت بهتری بدست می آورند. سلولهای USSC قادرند سلولهای بنیادی جنینی را که از تانک ازت یا فریزر 80- خارج شده اند را نیز حمایت کرده و از آنها حفاظت نمایند. سلولهای USSC دارای تلومر بسیار طویل و فعالیت شدید آنزیم تلومراز می باشد. طول تلومر در آنها ،در قیاس با سلولهای مزانشیمال مغز استخوان بسیار طویلتر می باشد (7). این ویژگی برای سلولی که به عنوان یک لایه پشتیبان برای ES معرفی می گردد بسیار مهم و با ارزش می باشد زیرا بسیار دیر به فاز پیری می رسد و می تواند پاساژهای متعددی را پشت سر بگذارد.

سپاسگزاری

بدین وسیله تشکر و قدر دانی خود را از جناب آقای دکتر نائب علی احمدی ، سرکار خانم موسوی بموجب حمایتهای بیدریغشان اعلام مینمایم. مقاله حاظر بخشی از پایانامه دکتری سعید حیدری کشل می باشد.

References

1- Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA. Myeloid leukemia inhibitory factor maintans the development potential of embryonic stem cells. Neture 1988; 336:684-7.

2- Bonyo A, Fonyc Y, Nys C, Ratnam S. Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. Human Reprod 1994;9; 2110-7.

3-Cole RJ, Edwards RC, Poul J. Cytodifferentiation in cell colonies and cell strains derived from cleaving ova and blastocysts of the rabbit. J Exp Cell Res 1964; 501-4.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

4- Smith AG. Mouse embryo stem cells: their identification, preparation and manipulation. Semin Cell Biol 1992;3:385-99.
5- Jager M, Sager M, Knipper A, Degistrci O, fischer J, Kogler G, et al. In –vitro-und in-vivo-Knochenregenerierung durch mesenchymale sstammzellen aus dem nabelschnurblut. Orthoped 2004;33:1361-72.
6- Kogler G, Sensken S, Airey JA, et al. A new human somatic stem Cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation Potential, J Exp Med 2004;200:123-35.
7- Ko¨gler G, Radke TF, Aure´lie L, Sensken S, Fischer J, Ru¨diger V. et al. Cytokine production and hematopoiesis supporting activity of cord blood–derived unrestricted somatic stem cells. Exp Hematol 2005; 33: 573-83.
8- Airey JA, Almeida-Porada G, Colletti EJ, Porada CD, Chamberlain J, Movsesian M, et al. Human mesenchymal stem cells from purkinje fibers in fetal shee2004 p heart. Circulation 2004;109:1401-7.
9-Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. Stem Cells 2003; 21:105-10.
10- Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, Bogucki BD, Quinn CO, Wall DA. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. Biol Blood Marrow Transplant 2001.
11- Richards M. Fong CY, Chan WK, Wong PC, Bongso A. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of Human inner cell masses and embryonic stem cell lines. Nature Biotechnol 2002; 20: 933-6.
12- Cheng L, Hammond H, Ye Z, Zhan X, Dravid G. Human adult Marrow cells support prolonged expansion of human embryonic Stem cells in culture. Stem Cells 2003;21 131-42.
13- Amit M. Margulets V. Segev H. Shariki K. Laevsky I. Coleman R, et al. Human feeder layers for human embryonic Stem cells. Biol Reprod 2003;68: 2150-6.
14- Hovatta O, Mikkola M, Gertow K, Stromberg AM, Inzunza J, Hreinsson J, et al. A culture system using foreskin fibroblasts as feeder cells Allows production of human embryonic stem cells. Human Reprod 2003;18: 1404-9.
15- Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD et al. Feeder-free growth of undifferentiated human Embryonic stem cells. Nature Biotechnol 2001;19 971-4.
16- Amit M, Shariki C, Margulets V, Itskovitz-Eldor J. Feeder Layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. Biol Reprod 2004;70: 837-45.
17- Carpenter MK, Rosler ES, Fisk GJ, Brandenberger R, Ares X, Miura T, et al. Properties of four human embryonic Stem cell lines maintained in a feeder-free culture system. Develop Dynam 2004;229: 243-58.
18- Rosler ES, Fisk GJ, Ares X, Irving J, Miura T, Rao MS, et al. Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-Free conditions. Develop Dynam 2004;229: 259-74.
19- Oshima R. Stimulation of the colonal growth and differentiation of feeder layer dependent mouse embryonal carcinoma cell β-mercaptpethanol. Differentiation 1978; 11:149-55.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

Ability of conservation embryonic stem cells, umbilical cord blood mesenchymal stem cells as a feeder layer

heidari keshel S[1,2,3], Rezaei Tavirani M[2], Ebrahimi M[2], solimani M[4], Roozafzoon R[3], kaviani S[4], Behrozi Gh.R[2], Mohammadpour Sh[5], Moayeri A[5]*

(Received: Accepted:)

Abstract

Introduction: Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) have been applied to support the growth mouse embryonic stem cells (MESCs) or human embryonic stem cells (hESCs). The protocol has been accomplished through the plating of the blastocysts on mouse embryonic fibroblast (MEF) and expansion of the outgrowth in to established embryonic stem (ES) cell line. ES cell are capable of unlimited self-renewal by symmetric division and differentiation to all primitive embryonic germ layers. The capacity of ES cells to differentiate into almost all the cell types of human body highlights their potential to play a promising role in cell replacement therapy of human diseases.

Material & Methods: Unlimited somatic cells (hUSSCs), derived from embryonic umbilical blood, had been prepared from various donors. The cells were used to support the growth of C4 mES cell (mouse embryonic stem cell line) colonies in culture medium.

Finding: mESC colonies that cultured on the inactivated hUSSC, extensively proliferated (600 fold) during 30 days step wise culturing. Evaluating of the mESC, confirmed that the cells were effectively expanded on the mEFs. The immunocytochemical analyses for the presence of Oct4 transcriptional factor, telomerase enzyme, Rex1, BMP4, B2m, Brachyury, LIF, and LIFR showed the cells were positive result for the factors.

Discussion & Conclusion: These genes may be novel candidates to play critical roles in the regulation of ESC pluripotency and self-renewal.

Keywords: Embryonic stem cell, mesenchymal stem cell, blastocysts, feeder layer, pluripotency

1.Student Research committee, Proteomics Research Center, Faculty of paramedical sciences, Shahid Beheshti University of medical sciences, Tehran Iran
2. Proteomics Research Center, Faculty of paramedical sciences, Shahid Beheshti University of medical sciences, Tehran Iran
3.Dept of Tissue Engineering, Faculty of Advanced Medical Technologies, Tehran University of Medical Sciences ,Tehran, Iran
4.Hematology department, tarbiat modares university, Tehran, Iran
5.Dept of Anatomy, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
**(corresponding author)*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]