

## بهبود تولید رده‌های سلولی پرتوان هاپلوئید از جنین‌های پارتنوژنتیک موش به واسطه مهار همزمان مسیرهای پیام‌رسانی MEK و TGFβ

سپیده ملامحمدی <sup>۱</sup>M.Sc، عبدالحسین شیروی <sup>۱</sup>P.h.d، سیده نفیسه حسینی <sup>۲</sup>P.h.d، حسین بهاروند <sup>۳</sup>\*P.h.d

- ۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی تکوینی، دامغان، ایران
- ۲- پژوهشگاه رویان، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی تهران، ایران
- ۳- دانشگاه علم و فرهنگ، دانشکده علوم پایه و فناوریهای نوین زیستی، گروه زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: baharvand@royaninstitute.org

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۱۸

### چکیده

**هدف:** در این طرح تولید سلول‌های بنیادی جنینی هاپلوئید پارتنوژنتیک در حضور مهارکننده‌های مسیرهای پیام‌رسانی ERK و TGF-β بررسی شده است.

**مواد و روش‌ها:** ابتدا بلاستوسیت‌های پارتنوژنتیک حاصل از فعال‌سازی شیمیایی اووسیت‌ها، در محیط R2i (حاوی PD0325901 و SB431542 که به ترتیب مسیرهای پیام‌رسانی ERK و TGF-β را مهار می‌کنند) کشت شدند. سپس رده‌های سلول‌های بنیادی جنینی پارتنوژنتیک در این محیط تکثیر و نگهداری شدند. با استفاده از رنگ‌آمیزی ایمنوفلورسانس و qRT-PCR، بیان مارکرهای پرتوانی و با روش تمایز خودبه‌خودی و ایجاد تراتوما پتانسیل تمایزی این سلول‌ها ارزیابی شدند. میزان هاپلوئیدی نیز با استفاده از روش فلوسایتومتری تعیین گردید.

**نتایج:** در شرایط R2i، حدود ۵۰ درصد از جنین‌های پارتنوژنتیک، رده سلولی تولید کردند و ۱۰ تا ۱۳ درصد سلول‌های هر رده به‌صورت هاپلوئیدی بودند. سلول‌های بنیادی پارتنوژنتیک تولید شده در محیط R2i ویژگی‌های سلول‌های بنیادی پرتوان مانند مورفولوژی، پاساژپذیری، بیان ژن‌های ویژه پرتوانی در سطح mRNA و پروتئین را نشان دادند. همچنین این سلول‌ها قادر به تمایز خودبه‌خودی به مشتقات سه لایه زاینده جنینی و ایجاد تراتوما بودند.

**نتیجه‌گیری:** مهار مسیرهای پیام‌رسانی ERK و TGF-β می‌تواند شرایط مناسبی را برای تولید سلول‌های بنیادی هاپلوئید از جنین‌های پارتنوژنتیک فراهم کند.

**واژگان کلیدی:** جنین پارتنوژنتیک موش، سلول‌های بنیادی جنینی هاپلوئید، مسیر پیام‌رسانی ERK و TGF-β

## مقدمه

جنینی انسانی مطرح شود (۱۰).

کوچک مولکول‌ها به‌طور وسیعی برای تولید و حفظ سلول‌های بنیادی جنینی موشی به‌کار گرفته شده‌اند (۱۵). هم‌اکنون به‌طور واضح مشخص شده است که حفظ پرتوانی سلول‌های بنیادی جنینی موشی به‌طور قطعی وابسته به LIF نیست و بستن مسیرهای تمایزی به‌وسیله کوچک مولکول‌های مهارکننده اختصاصی ERK (Extracellular signal-regulated kinases) و GSK3 سبب حفظ پرتوانی و بقا سلول‌های بنیادی جنینی می‌شود. در مطالعه اخیر، حسنی و همکاران (۱۶ و ۱۷) نشان دادند که مهار مسیرهای TGF- $\beta$  (Transforming growth factor beta) و ERK به‌وسیله کوچک مولکول‌های اختصاصی می‌تواند سبب تولید بسیار کارآمد سلول‌های بنیادی جنینی از تمام سویه‌های موشی شود. در این مطالعه تجربی، تاثیر مهار این دو مسیر پیام‌رسانی در تولید سلول‌های بنیادی جنینی هاپلوئید مورد ارزیابی قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه بر اساس مصوبه کمیته اخلاق پزشکی و پژوهشگاه رویان و رعایت مقررات استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شده است.

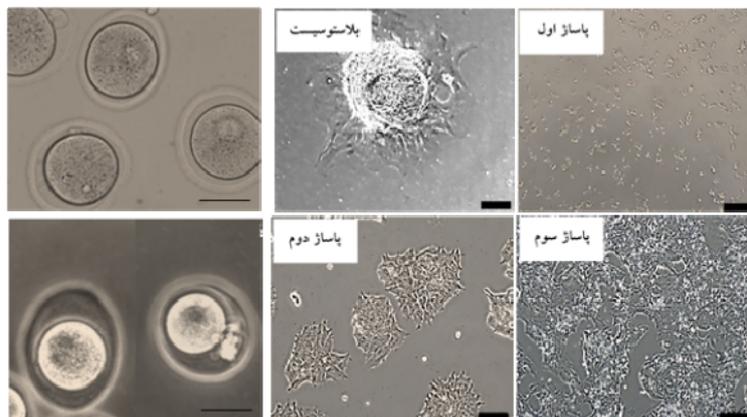
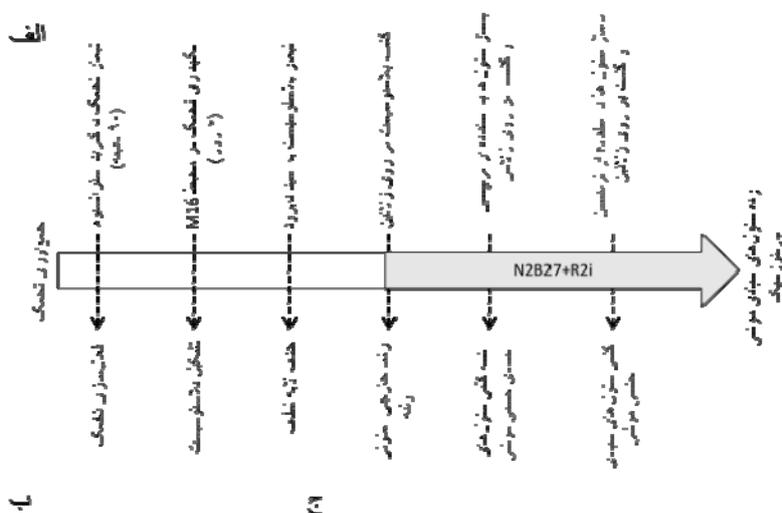
**آماده‌سازی جنین‌های پارتنوژنتیک موشی:** در مطالعه تجربی حاضر، از موش‌های ماده ۸ تا ۱۱ هفته‌ای هیبرید F1 (BALB/c $\times$ C57BL/6) استفاده شد. موش‌ها از مرکز انستیتو پاستور تهیه شدند و قبل از استفاده در آزمایشگاه، حداقل یک هفته در حیوان‌خانه در شرایط دمایی ۱۹ تا ۲۳ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴۰ تا ۵۰ درصد و ۱۲ ساعت روشنایی (۶ صبح تا ۶ عصر) نگهداری شدند. به‌منظور القای تخمک‌گذاری در موش‌ها، مقدار ۷/۵ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر هورمون PMSG (Pregnant Mares Serum (Invert) Gonadotropin) و ۴۷ تا ۴۸ ساعت بعد ۷/۵ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر هورمون hCG (Human Chorionic Gonadotropin) (Invert) Gonadotropin)، به‌روش درون صفاقی تزریق شد. تقریباً ۱۶ ساعت پس از تزریق hCG، موش‌های ماده، به روش قطع نخاع گردنی، کشته شدند، و پوست شکم و صفاق باز شده و لوله‌های رحمی پس از جداسازی درون محیط کشت M2 حاوی

