مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۹، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۷

تکوین بلاستومرهای منفرد جداشده از جنین‌های ۲ سلولی و ۴ سلولی موش به بلاستوسیست جهت استخراج و تولید سلول‌های بنیادی جنینی بدون استفاده از سلول‌های تغذیه کننده

فرشید یکانی .Ph.D[1*]، مهناز آذرنیا .Ph.D[2]

۱- دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم جانوری، تهران، ایران
۲- دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم جانوری، تهران، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: yekani.farshid@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۹/۱۳

چکیده

هدف: تعیین شرایط بهینه که در آن بلاستومرهای جنین‌های ۲ و ۴ سلولی موش با کیفیت بالایی به بلاستوسیت تکوین پیدا کنند و تولید سلول‌های بنیادی جنینی(ESC) از این بلاستوسیست‌ها بدون حضور سلول‌های تغذیه کننده.

مواد و روش‌ها: ابتدا جنین‌های ۲ و ۴سلولی از اویداکت موش‌های NMRI جمع آوری شدند. بلاستومرها جدا شده و در سه وضعیت منفرد، گروهی و هم‌کشتی با جنین در محیط کشت با حجم ۱و۵ میکرولیترکشت شدند. سپس بلاستوسیست‌های حاصل، بر روی ظروف کشت پوشیده شده با ژلاتین کشت شدند تا به سلول‌های ES تبدیل شوند. بیان نشان‌گرهای اختصاصی برای بلاستوسیست‌ها و سلول‌های ES مشتق شده به‌روش ایمونوسیتوشیمی و PCR بررسی شد.

نتایج: ثابت شد که حجم ۱ میکرولیتر بهتر از ۵ میکرولیتر عمل کرد و در حالت هم‌کشتی با جنین و کشت گروهی، در مقایسه با کشت منفرد نتیجه بهتری حاصل شد و درصد بلاستوسیست‌های حاصل به‌طور معنی‌داری بالا بود. ارزیابی بیان Oct4 که در ناحیه ICM (توده سلولی داخلی) بلاستوسیست بیان می‌شود و شمارش سلول، ثابت کرد که کمیت و کیفیت با هم افزایش می‌یابد. همچنین مشخص شد که پتانسیل بلاستومرهای ۴ سلولی نسبت به ۲ سلولی پایین می‌باشد. بلاستوسیست‌های مشتق از کشت منفرد بلاستومرها توانستند در محیط اختصاصی، تبدیل به سلول‌های ES شوند و این سلول‌ها توانایی تمایز به سلول‌های مختلف را هم نشان دادند.

نتیجه‌گیری: روش مطالعه حاضر برای بررسی پتانسیل تکوینی بلاستومرها و تولید سلول‌های ES می‌تواند برای سایر گونه‌ها کاربرد داشته باشد. تولید سلول‌های ES بدون سلول‌های تغذیه کننده، در مورد انسان موضوع بسیار پراهمیت و پر چالشی می‌باشد.

واژگان کلیدی: بلاستوسیست، بلاستومرهای منفرد، جنین‌های ۲ و ۴ سلولی، سلول‌های ES، کشت گروهی

