

بررسی توانای حفظ و نگهداری سلولهای بنیادی جنینی توسط سلولهای بنیادی

مزانثیمی خون بند ناف بعنوان لایه تغذیه کننده

سعید حیدری کشل^{۱،۲،۳*}، مصطفی رضایی طاویرانی^۲، مریم ابراهیمی^۲، مسعود سلیمانی^۴، رضا روز افزون^۳، سعید کاویانی^۴، غلامرضا بهروزی^۲، شهرام محمد پور^۵، اردشیر معیری^۵

- ۱) کمیته تحقیقات دانشجویی، مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران
- ۲) مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران
- ۳) گروه مهندسی بافت و سلول درمانی، دانشکده فح آوریهای نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۴) گروه هماتولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
- ۵) گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ پذیرش:

تاریخ دریافت:

چکیده

مقدمه: از سلولهای فیبروبلاستی جنینی موش (MEFs) برای حمایت از رشد سلولهای بنیادی جنینی موشی (mESCs) و یا سلولهای بنیادی انسانی (hESCs) استفاده می شود. تکثیر پیوسته و پی در پی سلولهای mESC بطور معمول توسط هم کشتی این سلولها با MEF بدست می آید. سلولهای MEF بعنوان یک لایه پشتیبان برای سلولهای mESC 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 از خون بند ناف انسان (USSC) از اهداکنندگان 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 بر روی hUSSC غیر فعال شده کشت یافته بودند در طی 30 روز کشت پی در پی بیش از 600 برابر تکثیر یافتند (در طی 10 پاساژ) در سلولهای mESC گسترش یافته بر روی hUSSC، مشاهده گردید که مورفولوژی این سلولها و مارکهای مولکولی ویژه سلولهای mESC تمایز نیافته، همگی همانند سلولهای mESC هستند که بر روی MEF گسترش یافته است. این سلولها از نظر فاکتورهای رونویسی همچون OCT4، nanog و همچنین آنزیم تلومراز و Rex1، BMP4، B2m، Brachyury، LIF، LIFR، مثبت بودند.

بحث و نتیجه گیری: سلولهای mESC کشت داده شده بر روی hUSSC دارای پتانسیل تمایزی جهت تمایز به هر 3 لایه زاینده سلولی (آندودرم، مزودرم، اکتودرم) می باشند و دارای کاربوتایپ دیپلوئید طبیعی نیز هستند. انجام مطالعات بیشتر بر روی 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، کاربوتایپ

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

مقدمه

سلولهای بنیادی جنینی، سلولهای بالقوه چند ظرفیتی (totipotential) بوده و اغلب 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 و نامیرایی آنها اشاره نمود. استفاده و کاربرد 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، کلونیهایی فشرده ای از سلولهای کوچک با سیتوپلاسم اندک و هستک واضح می باشند. این سلولها در طی تکثیرهای پی درپی، کاریوتایپ نورمال (46XX, 46XY) خود را حفظ میکنند. این سلولها در عین حال که قابلیت حفظ حالت تمایز نیافته را در شرایط *in vitro* دارا می باشند، می توانند به گستره وسیعی از سلولهای بالغ، تحت شرایط خاص متمایز گردند. این سلولها در طی 18 تا 12 ساعت تقسیم می شوند. مدت زمان تقسیم در این 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 و جداسازی سلولهای بنیادی جنینی مورد استفاده قرار گرفته 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 ES استفاده 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 (Differentiation inhibitory activity)، TPO، SCF، IL-6، اشاره نمود. از این رو سلولی که به عنوان یک لایه پشتیبان پیشنهاد داده می شود، می بایست، این فاکتورها را به صورت سطحی یا ترشحی داشته باشد. mESCs از نظر مارکرهایی همچون Oct-4، Nanog، SSEA-1، تلومراز، آکالین 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 بر سلولهای بنیادی جنینی، مثالی آشکار از عوامل کنترل کننده فعالیت سلولی می باشد. در حضور LIF معمولاً به مقدار اندک، سلولهای ES دچار تمایز می گردند و افزایش مقدار LIF نیز تاثیری بر جلوگیری از این حداقل تمایز ندارد (5-1). در این مطالعه از سلولهای 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 Kogler این سلولها از نظر تولیدات سایتوکائینی مورد بررسی قرار داد. سلولهای USSC فی نفسه pluripotent و (پرتوان) بوده و جزء جمعیت های سلولی بسیار نادر و کمیاب خون بند ناف محسوب می شوند. سلولهای USSC قدرت تکثیر و ظرفیت 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 طولی می باشد. این سلول دارای الگوی سایتوکائینی منحصر به فردی می باشد و درصد بالایی از تولیدات مربوط به