سلول‌های بنیادی جنینی از توده سلولی داخلی جنینی (در مرحله بلاستوسیست) مشتق می‌شوند (۱ و ۲). این سلول‌ها توانایی تکثیر نامحدود و تمایز به مشتقات هر سه لایه زایای جنینی را دارا می‌باشند. این ویژگی‌های بنیادی باعث شده است که این سلول‌ها به‌عنوان مدل مناسبی برای تحقیقات زیست‌شناسی تکوینی، ژنتیک تکوینی، سلول درمانی، مهندسی بافت و تست دارو مطرح گردند (۳-۵). تاکنون سلول‌های بنیادی جنینی تحت شرایط خاص از گونه‌های مختلف پستاندار و غیر پستاندار تولید شده‌اند. از آنجایی که سلول‌های پستانداران، به‌استثنای تخمک و اسپرم، دیپلوئید هستند و از هر ژن دو کپی در ژنوم خود دارند، سلول‌های بنیادی جنینی مشتق شده از این گونه‌ها نیز دیپلوئید هستند. وجود دو کپی از هر ژن در ژنوم، کاربرد این سلول‌ها را به‌ویژه در مطالعات ژنتیک تکوینی و غربالگری ژنتیکی (مستقیم و معکوس) دچار چالش می‌کند، به‌طوری که تنها با ایجاد جهش در هر دو کپی یک ژن می‌توان عملکرد آن ژن را آشکار ساخت (۶). علی‌رغم پیشرفت‌های فوق‌العاده در فناوری هدف‌گیری ژن در سلول‌های بنیادی، فعالیت‌های ائتلاف بین‌المللی برای تولید موش knock out برای تمامی ژن‌های موشی و فناوری siRNA، غربالگری‌های ژنتیکی همچنان بسیار دشوار است (۷ و ۸).

اخیراً مطالعات متفاوتی تولید سلول‌های بنیادی هاپلوئید ماهی، موش، میمون و رت را از جنین‌های پارتنوژنتیک گزارش کرده‌اند (۹-۱۲). جنین‌های پارتنوژنتیک به‌واسطه تحریک شیمیایی تخمک لقاح نیافته حاصل شده و بعد از رسیدن به مرحله بلاستوسیست برای تولید سلول‌های بنیادی هاپلوئید مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۱۳ و ۱۴). سلول‌های بنیادی هاپلوئید از نظر پتانسیل تمایزی پرتوان بوده و توانایی ایجاد اجسام شبه جنینی، ایجاد تراتوما و تمایز به هر سه رده جنینی را دارا هستند. سلول‌های بنیادی هاپلوئید با دارا بودن یک کپی از هر ژن بسیاری از مطالعات ژنتیکی را قابل انجام و آسان می‌کنند. از طرف دیگر به دلیل این‌که منشا این سلول‌ها گامت‌ها هستند مشکلات اخلاقی مرتبط با از بین بردن جنین مرتفع می‌گردد. با وجود یک سری کروموزوم همولوگ مادری، تنوع کمتری از آنتی‌ژن‌های سطح سلولی که در ارتباط با رد پیوند در فرد گیرنده این سلول‌ها هستند ایجاد می‌گردد و می‌تواند به‌عنوان گزینه مناسبی برای تولید و کاربردهای درمانی سلول‌های بنیادی

۰/۵ میلی‌مولار EGTA(Ethylene Glycol Tetra Acetic acid) (Sigma) بود انتقال یافتند. قطره‌های حاوی تخمک‌ها با روغن معدنی پوشانده شدند و به‌درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO<sub>2</sub> (۵ درصد) منتقل شدند. بعد از گذشت ۹۰ دقیقه، تخمک‌ها در قطره‌های محیط M16 چندین بار شستشو داده شدند و در نهایت به قطره‌های جدید M16 منتقل شده و به‌درون انکوباتور انتقال یافتند. بعد از گذشت ۴ روز، بلاستوسیست‌های حاصله برای ادامه کار در یک قطره جمع‌آوری شدند (شکل ۱، الف).

۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر BSA(Bovin Serum Albumin) (Sigma) قرار داده شدند. سپس ناحیه آمپولا با سر سوزن سرنگ انسولین به آرامی برش داده شد و تخمک‌ها به‌همراه سلول‌های گرانولوزا از لوله رحمی خارج شدند و به‌مدت ۱ دقیقه در داخل قطره شستشو حاوی ۵۰ میکرولیتر محیط کشت M2 و ۷۰ میکرولیتر آنزیم هیالورونیداز (Sigma) به غلظت ۲۵۰ میکروگرم نکه داشته شدند. تخمک‌های جدا شده از سلول‌های گرانولوزا در داخل قطره‌های محیط M2 شستشو داده شدند و حداکثر ۱۰ تخمک به هر قطره ۸۰ میکرو لیتری از محیط کشت M16 (Sigma) که حاوی ۵ میلی‌مولار استرانسیم (Sigma) و



شکل ۱: الف) شکل شماتیک مراحل تولید سلول‌های بنیادی جنینی موشی از بلاستوسیست‌های پارتنوژنتیک. ب) مورفولوژی تخمک‌های طبیعی (بالا) و تخمک‌های غیر طبیعی (پایین) قبل از فعال‌سازی شیمیایی، علامت اندازه معادل ۵۰ میکرومتر است. ج) مورفولوژی سلول‌های بنیادی موشی روی بستر ژلاتین از مرحله کشت بلاستوسیست تا سومین پاساژ، علامت اندازه معادل ۲۰۰ میکرومتر است.