مقدمه

در رده پستانداران، لقاح از نوع داخلی بوده و بعد از ورود اسپرم به دستگاه تناسلی موجود ماده، شروع به مهاجرت به‌سمت لوله‌های تخمک‌بر نموده و بعد از مواجهه با تخمک، آن را بارور می‌نمایند و سپس مراحل کلیواژ یا تسهیمات سلولی آغاز می‌شود و تا مرحله تشکیل بلاستوسیست پیش می‌رود و پس از خروج از پوشش شفاف زوناپلوسیدا که اطراف جنین را فرا گرفته، لانه‌گزینی صورت می‌گیرد و تکوین پیشرفته شروع می‌شود (۱). بلاستوسیست دارای دو نوع جمعیت سلولی می‌باشد، توده سلولی داخلی (Inner cell mass, ICM) که از جمله نشان‌گرهای اختصاصی آن، Oct4 بوده و ساختارهای جنینی و خارج جنینی را تشکیل می‌دهد و تروفکتودرم (TE) که جفت مادر و جنین را ایجاد می‌کند (۱و۲). در مراحل ابتدایی پیش از لانه گزینی شامل مراحل ۲ سلولی و ۴ سلولی، هر کدام از سلول‌ها یا همان بلاستومرهای منفرد، دارای ظرفیت تکوینی همه‌توان می‌باشند، به این معنی که قادر هستند تا در شرایط رشد و نموی مناسب، به تنهایی تکوین پیدا کرده و تبدیل به یک بلاستوسیست شوند (۱). در سال ۱۹۵۹ طی یک مطالعه‌ای نشان داده شد زمانی‌که بلاستومرهای منفرد مراحل ۲ یا ۴ سلولی در داخل پوشش زوناپلوسیدای خالی قرار داده شوند و سپس به رحم جاندار انتقال یابند، پس از چند روز، تشکیل بلاستوسیست و حتی لانه‌گزینی مشاهده می‌شود (۳). درصد بسیار پایینی از تولد نیز مشاهده شد که فقط حاصل از بلاستومرهای مرحله ۲ سلولی بودند (۱۶ درصد). مطالعه مشابه بر روی بلاستومرهای ۴ سلولی و ۸ سلولی موش صورت گرفت که مانند مطالعه قبل، فرایند لانه‌گزینی قابل مشاهده بود اما در این مورد تولدی گزارش نشد (۴). در بعضی از مطالعات دیگر بلاستومرهای مراحل ۲ یا چند سلولی، با انواع همتای خود از یک فنوتیپ دیگر جفت می‌شدند و در این صورت تکوین جنین با موفقیت صورت می‌گرفت و بازدهی تقریبا ۷۰ درصدی نشان می‌داد (۵). در دو مطالعه اول، محققین اشاره به این واقعیت داشتند که بلاستوسیست‌های مشتق از بلاستومرهای منفرد، اندازه قطر کوچک‌تری نسبت به انواع مشتق از جنین‌های کامل یا Intact دارند و بنابراین بلاستوسیست‌های مشتق از بلاستومرهای منفرد تعداد سلول‌های کمتری دارند که این موضوع یکی از دلایل اصلی عدم تکوین کامل بلاستومرها تا تشکیل و تولد نوزاد معرفی شد. این در حالی است که در مطالعه Kelly این مساله وجود نداشت. در تایید این موضوع، به‌ترتیب بلاستومرهای منفرد جنین‌های انسانی و موشی از مراحل مختلف جنینی، در شرایط آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفتند و مشاهده شد که هرچه بلاستومرها از جنین‌های مراحل پیشرفته‌تر جداسازی می‌شوند، در نتیجه تکوین، بلاستوسیست‌های کوچک‌تری حاصل می‌شود. در این دو مطالعه، انتظار می‌رفت که شرایط مختلف کشت جنین شامل کشت گروهی جنین‌ها یا کشت جنین در حجم‌های مختلف محیط کشت نیز لحاظ شود، چون ثابت شده است که در کشت گروهی جنین‌ها، عوامل ترشحی از سلول‌ها که مسیرهای سیگنالی مختلفی را فعال یا مهار می‌کنند، در محیط تجمع یافته و باعث تکوین بهتر جنین‌ها می‌شوند (۶ و۷). به‌هر حال این پارامترها دور از نظر بوده‌اند. از آن‌جایی‌که بازدهی تکوین بلاستوسیست از بلاستومرها ۷۰ تا ۸۰ درصد بوده‌است که درصد نسبتا خوبی می‌باشد، لذا بررسی چنین پارامتری نیز ضروری به‌نظر می‌رسید تا ابهامی باقی نماند.

یکی دیگر از موضوعاتی که در مورد بلاستومرهای منفرد مطرح می‌باشد، تولید سلول‌های بنیادی جنینی است که مطالعات زیادی در این زمینه صورت گرفته است (۸، ۹، ۱۰ و ۱۱). تولید این سلول‌ها در انسان با محدودیت‌های زیادی

از جمله مسائل اخلاقی مواجه بوده است (۸، ۹ و ۱۰) زیرا با روش‌های قدیمی، در مورد تمامی گونه‌ها، یک بلاستوسیست کامل باید از بین رود تا یک رده از سلول‌های بنیادی تولید شود (۱۲) و عملا در مورد انسان شدنی و اخلاقی نیست. روش نوین تولید این سلول‌ها، با استفاده از بلاستومرهای منفرد صورت می‌گیرد که از مراحل دوسلولی به بعد قابل استفاده هستند و بلاستومرها تکثیر شده و بعد از ورود به مرحله تشکیل بلاستوسیست با اندازه کوچک، ICM آن سریع تکثیر شده و ساختار گنبدی شکل ایجاد می‌کند و بعد قابل پاساژ می‌باشد (۱۳ و ۱۴). در مطالعه اخیری که در پژوهشگاه رویان تهران انجام شد، ترکیبی از کوچک مولکول‌ها، شامل SB431542 و PD0325901 که به‌ترتیب مسیرهای سیگنال سلولی TGF-β و Erk1/2 را مهار می‌کنند و هر دو تحت عنوان ترکیبات R2i (Royan dual inhibitors) به معنی "مهارکننده‌های دوگانه رویان" نامیده می‌شوند (۱۱) مورد استفاده قرار گرفت. با مهار این مسیرها تکثیر و پرتوانی سلول‌ها تقویت شده و بازدهی تولید سلول‌های بنیادی جنینی نیز افزایش می‌یابد. در مطالعه‌ای که انجام شده است نیز نشان داده شد که مهارکننده‌گان مطرح شده با مکانیزم متیلاسیون ژنوم و مهار ژن‌های تمایزی عمل می‌کنند (۱۵) همچنین در این مطالعه، بلاستوسیست‌ها بعد از این‌که جراحی ایمنی شدند و ICM جدا سازی شد، بر روی سطح پوشیده شده با ژلاتین و بدون لایه سلولی تغذیه کننده در محیط کشت حاوی R2i انتقال داده شده و رده سلول‌های بنیادی تولید شدند.