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

کشت سلولهای mESC بر روی 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°C خارج نموده و روی لایه پشتیبان USSC، انتقال یافت. مناسب ترین شرایط جهت پاساژ، زمانی است که قطر کلونی های سلولهای mESC µm 200-400 و تعداد این سلولها 45×10⁸ باشد. حدود 24 ساعت قبل از پاساژ سلولهای mESC، محیط کشت سلولهای USSC را با محیط کشت سلولهای

فاکتورهای خودسازی را دارا می باشد (2و1). 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 از خون بند ناف:

با توافق مادران، خون بندناف آنها از سیاهرگ بند ناف جمع آوری شد. تنها 40% از نمونه های خون بند ناف، سلول USSC را دارا بودند. میانگین سنی افراد اهداءکننده 28 سال بود. پس از جمع آوری نمونه ها، با استفاده از آمونیوم کلراید، RBS لیز شده و با فایکول عمل جداسازی ادامه یافت، سپس با PBS استریل (PH=7.14) دوبار شستشو داده بعد از سانتیفریوژ سلولهای بدست آمده در محیط کشت DMEM کم گلوکز غنی شده با دکزامتازون 100 نانومولار، 15% FBS و آنتی بیوتیکهای پنی سیلین و استرپتومایسین 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°C و 5% Co2 نیاز دارد.

آنالیز کاربوتایپ برای سلولهای mESC و USSC:

قبل و بعد از همکشتی سلولهای mESC با USSC، هر دوی آنها را مورد آنالیز قرار می دهیم. ترجیحاً اولین و آخرین پاساژها مورد آنالیز کاربوتایپ قرار گرفت. ابتدا سلولها را برای مدت 3-4 ساعت با 0.1µl/ml کولسمید درون آنکوباتور قرارداد سپس سلولها را تریپسینه کرده و 75% محلول kcl را به سلولها اضافه نموده و به مدت 20 دقیقه در دمای 37°C و 5% Co2 درون آنکوباتور قرارداد 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 کاربوتایپ قرار گرفتند.

آماده سازی لایه پشتیبان از جنس USSC:

بنیادی جنینی جایگزین نموده ، کشت سلولهای بنیادی جنینی موش نیازمند دمای 37°C و $5\% \text{CO}_2$ 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 ساخت cDNA با استفاده از کیت H minus first strand cDNA synthesis kit (Fermentas) Revert Aid واکنش رونویسی معکوس انجام شد.

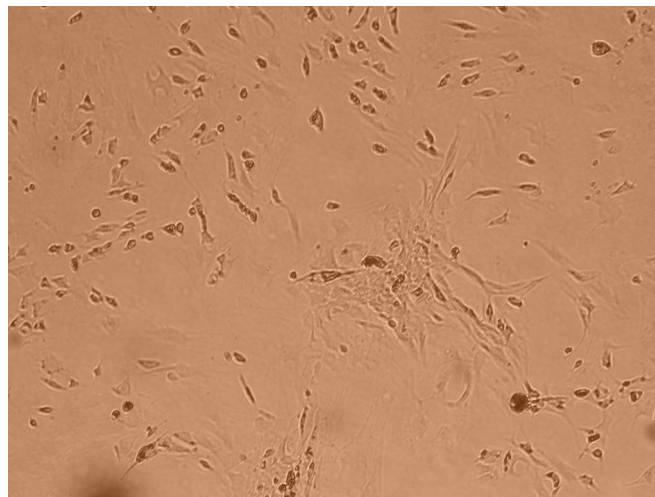
یافته های پژوهش:

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 مرتباً 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 میکوپلاسماها مشاهده نگردید. از آنجایی که سلولهای USSC می 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 $20\text{-}25\mu\text{m}$ می باشد (تصویر شماره 1).

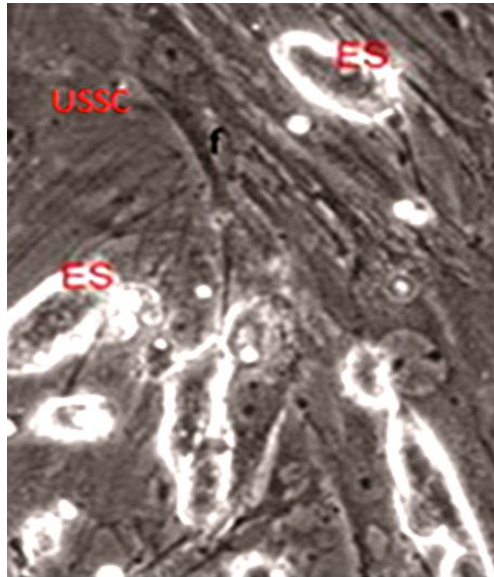


تصویر شماره 1: سلول های بنیادی مزانشیمی خون بند ناف (USSC) در پاساژ 3 که دارای مورفولوژی تیپیک دوکی شکل می باشند (میکروسکوپ اینورٹ- بزرگنمایی 20).

مورفولوژی سلولهای mESC:

سلولهای mESC بر روی لایه پشتیبان انسانی ، بخوبی توانایی تکثیر پیوسته خود را حفظ نمودند. C4mESCs بر روی hUSSC ، بیش از 30 پاساژ پی درپی را پشت سر گذاشته و توانستند در حالت تمایز نیافته باقی بمانند. سلولهای mESCs رروی لایه

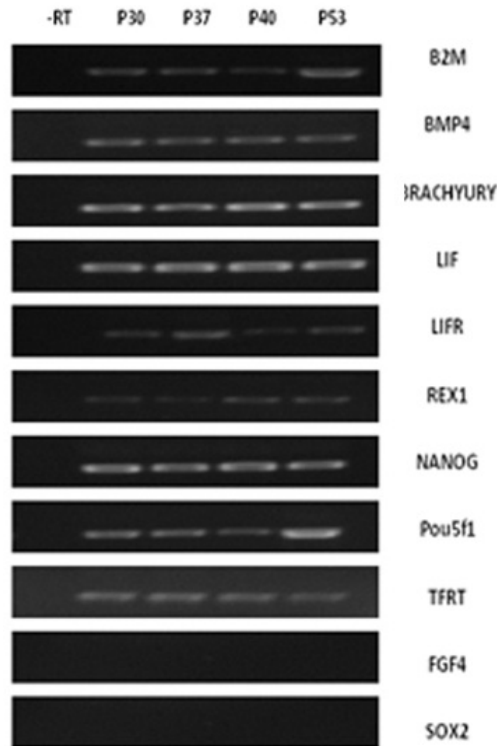
پشتیبان MEF دارای مورفولوژی تیپیک می باشند که شامل نسبت بالایی هسته به سیتوپلاسم ، هستک واضح ، سلولهای بهم فشرده و عدم وجود فضای بین سلولی. مورفولوژی سلولهای mESC بر روی USSC نیز کاملاً شبیه سلولهای MEF می باشد و دارای همان مورفولوژی تیپیک است (تصویر شماره 2).



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).