محیط شستشو قرار داده شد و در زیر استریومیکروسکوپ، جنین‌ها به کمک پیپت هدایت‌شونده توسط دهان، به اولین قطره اسید تایرود برده شدند و خیلی سریع از دو قطره بعدی اسید تایرود عبور داده شدند. در اسیدتایرود، ناحیه شفاف کاملاً حل می‌شود و ممکن است در قطره آخر به کف ظرف بچسبد که باید

**تولید و نگهداری سلول‌های بنیادی جنینی موشی:** برای تولید سلول‌های بنیادی جنینی موشی، از بلاستوسیست‌های پارتنوژنتیک استفاده شد. ابتدا لایه زوناپلوسیدای بلاستوسیست‌ها به‌وسیله محلول اسید تایرود حذف شدند. به این‌صورت که درون ظرف، سه قطره اسید تایرود و سه قطره

دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. بعد از یک‌بار شستشو، آنتی‌بادی‌های اولیه Oct4 (Santa Cruz Biotechnology, sc-5279) Nanog (BD Pharmingen, 560259), SSEA1 (Sigma-Aldrich, Tuj1, R&D, MAB2155), Gata4 (Sigma-Aldrich, M-1406), Map2 (T8660 Santa Cruz Biotechnology, sc-1237) و  $\alpha$ FP (Santa Cruz Biotechnology, sc-8108 Cruz Biotechnology, sc-8108) با رقت ۱:۱۰۰ به سلول‌ها اضافه شد و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون صورت گرفت. سپس ۳ بار شستشو (هر بار به مدت ۱۵ دقیقه) در دمای اتاق انجام شد و آنتی‌بادی ثانویه Mouse IgG (Invitrogen, A-11001) IgG Goat (Invitrogen, A-21042) Mouse IgM (A-11004 Invitrogen, Rabbit-IgG (Invitrogen, A-21223) IgG (A-11008) با رقت ۱:۵۰۰ به سلول‌ها اضافه شد و انکوباسیون به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در ادامه سلول‌ها سه بار (هر بار به مدت ۱۵ دقیقه) در دمای اتاق شستشو داده شدند و رنگ DAPI به منظور رنگ‌آمیزی هسته اضافه شد. مشاهده و تصویربرداری از نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده با استفاده از میکروسکوپ فلورسنتس (Olympus) صورت گرفت.

**تمایز در شرایط *In vivo* و *In vitro*** برای اثبات پرتوانی سلول‌های بنیادی جنینی حاصل از جنین‌های پارتنوژنتیک، تمایز خودبه‌خودی به واسطه تشکیل اجسام شبه‌جنینی انجام شد. در این روش سلول‌های بنیادی جنینی منفرد شده به صورت سوسپانسیون سلولی در محیط کشت حاوی سرم و فاقد LIF، درون ظروف کشت نچسب (ظرف کشت باکتریایی) به مدت پنج تا هفت روز کشت شدند. سپس توده‌های سلول‌های بنیادی جنینی که به آن‌ها اجسام شبه‌جنینی گفته می‌شود، به ظروف ژلاتینه شده انتقال یافتند و به مدت ۱۲ روز در محیط فوق کشت و نگهداری شدند. در کل فرآیند تمایز، تعویض محیط کشت به صورت یک روز در میان انجام شد.

توانایی تمایزی سلول‌های بنیادی جنینی به صورت *in vivo* با تشکیل تراتوما بررسی شد. برای تشکیل تراتوما حدود  $10^6 \times 5 - 3$  سلول منفرد شده با ماتریزل مخلوط شده و به صورت زیرپوستی به موش‌های هم‌نژاد تزریق شد. پس از گذشت ۳۰ تا ۴۰ روز تومورهای حاصله استخراج شدند و برای بررسی بافتی درون محلول بوئن تثبیت شدند.

به آرامی با پیپت کردن آن را جدا کرد. سپس جنین‌ها به قطره‌های شستشو منتقل و بعد از شستشو، درون ظرف‌های کشت ۹۶ خانه پوشیده شده با ژلاتین ۰/۱ درصد انتقال داده شدند. در این روش، محیط کشت عاری از سرم، تحت عنوان محیط N2B27، که شامل ۴۵ درصد DMEM/F12، ۴۵ درصد Neurobasal medium، یک درصد  $N_2$ ، دو درصد B27، یک درصد Penicillin streptomycin، یک درصد L-glutamin، یک درصد NonEssential Amino Acids، ۲ درصد BSA با غلظت ۱۲۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر، ۰/۱ میلی‌مولار بتامرکاپتوتانول، ۱۰۰۰ واحد LIF به‌ازای هر میلی‌لیتر، ۱ میکرومولار کوچک مولکول PD0325901 و ۱۰ میکرومولار کوچک مولکول SB431542 بود (این دو کوچک مولکول تحت عنوان Royan 2 inhibitors یا R2i نام برده می‌شود، مورد استفاده قرار گرفتند. چهارتا شش روز پس از کشت بلاستوسیست‌ها، سلول‌های رشد یافته توسط Trypsin/EDTA منفرد شدند و به ظروف جدید پوشیده شده با ژلاتین و محیط R2i انتقال یافتند که این مرحله به‌عنوان پاساژ اول در نظر گرفته شد. پس از گذشت حدود ۱ هفته، کلونی‌های قابل پاساژ به دست آمدند و از آن پس هر دو روز یک‌بار پاساژ داده شدند.

**رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز و ایمونوفلورسانس:** رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز با استفاده از کیت مخصوص (SIGMA) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد و عکس‌برداری با دوربین دیجیتال متصل به میکروسکوپ فاز کنتراست با زمینه روشن (Olympus) صورت گرفت. برای انجام رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس، ابتدا محیط کشت روی سلول‌ها حذف شد و سلول‌ها یک‌بار با محلول شستشو (۰/۵ درصد PBS/Tween) شستشو داده شدند و با پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت ۲۰ دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد فیکس شدند. سپس سلول‌ها دو بار (هرکدام به مدت ۵ دقیقه) با محلول شستشو در دمای اتاق شستشو داده شدند و برای نفوذپذیر کردن سلول‌ها برای رنگ‌آمیزی پروتئین‌های هسته‌ای و سیتوپلاسمی، انکوباسیون سلول‌ها با محلول ۰/۲ درصد TritonX-100 به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انجام شد. بعد از دو بار شستشوی سلول‌ها (هر بار به مدت ۵ دقیقه) در دمای اتاق، مسدود کردن جایگاه‌های غیراختصاصی اتصال آنتی‌بادی (بلوکه کردن) به وسیله تیمار سلول‌ها با سرم بز ۱۰ درصد به مدت ۶۰ دقیقه، در

سوسپانسیون سلولی حاوی  $10^6$  سلول در یک میلی‌لیتر محیط کشت تهیه شد و به آن رنگ Dye cycle با غلظت ۱ میکرولیتر در میلی‌لیتر محیط کشت اضافه شد. بعد از نگهداری به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، میزان DNA هاپلوئیدی توسط دستگاه فلوسایتومتری (BD FACSAriaII) مورد بررسی قرار گرفت.

### نتایج

#### بهبود فعال‌سازی تخمک با استفاده از استرانسیوم و EGTA

به‌دنبال استخراج تخمک‌ها از رحم موش و حذف سلول‌های گرانولوزا، تخمک‌ها از نظر مورفولوژی مورد ارزیابی قرار گرفتند. تخمک‌هایی که در آن‌ها لایه شفاف یکنواخت نبوده و فاصله آن با غشای تخمک زیاد بود به‌عنوان تخمک غیرطبیعی در نظر گرفته شد و از ادامه مطالعه حذف شدند (شکل ۱، ب). به‌منظور بهینه کردن شرایط برای فعال‌سازی تخمک‌ها، از مواد شیمیایی مختلف شامل اتانول، استرانسیوم و EGTA به‌همراه محیط‌های M16 و R2i استفاده شد. مدت‌زمان تیمار با اتانول (به‌همراه محیط M16) ۵ دقیقه بوده و برای استرانسیوم و استرانسیوم/EGTA در هر دو محیط M16 و R2i، تیمار به مدت ۹۰ دقیقه انجام شد. از آنجایی که در این مطالعه دستیابی به بلاستوسیت برای تولید سلول‌های بنیادی ضروری بود، میزان بلاستوسیت‌های حاصل از هر کدام از فعال‌کننده‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱). نتایج نشان داد که محیط کشت M16 حاوی ۵ میلی‌مولار استرانسیوم و ۲ میلی‌مولار EGTA، بهترین شرایط برای فعال‌سازی تخمک را فراهم می‌کند، به‌طوری‌که ۱۰ درصد از تخمک‌ها توانایی رشد و ایجاد بلاستوسیت را داشتند. بلاستوسیت‌های ایجاد شده تحت این شرایط برای تولید سلول‌های بنیادی جنینی موشی مورد استفاده قرار گرفتند.

**تولید سلول‌های بنیادی در حضور R2i:** به‌منظور حذف لایه شفاف بلاستوسیت‌های حاصل از فعال‌سازی به‌واسطه استرانسیوم و EGTA، تیمار با اسید تایرود صورت گرفت. بلاستوسیت‌های فاقد لایه شفاف، بر روی ژلاتین و در محیط کشت فاقد سرم تحت عنوان N2B27 که حاوی R2i بود کشت شدند. ۴ تا ۶ روز پس از کشت، سلول‌های رشد یافته، با استفاده از تریپسین، پاساژ داده شدند و پس از گذشت یک هفته کلونی‌های شبیه سلول‌های بنیادی جنینی موشی ظاهر شدند و

#### استخراج RNA، نسخه‌برداری معکوس و واکنش زنجیره‌ای

**پلیمرز:** کل RNA از سلول‌های بنیادی جنینی و تمایز یافته با استفاده از کیت (QIAGEN) RNeasy Mini kit طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت، استخراج و غلظت هر نمونه با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر تعیین شد. کیفیت RNA با بارگذاری RNA روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد. پس از اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده، نسخه‌برداری معکوس (سنتز cDNA) با استفاده از ۲ میکروگرم از کل RNA به همراه هگزامرهای تصادفی و با استفاده از کیت و طبق دستورالعمل کیت انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) برای ژن‌های Oct4 (5' GCG TTC TCT TTG GAA AGG TG 3') و Nanog (5' CTG ATT CTT CTA CCA GTC CCA 3') و GATA4 (5' GCC CAA GAA CCT GAA 3')، TAA ATC 3' و Nestin (5' CAC ACC TCA AGA 3')، TGT CCC 3' و ALBUMIN (5' GAA AGC CAA GAG AAG 3')، TTC TAT GCC C3' و B-TUBULIN (5' CTC CTT CAC 3') و GCCCAAGAACCTGAATAAATC3' توسط دستگاه ترموسایکلر (مدل اپندورف) و طبق برنامه: ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه و ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه و به تعداد ۳۵ سیکل انجام شد. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۷ درصد بارگذاری و بررسی شد.

#### فلوسایتومتری: محیط کشت سلول‌های بنیادی جنینی خارج

شد و سلول‌ها یک‌بار با PBS (فاقد کلسیم و منیزیم) شستشو داده شدند و به‌مدت ۳ دقیقه با آنزیم Trypsin/EDTA (Gibco) تیمار شدند. فعالیت آنزیم با اضافه کردن محیط کشت سلول‌های بنیادی جنینی موشی حاوی سرم (ES-FBS) خنثی شد و با استفاده از پیپت کردن، سلول‌ها به‌صورت منفرد درآمدند. سپس سوسپانسیون سلولی به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت 1500 rpm سانتریفوژ شد و محیط کشت جدید به رسوب سلولی اضافه گردید. به‌دنبال شمارش سلولی، یک

از آن پس، هر دو روز یک بار پاساژ داده شدند. (شکل ۱، ج). ارزیابی میزان تولید رده‌های سلول‌های بنیادی جنینی در حضور R2i نشان داد که در تکرارهای مختلف، بیش از ۵۰ درصد بلاستوسیت‌های پارتنوژنتیک منجر به تولید رده‌های سلول‌های

بنیادی شدند (جدول ۲). این نتایج نشان می‌دهد که مهار هم‌زمان مسیر پیام‌رسانی ERK و MEK شرایط مناسبی را برای تولید سلول‌های بنیادی از جنین‌های پارتنوژنتیک فراهم می‌کند.