بر اساس مطالب فوق، ابتدا دو سوال مهم برای ما مطرح می‌شود: اول این‌که آیا شرایط کشت اعم از حجم قطره‌های کشت و تعداد سلول در حجم معین می‌تواند بر کمیت و کیفیت تکوین بلاستومرهای منفرد به‌خصوص افزایش تعداد سلول‌های تشکیل دهنده بلاستوسیست تاثیرگذار باشد و دوم اینکه آیا پتانسیل تکوینی بلاستومرهای ۲ سلولی و ۴ سلولی با یکدیکر تفاوت دارد. سپس قصد داریم به این سوال پاسخ بدهیم که آیا با استفاده از محیط حاوی R2i امکان تولید رده سلول‌های بنیادی جنینی از بلاستومرهای منفرد بر روی سطح پوشیده شده با ژلاتین و بدون استفاده از لایه سلولی تغذیه کننده وجود دارد یا نه؟

مواد و روش‌ها

شرایط و آماده سازی موش‌های ماده جهت تخمک گذاری به‌روش تزریق هورمون: نمونه حیوانی مورد استفاده در این مطالعه، موش نژاد NMRI می‌باشد که از پژوهشگاه رویان تهران خریداری شدند. تمامی این موش‌ها طبق اصول و دستورالعمل‌های اخلاقی حاکم بر مرکز نگه‌داری و آزمایشگاه حیوانات در پژوهشگاه رویان و دانشگاه خوارزمی نگه‌داری و تیمار شدند (کد اخلاق: IR.ACECR.REC.1396.002). موش‌های ماده ۸ تا ۱۰ هفته‌ای طی تزریق هورمون‌های PMSG و HCG (Intervet, Belgium) آماده تخمک‌گذاری می‌شوند. تزریق هورمون اول برای تحریک تخمدان برای رشد فولیکول‌ها بوده که در ساعت ۱۲ ظهر انجام شد و دومی برای تخمک‌گذاری می‌باشد که بعد از ۴۸ ساعت تزریق شد (۱۱). بلافاصله بعد از تزریق HCG، موش‌های ماده با موش‌های نر به‌صورت یک به یک جفت قرار داده شدند و صبح روز بعد تشکیل VP بررسی شد. موش‌هایی که از این نظر مثبت بودند به‌عنوان موش‌های روز ۰/۵ حاملگی در نظر گرفته شدند و به‌ترتیب ۲۴ ساعت و ۳۶ ساعت بعد برای تهیه جنین‌های ۲ و ۴ سلولی مورد استفاده قرار گرفتند.

تهیه جنین‌های ۲ و ۴ سلولی و جدا سازی بلاستومرها: بعد از نخاعی کردن موش‌ها، اویداکت‌ها خارج شده و توسط سرنگ انسولین و با سرسوزن G:30 فلاش شده و جنین‌ها

جمع آوری شدند (۱۱). برای جابه‌جایی جنین‌ها در محیط، از پیپت دهانی استفاده شد که از چندین بخش تشکیل می‌شود شامل یک پیپت پاستور شیشه‌ای که انتهای آن توسط شعله کشیده شده و به‌صورت مجرای موئینه شکل می‌گیرد و یک شیلنگ نازک به آن وصل است که به‌واسطه یک فیلتر ۰/۲ با نیروی دم و بازدم ملایم می‌توان جنین‌ها را جابه‌جا کرد. جنین‌ها بعد از این‌که در قطره‌های PBS شست و شو داده شدند، به قطره آنزیم پروتئاز E انتقال پیدا کردند تا پوشش زوناپلوسیدا هضم شود. در مرحله بعد، جنین‌های فاقد زوناپلوسیدا، به‌وسیله پیپت پاستور با نوک موئینه و تنگ شده با شعله، پیپتاژ شده و بلاستومرها از هم جدا شدند.