آنها حفظ شده است. این بیان ژنی مشخص می کند که سلولهای ES بر روی 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-4 انجام گرفت (شکل 4). مطابق شکل ... تمامی کلونی های ES که بر روی لایه پشتیبان hUSSC قرار داشتند از نظر این مارکرهای اختصاصی سلولهای بنیادی جنینی به شدت مثبت بودند (تصویر شماره 3).

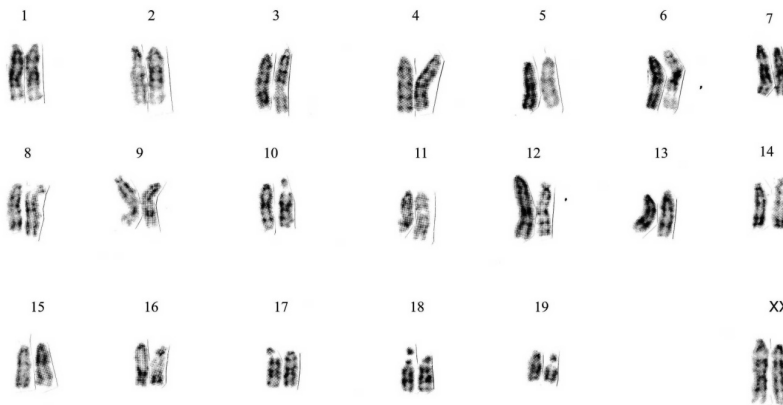
بیان مارکرهای اختصاصی سلولهای Pluripotent: در این مطالعه از β گلوبولین به عنوان کنترل منفی استفاده شد. سلولهای بنیادی جنینی موش کشت داده شده بر روی لایه پشتیبان انسانی از نظر ژنهای pluripotency مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمون RT-PCR برای ژنهای Oct-4، TERT، Nonog، LIFR ، LIF ، Brachyury ، Rex1 ، B2m ، به شدت مثبت بودند (شکل 1). آزمون RT-PCR برای سلولهای ES که - پاساژهای 30-37-40-53 را پشت سر گذاشته بودند ، انجام پذیرفت. بنابراین مشخص گردید که تمام کلونی های ES که بر روی لایه پشتیبان hUSSC قرار داشتند ، بیان ژنهای Pluripotency در



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.

مورد آنالیز کاربوتایپ قرار گرفتند و مشخص گردید که دارای کاربوتایپ کروموزومی نورمال 44xx هستند. شکل 4 کاربوتایپ کروموزومی سلولهای USSC را نمایش می دهد.

آنالیز کاربوتایپ برای سلولهای USSC: سلولهای USSC را قبل از شروع آزمایشات در پاساژ 2 مورد آنالیز کاربوتایپ قرار داده ، مشخص گردید که دارای کاربوتایپ کروموزومی نورمال 44xx می باشد. پس از گذشت 48 پاساژ دیگر ، این سلولها دوباره



تصویر 4: کاربوتایپ سلولهای بنیادی USSC را نشان میدهد که دارای کاربوتایپینگ نورمال بودند.

بحث و نتیجه گیری

گاه (foreskin)، سلولهای فیروبلاست پوست بالغ به عنوان لایه پشتیبان و نگهدارنده استفاده شده است (Richards et.al 2002, 2003) (11 و 12 و 13 و 14) اخیرا به منظور بهبود شرایط کشت های بدون لایه تغذیه کننده ای که در آن از ECM (ماتریکس خارج سلولی) و MEF-cm (محیط سلولهای MEF که حاوی ترشحات سیتوکائینی 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 16 و 15 و 18) بدین ترتیب باز هم از ترشحات سلولهای MEF جهت رشد و نگهداری سلولهای ES استفاده شده است و فاکتورهای دخیل در کنترل 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 در آن 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 بر روی لایه های حمایت کننده مختلف، تفاوت فاحشی با مورفولوژی این سلولها بر روی 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 کننده های متعددی جمع آوری شده اند توانستند در پاساژهای 2 تا 50 سلولهای mESC را در شرایط عدم تمایزی حفظ و تکثیر آنها را تضمین نمایند. تکثیر سلولهای mES بروی hUSSC از 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. Rechar 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