جدول ۱: بازده ایجاد بلاستوسیت‌های پارتنوژنتیک در حضور فعال‌کننده‌های مختلف

فعال‌کننده	تعداد تخمک	تعداد دژنره (%)	تعداد دوسلولی (%)	تعداد هشت سلولی/مورولا (%)	تعداد بلاستوسیت (روز چهارم)
اتانل ۵ درصد (M16)	۲۰	۳۰ (۱۰۰)	۰	۰	۰
استرانسیم 5mM (M16)	۲۰	۲ (۱۰)	۱۸ (۹۰)	۸ (۴۰)	۱ (۵)
استرانسیم 5mM (R2i)	۲۰	۵ (۲۵)	۱۵ (۷۵)	۰	۰
استرانسیم EGTA2mM+ 5mM (M16)	۲۰	۲ (۱۰)	۱۸ (۹۰)	۱۲ (۶۰)	۲ (۱۰)

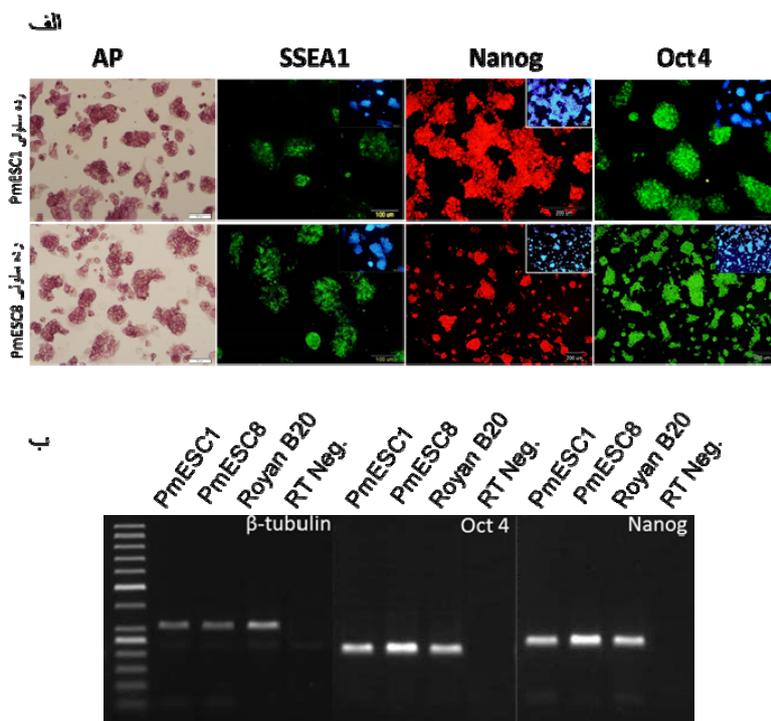
جدول ۲: بازده ایجاد بلاستوسیت‌های پارتنوژنتیک و رده‌های سلولی پارتنوژنتیک

گروه	تعداد تخمک	تعداد بلاستوسیت	تعداد رده سلولی	درصد بلاستوسیت/تخمک	درصد رده سلولی/بلاستوسیت
۱	۷۰	۱۲	۶	۱۷	۵۰
۲	۷۰	۱۰	۵	۱۴	۵۰
۳	۸۰	۱۱	۶	۱۳	۵۴
۴	۹۰	۱۲	۷	۱۳	۵۴
۵	۵۰	۸	۳	۱۶	۳۷
۶	۷۰	۱۱	۷	۱۵	۶۳

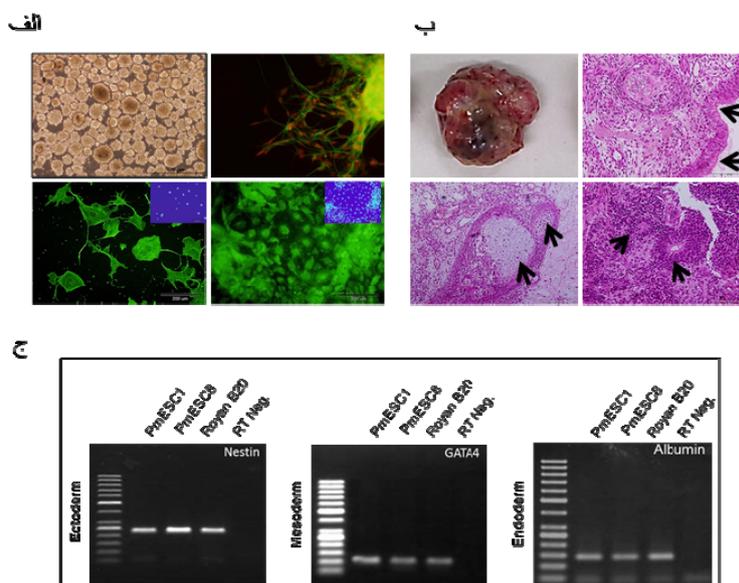
( $\alpha$ FP+، مزودرمی (قلب،  $\alpha$ MHC+) و اکتودرمی (عصب، Map2+) را دارا می‌باشند (شکل ۳، الف). همچنین بیان فاکتورهای نسخه‌برداری ویژه سلول‌های تمایز یافته، شامل Nestin (اکتودرم)، Gata4 (مزودرم) و Albumin (اندودرم) در سلول‌های تمایز یافته هر دو رده PmESC1 و PmESC8 به‌وسیله RT-PCR مورد تایید قرار گرفت (شکل ۳، ج). توانایی تمایزی سلول‌های این دو رده در شرایط *In vivo* با بررسی تشکیل ترائوما مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی بافتی، وجود مشتقات هر سه لایه زاینده جنینی را در ترائوما اثبات کرد (شکل ۳، ب). بنابراین سلول‌های بنیادی جنینی موشی که از بلاستوسیت‌های پارتنوژنتیک تولید شده بودند از نظر بیان مارکر و پتانسیل تمایزی، پرتوان بودند.