کشت بلاستومرها در گروه‌های مختلف با شرایط متفاوت

بلاستومرها در محیط کشت T6 (۱۶) که یک محیط استاندارد برای جنین می‌باشد، کشت داده شدند. این محیط حاوی مکمل‌های مهم شامل: اسیدهای آمینه ضروری (EAA، Sigma)، اسیدهای آمینه غیر ضروری (NEAA, Sigma)، گلوتامین (L-GLn, Sigma) و سرم جنین گاوی (BSA, Sigma) می‌باشد. در قدم اول تعیین حجم بهینه کشت مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مرحله، تاثیر حجم‌های ۱ و ۵ میکرولیتری با یکدیگر مقایسه شد که در هر قطره، یک بلاستومر جدا شده از جنین ۲ سلولی قرار گرفت و به‌مدت ۳ روز در انکوباتور کشت داده شد. در مرحله بعد، بر اساس نتایج به‌دست آمده، حجم ۱میکرولیتری انتخاب شد و بلاستومرها در سه گروه کشت داده شدند. گروه اول کشت منفرد در قطره، گروه دوم کشت گروهی در قطره (دو بلاستومر در قطره) و گروه سوم هم کشتی با جنین (یک بلاستومر با یک جنین کامل یا Intact در قطره) بود. در یک گروه هم یک جنین کامل یا Intact در قطره ۱ میکرولیتری کشت داده شد که به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد تا بقیه گروه‌ها نسبت به آن مقایسه شوند. قطره‌ها در پلیت مخصوص کشت باکتری قرار داده شده که روی آن‌ها روغن مخصوص به‌نام Mineral oil ریخته شد تا هم مانع نفوذ آلودگی شود و هم از تبخیر قطره‌ها جلوگیری نماید. تمام گروه‌ها در ۴۰ تکرار تکنیکی و ۳ تکرار بیولوژیک انجام شدند. گروه‌های کشت در انکوباتور قرار داده شدند تا بعد از ۳ روز، تکوین و تشکیل بلاستوسیست بررسی شود. بررسی کمی این مرحله از کار بر اساس درصد بلاستوسیست‌های تکوین یافته از بلاستومرها در گروه‌های مختلف بیان شد. در مرحله بعدی، ارزیابی کیفیت بلاستوسیست‌ها بر اساس میزان بیان Oct4 ارزیابی شد. این ارزیابی براساس شمارش سلول‌های ناحیه ICM و TE مشخص شد. برای انجام آزمون رنگ‌آمیزی ایمونوفلئوروسنت، از روش‌های استاندارد استفاده شد. به‌منظور ایجاد رنگ زمینه، هسته تمامی سلول‌ها با DAPI (Sigma) رنگ آمیزی شد. آنتی‌بادی‌های استفاده شده شامل آنتی بادی اولیه Rat anti-mouse Oct4 (Abcam) و آنتی‌بادی ثانویه Donkey anti-rat (Abcam) می‌باشند.

کشت بلاستوسیست‌ها برای تولید سلول‌های ES، بدون استفاده از سلول‌های تغذیه‌کننده:

بلاستوسیست‌های تکوین یافته، به ظروف کشت پوشانده شده با ژلاتین (Sigma) (که با غلظت ۰/۱ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه انجام شد) و حاوی محیط کشت ویژه سلول‌های ES انتقال داده شدند. این محیط کشت، از محیط‌های پایه DMEM-F12(Gibco) و Neuro Basal (Gibco) با نسبت ۱:۱ تشکیل شده است. همچنین شامل مکمل‌های L-Glutamin (Sigma) ، NEAA (1X) (Sigma)، B27 (1X) (Gibco) ، N2 (1X) (Gibco) ،

(Sigma) BSA ،(Royan-bio-tech) Mouse Lif، ترکیبات R2i شامل (Sigma) (10µM) SB431542 و (Sigma) (1µM) PD0325901 می‌باشد. این محیط همچنین تحت عنوان محیط N2B27 نامیده می‌شود.

پاساژ سلول‌های بنیادی جنینی تولید شده: برای پاساژ یا انتقال سلول‌های بنیادی جنینی، ابتدا محیط روی سلول‌ها را کشیده و بعد به‌مدت ۲ دقیقه با بافر PBS شست‌وشو داده شدند. بعد PBS کشیده شده و آنزیم Trypsin-EDTA (Gibco) با غلظت ۱x اضافه شد تا سلول‌ها از سطح جدا شوند. در مرحله بعد برای خنثی سازی اثر آنزیم، محیط حاوی FBS (Gibco) به آن اضافه شد و بعد به‌وسیله محیط اصلی N2B27 به حجم رسید تا بین ظروف کشت پوشانده شده با ژلاتین تقسیم شود.