سلولهای USSC، سلولهای بنیادی چسبنده، CD43⁻ هستند که از خون بند ناف (CB) جداسازی شده اند. این سلولها دارای تکثیر نامحدود بوده و جزء سلولهای 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 هستند در شرایط ex vivo به استخوان، غضروف، سلولهای خونی، عصب، کبد، بافت قلبی متمایز گردند. (6) این سلول فاکتورهای متعددی را بیان می کند که شامل مولکولهای چسبنده، فاکتورهای رشد و سیتوکائین های متعدد می باشد. (refl a new SCF) VEGF و GM-CSF و M-CSF و TGF-1 β و IL-6 و G-CSF و LIF (Flt3 لیاند و TPO و HGF و SDF-1 α و IL-5 و IL-12 و IL-8 و IL-1 β). در این مطالعه مشخص گردید که براین ترشحات سیتوکائینی سلول USSC در قالب یک لایه پشتیبان (feeder layer) منجر به حفظ سلولهای mESC در 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 کاربوتایپ طبیعی می باشند. سلولهای mESC و hESC معمولا بر روی 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 پاتوژنهای حیوانی همراه می باشد. این نقیصه زمانی که از سلولهای ES برای کارهای 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 فیروبلاست پوست جنین، سلولهای اپیتلیال لوله فالوپ، سلولهای بالغ مغز استخوان، سلولهای فیروبلاست ناحیه ختنه

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 را بسیار بهتر از پاساژهای پائین انجام می دهند که تداعی کننده این مطلب است که شاید الگوی سایتوکائینی 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 حاضر بخشی از پایانامه دکتری سعید حیدری کشل می باشد.

References

- 1- Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA. Myeloid leukemia inhibitory factor maintains the development potential of embryonic stem cells. *Nature* 1988; 336:684-7.
- 2- Bonyo A, Fonyc Y, Nys C, Ratnam S. Isolation and culture of inner cell mass cells

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 سلولهای ES 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 ES جهت حمایت از سلولهای بنیادی جنینی موش، می توانند چندین میلیون برابر تکثیر یابند. از جمله مزایای استفاده از سلولهای USSC در گسترش سلولهای mES و یا حتی hES hESC آن است که سلولهای USSC غیر خودیی در محیط کشت و یا حتی حیوانات بزرگ هیچگونه واکنش ایمنی مبنی بر برانگیختن سلولهای لمفوسیت 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). USSC قادر است در *in vitro* پاساژها ی متعددی را برای مدت زمان طولانی پشت سر گذاشته و خللی در قدرت تکثیرش بوجود نیاید. USSC می تواند بیش از 50 پاساژ را پشت سر گذارد بدون آنکه تمایز خود به خودی و ناخواسته ای پیدا کنند. این درحالی است که سلولهای لایه تغذیه کننده MEF تنها تعداد محدودی پاساژ (حدودا 7 پاساژ) قادر به حمایت از ES می باشد پس از آن وارد فاز پیری شده و

- 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.

- 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, Degistri O, Fischer J, Kogler G, et al. In-vitro-und in-vivo-Knochenregenerierung durch mesenchymale Stammzellen 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- Kogler G, Radke TF, Aurelie L, Sensken S, Fischer J, Rüdiger 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 sheep 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 clonal growth and differentiation of feeder layer dependent mouse embryonal carcinoma cell β -mercaptethanol. *Differentiation* 1978; 11:149-55.



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 M², solimani M⁴, Roozafzoon R³, kaviani S⁴, Behrozi Gh.R², Mohammadpour Sh⁵, Moayeri A⁵

(Received:

Accepted:)

Abstract

Introduction: Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) have been applied to support the growth mouse embryonic stem cells (MESC) 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)