### ویژگی سلول‌های بنیادی جنینی موشی تولید شده در حضور R2i

تمام رده‌های سلول‌های بنیادی جنینی موشی تولید شده، تا ۱۰ پاساژ بر روی ژلاتین و در شرایط بدون لایه تغذیه‌کننده در محیط N2B27 حاوی PD+SB تکثیر شدند. تمام رده‌های سلول‌های بنیادی ویژگی پاساژ پذیری با استفاده از تریپسین، نسبت بالای هسته نسبت به سیتوپلاسم و رشد کلونال (از یک سلول منفرد) را نشان می‌دادند. از بین رده سلول‌های بنیادی جنینی، دو رده PmESC1 و PmESC8 برای ارزیابی‌های بیشتر انتخاب شدند. سلول‌های هر دو رده، فعالیت بالای آنزیم آلکالین فسفاتاز را نشان دادند و مارکر سطحی SSEA1 و فاکتورهای نسخه‌برداری Oct4 و Nanog را در سطح پروتئین (شکل ۲، الف) و mRNA بیان می‌کردند (شکل ۲، ب). پتانسیل تمایزی سلول‌های رده PmESC1 در شرایط *In vitro*، با تمایز خودبه‌خودی به‌واسطه تشکیل اجسام شبه جنینی نشان داده شد. (شکل ۳، الف). رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس نشان داد که سلول‌های PmESC1 تکثیر شده در محیط N2B27+R2i توانایی ایجاد مشتقات اندودرمی (کبد،

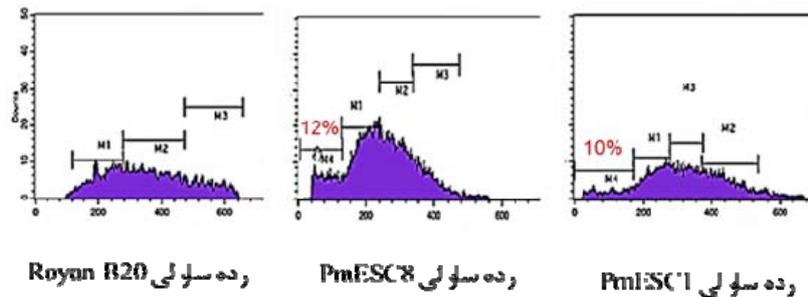


شکل ۲: بیان مارکرهای پرتوانی در سلول‌های بنیادی جنینی مشتق شده از بلاستوسیت‌های پارتنوژنتیک. الف) بیان آنزیم آلکالین فسفاتاز، پروتئین سطحی SSEA1 و فاکتورهای نسخه‌برداری Oct4 و Nanog توسط سلول‌های بنیادی جنینی رده PmESC1 و PmESC8. رنگ‌آمیزی هسته با DAPI انجام شده است. علامت اندازه معادل ۲۰۰ میکرومتر است. ب) نتایج RT-PCR فاکتورهای نسخه‌برداری پرتوانی Oct4 و Nanog توسط سلول‌های بنیادی جنینی رده PmESC1 و PmESC8. سلول‌های بنیادی رده Royan B20 به‌عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفتند.



شکل ۳: پتانسیل پرتوانی سلول‌های بنیادی جنینی موشی مشتق شده از بلاستوسیت‌های پارتنوژنتیک در شرایط *In vitro* و *In vivo*. الف) تشکیل اجسام شبه‌جنینی از سلول‌های بنیادی جنینی رده PmESC1 و رنگ‌آمیزی ایمنوئوفلورسانس بعد از تمایز خودبه‌خودی این سلول‌ها برای مارکرهای Map2 (عصب، اکتودرم)، αMHC (قلب، مزودرم) و αAFP (کبد، اندودرم). علامت اندازه معادل ۲۰۰ میکرومتر است. ب) تشکیل ترانژنوما به‌واسطه تزریق زیر پوستی سلول‌های بنیادی جنینی رده PmESC1 و رنگ‌آمیزی مقاطع بافتی مشتقات سه لایه زاینده جنینی در این ترانژنوما. (I): روزت عصبی (اکتودرمی)، (II): کندروسیت (مزودرم) و (III): اپی‌تلیوم روده (اندودرم). ج) نتایج RT-PCR بیان ژن‌های تمایزی Nestin (اکتودرم)، GATA4 (مزودرم) و Albumin (اندودرم) توسط سلول‌های حاصل شده به‌واسطه تمایز خودبه‌خودی سلول‌های بنیادی رده PmESC1 و PmESC8. سلول‌های حاصل از تمایز خودبه‌خودی سلول‌های بنیادی رده Royan B20 به‌عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفتند.

B20 که از بلاستوسیت‌های طبیعی (لقاح یافته) تولید شده بودند به‌عنوان کنترل (سلول‌های دیپلوئید واقعی) استفاده شدند. نتایج نشان داد دو رده سلولی PmESC1 و PmESC8، نسبت به رده سلولی Royan B20، به‌ترتیب دارای ۱۰ و ۱۲ درصد سلول‌های هاپلوئیدی هستند (شکل ۴).



شکل ۴: بررسی میزان DNA هاپلوئیدی در سلول‌های بنیادی جنینی رده سلولی PmESC1 و PmESC8 در مقایسه با Royan B20 به‌عنوان کنترل (۱۰۰ درصد دیپلوئید)

اثرات آن است. البته نباید خطرات جدی هموزیگوت بودن را نادیده گرفت. فقدان هتروزیگوت می‌تواند هر نوع نقص ژنتیکی بالقوه حاضر در ژنوتیپ را تقویت و بروز دهد و در نتیجه می‌تواند محدودیت جدی را در پی داشته باشد. در مطالعه حاضر شرایط کشت جدیدی برای تولید رده سلولی پرتوان از جنین‌های پارتنوژنتیک معرفی شده است. در این مطالعه سلول‌های بنیادی جنینی پارتنوژنتیکی موشی از جنین‌های پارتنوژنتیکی فعال شده با استرانسیم تولید و نگهداری شدند. بر اساس مطالعات انجام‌شده، امروزه روش‌های فعال‌سازی مصنوعی تخمک بسیار زیاد است. این روش‌ها شامل تحریک‌های الکتریکی، شیمیایی و مکانیکی است (۱۳). اغلب این عوامل سبب افزایش یکنواخت کلسیم درون سلولی می‌شوند. در بین آن‌ها استرانسیم کلراید برخلاف دیگر القاکننده‌ها به‌صورت متوالی و مکرر باعث افزایش نوسانات کلسیمی می‌شود که شبیه ورود اسپرم به تخمک است. استفاده از غلظت ۵ میلی‌مولار استرانسیم به‌همراه غلظت ۲ میلی‌مولار EGTA به‌عنوان بهترین فعال‌کننده تخمک معرفی شده است (۱۴). نتایج مطالعه حاضر نیز موافق با یافته فوق بود، به‌طوری‌که ۱۰ درصد تخمک‌های فعال‌شده با استرانسیم و EGTA به مرحله بلاستوسیت رسیدند که بهترین بازده تولید بلاستوسیت‌های سالم بود. یکی از مشکلات عمده تولید سلول‌های بنیادی جنینی بازده پایین آن است. در این خصوص محققین با دست‌کاری مسیرهای پیام‌رسانی با استفاده از کوچک مولکول‌ها توانستند رده‌های سلولی موردنظر را با کارایی بالا