القای تمایز به دودمان‌های اکتودرمی، مزودرمی و اندودرمی در شرایط in vitro: روش‌های القای تمایز در سلول‌های ES، طبق مطالعه اخیر صورت گرفت (۱۱). ابتدا سلول‌ها در پاساژهای بین ۱۰ تا ۱۵ با تاثیر آنزیم از ظرف کشت جدا شدند و پس از شمارش به‌وسیله لام نئوبار، به غلظت ۸۰۰ سلول بر میلی‌لیتر، در محیط تمایزی سلول‌های بنیادی جنینی موشی با روش قطره معلق به‌مدت ۳ روز در انکوباتور قرار داده شدند تا سلول‌ها تجمع یافته و اجسام شبه جنینی (Embryoid bodies) تشکیل شود. محیط تمایزی DMED-High Glucose حاوی L-Glutamin(۱٪)، NEAA (۱ درصد) و FBS (۱۵ درصد) بود. برای تمایز اکتودرمی-عصبی در روز سوم تمایز، اجسام شبه جنینی وارد محیط تازه حاوی رتینوئیک اسید (۲ میکرومولار) می‌شوند. در این‌حالت، کشت به‌صورت سوسپانسیونی در داخل ظروف کشت باکتری انجام شد و تجمعات سلولی در محیط به‌صورت شناور و معلق بودند. اجسام جنینی که در این محیط به سرنوشت عصبی القا می‌شوند، تا ۷ روز در این محیط، کشت داده شدند و هر دو روز یک‌بار نصف محیط تجدید شد. سپس تجمعات سلولی القا شده بعد از ۷ روز به ظروف ۴ خانه پوشیده شده با ژلاتین منتقل می‌شوند تا سلول‌ها گسترش یافته و استطاله‌های خود را نشان دهند. برای تمایز مزودرمی (عضله قلبی)، تجمعات سلولی یا اجسام شبه جنینی، با روش فوق تولید شدند با این تفاوت که در محیط تمایزی از همان ابتدا از اسید آسکوربیک با غلظت ۰/۱ میکرومولار استفاده شد. در روز سوم، تجمعات سلولی به‌داخل ظروف کشت باکتری و در همان محیط کشت انتقال پیدا کردند و ۳ روز دیگر در این محیط کشت داده شدند. بعد تجمعات سلولی به ظروف کشت ۴ خانه پوشیده شده با ژلاتین و در محیط کشت تمایزی انتقال پیدا کردند. ۱ تا ۵ روز دیگر تجمعات چسبیده و تپنده و ضربان‌دار قابل مشاهده بودند. برای انجام تمایز اندودرمی، از محیط N2B27 بدون R2i و Lif برای تولید تجمعات سلولی یا اجسام شبه جنینی استفاده شد. بعد از ۳ تا ۴ روز، Activin A نیز به‌میزان ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر به محیط اضافه شد و به‌مدت ۵ روز با همین ترکیب فرایند کشت ادامه پیدا کرد. سپس اجسام شبه جنینی القا شده به ظروف کشت ۴ خانه پوشیده شده با ژلاتین محتوای همان نوع محیط کشت انتقال پیدا کردند. بعد از ۷۲ ساعت سلول‌های اندودرمی با ظاهر ویژه خود مشخص بودند.

تمایز در شرایط In vivo: تشکیل تراتوما: برای این‌کار، سلول‌ها بعد از تیمار آنزیمی و جدا شدن از سطح ظرف کشت، به تعداد ۱۰ میلیون، در ناحیه زیر پوست پشتی موش Nude که سیستم ایمنی آن کاملا از کار افتاده تزریق

شد (۴). بعد از ۲۰ روز در ناحیه مذکور، توده‌ای به‌شکل برآمدگی زیر پوست تحت عنوان تراتوما تشکیل شد. بافت تراتوما از زیر پوست خارج شده و بعد از آماده سازی، برش‌گیری و رنگ‌آمیزی به‌روش هماتوکسیلین-ائوزین بر روی لام، زیر میکروسکوپ بررسی شد.

بررسی بیان نشانگرهای اختصاصی به‌وسیله روش ایمونوسیتوشیمی: انجام این تکنیک بر اساس روش‌های استاندارد گزارش شده در مقالات صورت گرفت (۱۱،۱۵). آنتی‌بادی‌های اولیه که در این مطالعه استفاده شدند عبارت‌اند از: anti-Oct4(Santacruz)، (Santacruz) anti-Nanog، anti-sox2 (Abcam)، (Abcam) anti-GFAP، anti-Faxa2(Abcam) و anti-(Abcam) Nkx2.5. آنتی‌بادی‌های ثانویه نیز عبارت‌اند از: Alexa fluor 488 donkey anti-mouse immunoglobulin G (Abcam) و Alexa fluor 568 goat anti-mouse immunoglobulin M (Abcam). برای ایجاد رنگ زمینه، هسته تمام سلول‌ها با رنگ فلئورسنت DAPI (Sigma) رنگ‌آمیزی شد و زیر میکروسکوپ فلئورسنس (Olympus) مشاهده شد.

ارزیابی بیان ژن در سطح mRNA: در این مرحله از کار، ابتدا توسط محلول Trizol، RNA کل سلول‌ها استخراج شد و جهت دو رشته‌ای کردن نمونه‌های RNA و ساختن cDNA از کیت استفاده شد (Fermentase). پرایمرهای اختصاصی به‌صورت آنلاین و در سایت https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ طراحی شدند که در جدول۱ نشان داده شده است. جهت بررسی وجود mRNA های مورد نظر، از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) استفاده شد که تمام اصول آن بر اساس مطالعات اخیر صورت گرفت (۹و۴). در نهایت برای ارزیابی نهایی، محصولات PCR بر روی ژل آگار با غلظت ۱ درصد الکتروفورز شده و سپس به‌کمک GelRed (Sinagene) رشته‌های DNA ظاهر شده و باندهای تشکیل شده برای بیان ژن‌های اختصاصی اکتودرمی، اندودرمی و مزودرمی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

جدول۱: پرایمرهای Forward و Reverse برای نشانگرهای مختلف جهت بررسی بیان ژن در سطح mRNA

	Forward primer	Reverse primer	Tm
Gfap	TTGTCCCAATACAGGCTCACC	GACAAGCTGGAAAGGTGTGG	61
S100β	CTAGGCTAGGCATTCCCGTG	ATGAGCAACCTCTTCGGGTG	۵۹
Foxa2	GCACTCGGCTTCCAGTATGC	GTAGTAGCTGCTCCAGTCGG	۶۰
αFP	AGAAGTACGGACATTCATGAACAA	CTTGGAAAGTTCGGGTCCCA	۶۰
Gata4	AGAGCTTCCACCTAGGGACT	GAGAGGCACAACTCGCTCAA	۶۰
T	AGCGAGTTCCAGAGCAATCT	CTCGGTGAGAACCTGCGTTT	۶۱
Gapdh	ACGGACATTCTCCCAAT	CGGTGAGAACTCTTCGGG	۶۰

آنالیز داده‌ها

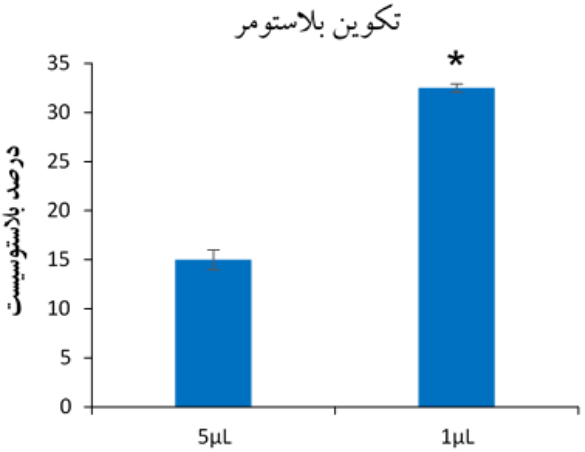
تصاویر مربوط به بلاستوسیست‌ها توسط میکروسکوپ نوری یا فلئورسنس معکوس شرکت Olympus گرفته شد. دوربین و نرم‌افزار استفاده شده مربوط به‌همین میکروسکوپ، نسخه DP2-BSW بود که قطر بلاستوسیست‌ها توسط آن اندازه‌گیری شد. آنالیز داده‌های به‌دست آمده به‌وسیله نرم افزار Spss16 و با روش ANOVA دوطرفه برای آنالیزهای دو متغیره و یک‌طرفه برای آنالیزهای تک متغیره صورت گرفت. جهت مشخص نمودن تفاوت بین گروه‌های مختلف با یکدیگر، از تست Tukey به‌عنوان Post hoc استفاده شد. برای مقایسه داده‌ها به‌صورت دو به دو، آزمون (t) مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

حجم ۱ میکرولیتری به‌عنوان حجم بهینه برای کشت بلاستومرها

در این بخش از مطالعه، دو حجم ۱ و ۵ میکرولیتر با محیط کشت T6 مورد آزمون قرار گرفتند. محیط T6 یکی از محیط‌های استاندارد برای کشت جنین می‌باشد. برای این مرحله از کار، بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های ۲ سلولی استفاده شدند که در هر کدام از قطره‌های گروه‌های میکرولیتری بودند [(۱۵ درصد)۶/۴۰] و نسبت به‌دست آمده برابر ۲/۱ بود (p<۰/۰۵، شکل۱). بنابراین حجم ۱ میکرولیتری به‌عنوان حجم بهینه برای ادامه بررسی‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