### تشخیص و تعیین سلول‌های بنیادی هاپلوئید

برای بررسی و تعیین میزان سلول‌های هاپلوئید موجود در جمعیت هر دو رده PmESC1 و PmESC8، میزان DNA هاپلوئیدی در پاساژ چهارم به‌وسیله دستگاه فلوسایتومتری مورد سنجش قرار گرفت. سلول‌های بنیادی جنینی موشی Royan

### بحث

استفاده از سلول‌های بنیادی پرتوان برای مقاصد و اهداف گوناگون در دنیای پزشکی روزبه‌روز بیشتر می‌شود. مهم‌ترین کاربرد بالقوه این سلول‌ها در پزشکی ترمیمی است که از جمله می‌توان به ترمیم بافت‌های آسیب دیده قلب، بافت‌های استخوانی، ضایعات عصبی، سوختگی‌ها و ضایعات پوستی اشاره کرد. از جمله محدودیت‌های عمده پیش روی محققان در استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی پرتوان، پس‌زدگی این سلول‌ها در پیوند سلولی است؛ زیرا آنتی‌ژن‌های سازگاری نسجی این سلول‌ها با شخص گیرنده یکی نبوده است و احتمال پس‌زدگی آن‌ها بالا می‌رود (۱۸). استفاده از جنین‌های پارتنوژنتیک مزایای منحصربه‌فردی دارد. جنین‌های پارتنوژنتیک منبع توانمندی از سلول‌های بنیادی دارای سازش‌پذیری بافتی هستند و دشواری‌های ناشی از تطبیق بافت جهت پیوند را به‌میزان زیادی کاهش می‌دهند. در این صورت می‌توان هموزیگوتی را به‌عنوان یک مزیت تلقی کرد، زیرا باعث کاهش ایمنی‌زایی مشتقات یک سلول بنیادی می‌شود و احتمال تولید سلول‌های بنیادی هموزیگوت برای تعداد زیادی از فنوتیپ‌های قابل تطبیق موجود برای یک پیوند را به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهد (۱۹). به‌علاوه از هموزیگوت بودن می‌توان برای انتخاب رده‌های سلولی دارای ژن‌های پاسخگو به دارو، ژن یک بیماری و یا ژن سرطانی استفاده کرد که ابزار تحقیقاتی مفید برای آزمایش دارو و بهبود

سیتوپلاسم بالا) کاملاً مشابه با سلول‌های بنیادی جنینی حاصل از بلاستوسیست معمولی بودند. این سلول‌ها در محیط آزمایشگاه تا بیش از ده پاساژ پیش رفتند که نشان از تکثیر پذیری آن‌ها است. همچنین این رده‌ها، مارکرهای خاص بنیادینگی از قبیل Oct4, Nanog, SSEA1 و ALP را بیان کردند. تمایز خودبه‌خودی برای دو رده، توانایی تمایز و تولید دودمان‌های سه لایه زایای جنینی اکتودرم، مزودرم، و اندودرم را نشان داد. بنابراین، تغییر مورفولوژی سلول‌ها و همچنین بیان ژن‌های تمایزی و تشکیل تراتوکارسینوما به‌عنوان آزمایش تکمیلی حاکی از پرتوانی سلول‌های بنیادی تولید شده از جنین‌های پارتنوژنتیک بود.

### نتیجه گیری

ارزیابی سلول‌های بنیادی تولیدشده در این مطالعه نشان داد که در حدود ۱۰ تا ۱۲ درصد از جمعیت سلولی هاپلوئیدی بودند. این درصد در مقایسه با اولین گروهی که موفق به تولید رده سلولی پرتوان هاپلوئیدی روی سلول‌های تغذیه‌کننده با بازده ۱۰ درصد شده بودند، درصد قابل‌تاملی بود (۱۰). با توجه به اهمیت رده‌های سلولی پرتوان هاپلوئیدی در مطالعات ژنتیکی، به نظر جداسازی و نگهداری جمعیت‌های هاپلوئیدی می‌تواند در پیشبرد مطالعات بعدی بسیار پر اهمیت باشد.

### تشکر و قدردانی

هزینه انجام این طرح توسط پژوهشگاه رویان تامین شده است.

### منابع

1. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *nature*. 1981; 292(5819): 154-156.
2. Martin, GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981; 78(12): 7634-8.
3. Ebert AD, Svendsen CN. Human stem cells and drug screening: opportunities and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2010; 9(5): 367-72.
4. Murry CE, Keller G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell*. 2008; 132(4): 661-80.

تولید کنند (۲۰ و ۲۱). به‌کار بردن کوچک مولکول‌ها در تولید سلول‌های بنیادی جنینی نمایانگر تاثیر و کارایی آن‌ها در حفظ پرتوانی و فرآیندهای مختلف زیستی است. استفاده از این مولکول‌ها، نسبت به روش‌های ژنتیکی برای ایجاد تغییر در یک سلول از نظر زمان، سختی کار و هزینه مقرون به‌صرفه است (۲۲). محیط کشت بهینه در سطح بین‌المللی برای تولید و نگهداری رده‌های پرتوان موشی متشکل از دو بازدارنده‌ی مسیره‌های MEK و GSK3 است که تحت عنوان محیط 2i شناخته شده است. یکی از چالش‌های اصلی این محیط عمل‌کرد منفی مهار GSK3 بر حفظ تمامیت ژنومی است. عامل اصلی از دست رفتن تمامیت ژنومی در این مسیر مولکول APC است. مولکول APC یکی از مولکول‌های شناخته شده مهم در مسیر اصلی Wnt است. همچنین نشان داده شده است که مهارکننده‌های GSK3 باعث جلوگیری از جدا شدن کروموزوم‌ها می‌شوند که این اثر با استفاده از ابزار RNAi مطالعه و اثبات شده است (۲۳). اخیراً روش جدیدی را برای تولید موثر سلول‌های بنیادی جنینی از نژادهای مقاوم به تولید رده معرفی شده است که در آن کوچک مولکول بازدارنده‌ی مسیر GSK3 با یک کوچک مولکول دیگر که کاربوتاپپ سلول را متاثر نمی‌کرد استفاده کردند. در این روش، به‌کارگیری کوچک مولکول‌های PD0325901 و SB431542 که به‌ترتیب مهارکننده مسیره‌های تمایزی MAPK و TGFβ هستند (تحت عنوان Royan 2 inhibitors یا R2i)، به تولید بسیار موفق رده‌های پرتوان سلولی بنیادی جنینی از نژادهای NMRI, BALB/c, C57BL/6, DBA/2 و FVB/N که همگی مقاوم به تولید رده سلولی تحت شرایط متعارف هستند، منجر شد (۱۶ و ۲۱).

رده‌های سلولی مشتق از جنین‌های پارتنوژنتیک هاپلوئیدی اولین بار تحت شرایط عاری از سرم و روی لایه تغذیه‌کننده، در حضور 2i تولید شده است (۱۰). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که محیط کشت عاری از سرم، حاوی R2i می‌تواند به‌عنوان یک روش بسیار موثر برای تولید رده‌های سلولی بنیادی جنینی پرتوان از جنین‌های پارتنوژنتیک موش در بستر کشت ژلاتینی مورد استفاده قرار گیرد. در این مطالعه حدود ۵۰۰ تخمک، به‌منظور تولید رده سلولی، مورد استفاده قرار گرفت. بعد از فعال‌سازی، حدود ۱۷ درصد از تخمک‌ها به مرحله بلاستوسیست، رسیدند و ۵۰ درصد از بلاستوسیست‌ها، رده سلولی پرتوان تولید کردند. سلول‌های بنیادی جنینی تولید شده در این مطالعه، از نظر ریخت کلونی و سلولی (نسبت هسته به

5. Li W, et al. Androgenetic haploid embryonic stem cells produce live transgenic mice. *Nature*, 2012;490(7420): 407-11.
6. Hong Y. Medaka haploid embryonic stem cells. *Methods Cell Biol.* 2010; 100: 55-69.
7. Mortensen R. Overview of gene targeting by homologous recombination. *Curr Protoc Neurosci.* 2007; Chapter 4: p. Unit 4 29.
8. Pettitt SJ, et al. A genetic screen using the PiggyBac transposon in haploid cells identifies Parp1 as a mediator of olaparib toxicity. *PLoS One*, 2013. 8(4): e61520.
9. Yi M, Hong N, Hong Y. Generation of medaka fish haploid embryonic stem cells. *Science*. 2009; 326(5951): 430-433.
10. Leeb M, Wutz A. Derivation of haploid embryonic stem cells from mouse embryos. *Nature*. 2011; 479(7371): 131-4.
11. Yang H, et al. Generation of haploid embryonic stem cells from *Macaca fascicularis* monkey parthenotes. *Cell research*. 2013; 23(10): 1187-1200.
12. Li W, et al. Genetic modification and screening in rat using haploid embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2014; 14(3): 404-14.
13. Marcus GJ. Activation of cumulus-free mouse oocytes. *Mol Reprod Dev.* 1990; 26(2): 159-62.
14. Kishigami S, Wakayama T. Efficient strontium-induced activation of mouse oocytes in standard culture media by chelating calcium. *Journal of Reproduction and Development*, 2007. 53(6): 1207-1215.
15. Wu B, et al. Stem cells and small molecule screening: haploid embryonic stem cells as a new tool. *Acta Pharmacol Sin.* 2013; 34(6): 725-31.
16. Hassani SN, et al. Inhibition of TGFbeta signaling promotes ground state pluripotency. *Stem Cell Rev.* 2014; 10(1):16-30.
17. Baharvand H, Hassani SN. A new chemical approach to the efficient generation of mouse embryonic stem cells. *Methods Mol Biol.* 2013; 997: 13-22.
18. Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature*. 2006; 441(7097): 1094-6.
19. Lin H, et al. Multilineage potential of homozygous stem cells derived from metaphase II oocytes. *Stem Cells*. 2003; 21(2): 152-161.
20. Ying QL, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*. 2008; 453(7194): 519-23.
21. Hassani SN, et al. Simultaneous Suppression of TGF- $\beta$  and ERK Signaling Contributes to the Highly Efficient and Reproducible Generation of Mouse Embryonic Stem Cells from Previously Considered Refractory and Non-permissive Strains. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2012; 8(2): 472-481.
22. Xu Y, Y. Shi, Ding S. A chemical approach to stem-cell biology and regenerative medicine. *Nature*. 2008; 453(7193): 338-344.
23. Tighe A, et al. GSK-3 inhibitors induce chromosome instability. *BMC Cell Biol.* 2007; 8(1): 34.

## Production Improvement of Derived Haploid Mouse Embryonic Stem Cells from Parthenogenetic Mouse Blastocysts by Simultaneous Suppression of TGF-B and ERK Signaling Pathways

Mollamohammadi S, M.Sc.<sup>1</sup>, Shiravi AH, Ph.D.<sup>1</sup> Hassani SN, Ph.D.<sup>2,3</sup>,  
Baharvand H, Ph.D.<sup>2,3\*</sup>

1. Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

2. Department of Stem Cells and Developmental Biology at the Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, PO Box 19395-4644, Tehran, Iran

3. Department of Developmental Biology, University of Science and Culture, ACECR, Tehran, Iran

\*Correspondence address. baharvand@royaninstitute.org

Received: 7 Feb. 2015

Accepted: 10 Mar Jun. 2015

---

### Abstract

**Aim:** In this project, production of haploid parthenogenetic embryonic stem cells has been studied in presence of the ERK and TGF- $\beta$  signaling pathway inhibitors.

**Material and Methods:** First the parthenogenetic blastocyst- produced with chemical activation of oocytes- was cultured in R2i culture condition (containing PD0325901 and SB431542 which inhibit ERK and TGF- $\beta$  signaling pathways respectively). Then parthenogenetic embryonic stem cell lines was subsequently expanded and preserved in the same culture medium. Using immunofluorescent staining and qRT-PCR, expression of the pluripotent markers were evaluated. Moreover, differentiation potential of these cells was assessed by spontaneous differentiation and teratoma formation assay. Degree of haploid in this cell lines was determined by flowcytometry methods.

**Results:** In R2i culture condition, about 50% of parthenogenetic embryos produce cell lines, out of which 10-13% are haploid. Established parthenogenetic stem cell lines demonstrate pluripotent stemness characteristics including morphology, passagability as well as expression of pluripotent specific genes in mRNA and protein levels. In addition, these cells were able to differentiate spontaneously to embryonic germ layers and form teratoma.

**Conclusion:** Inhibition of ERK and TGF- $\beta$  signaling pathways can provide an appropriate condition for producing haploid stem cells from parthenogenetic embryos.

**Keywords:** Mouse parthenogenetic embryo, Haploid embryonic stem cells, ERK and TGF-beta signaling pathway