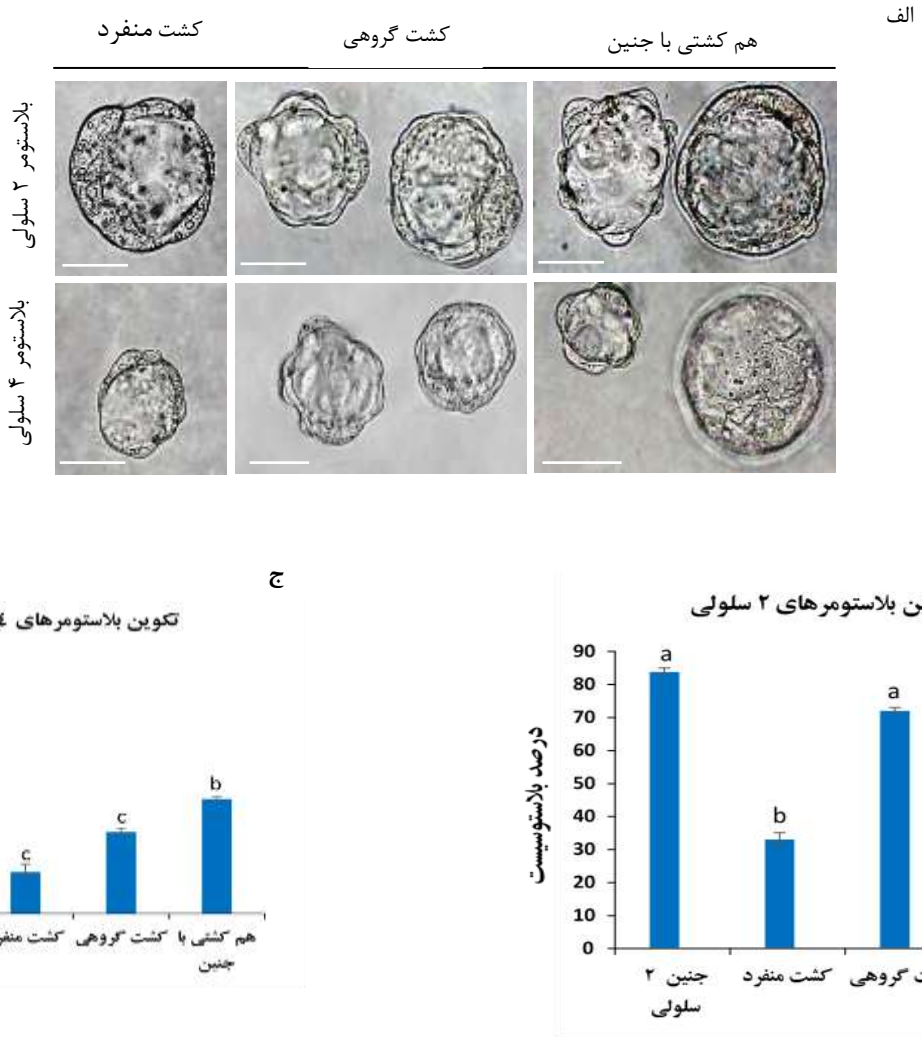
نتایج نشان داد که تعداد بلاستومرهایی که در قطره‌های ۱ میکرولیتری به بلاستوسیست تکوین پیدا کرده بودند [(۳۲/۵ درصد) ۱۳/۴۰] حدودا ۲ برابر قطره‌های ۵ و ۱ میکرولیتری، ۱ عدد بلاستومر قرار داده شد (n= ۴۰).



شکل۱: تاثیر حجم کشت بر روند تکوین بلاستومرها. بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های ۲ سلولی در دو حجم ۱ و ۵ میکرولیتری در هر گروه به تعداد ۴۰ عدد کشت داده شدند. بلاستوسیست‌های حاصل در حجم ۱ میکرولیتری، ۲/۱ برابر حجم ۵ میکرولیتری بودند. این بررسی در سه تکرار بیولوژیک صورت گرفت و آنالیز آماری با استفاده از آزمون (t) انجام شد و داده‌ها به‌صورت Mean±SD نمایش داده شده است. p<۰/۰۵*.

تکوین بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های ۲ و ۴ سلولی در شرایط مختلف کشت

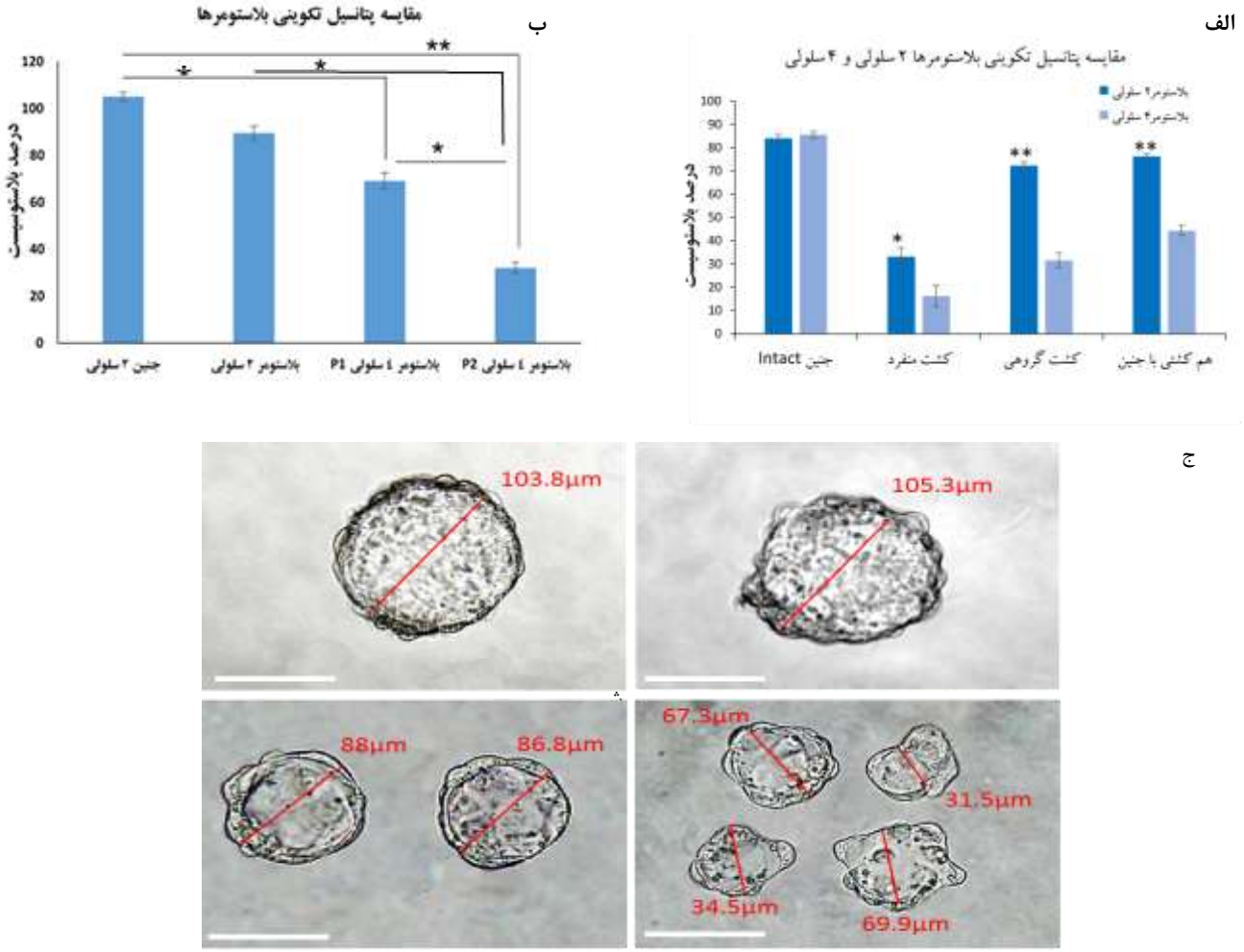
در این مرحله، بلاستومرها در سه گروه کشت منفرد، کشت گروهی و هم‌کشتی با جنین مورد بررسی قرار گرفتند (شکل۲ الف). نتایج نشان داد که بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های ۲ و ۴ سلولی، در گروه‌های هم‌کشتی جنین و کشت گروهی، نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی داری نشان نمی‌دهند اما در مقایسه با کشت منفرد، نتیجه بهتری نشان می‌دهند که تفاوت بین آن‌ها معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$)، برای هر گروه، $n=40$) و نتایج مربوط به این ارزیابی در شکل نشان داده شده است (شکل۲ ب و ج).



شکل۲: کشت بلاستومرهای منفرد در شرایط مختلف. بلاستومرهای ۲ و ۴ سلولی در شرایط مختلف کشت داده شدند که شامل حالت منفرد (یک بلاستومردر قطره ۱ میکرولیتری)، کشت گروهی (دو بلاستومر در قطره ۱میکرولیتری) و هم‌کشتی با جنین (یک بلاستومر و یک جنین۲ یا ۴ سلولی در قطره ۱ میکرولیتری) بود (الف). در هر کدام از گروه‌ها ۴۰ عدد بلاستومر کشت داده شدند و این بررسی در سه تکرار صورت گرفت. قطره‌های حاوی جنین‌های ۲ یا ۴ سلولی نیز به‌عنوان گروه کنترل برای آنالیز آماری در نظر گرفته شدند. نتایج به‌صورت Mean±SD نمایش داده شد. تفاوت بین گروه‌های مختلف به‌وسیله تست Tukey مشخص شده و حروف کوچک انگلیسی نشان دهنده اختلاف بین گروه‌ها می‌باشندکه عبارت‌اند از: گروه ۲ سلولی (ب) a,b : $p<۰/۰۵$ ؛ گروه ۴ سلولی (ج)، a,b: $p<۰/۰۵$ ،a,c: $p<۰/۰۱$. خط مقیاس: ۵۰µm

مقایسه ظرفیت تکوینی بلاستومرهای جداشده از جنین‌های ۲ سلولی و ۴ سلولی

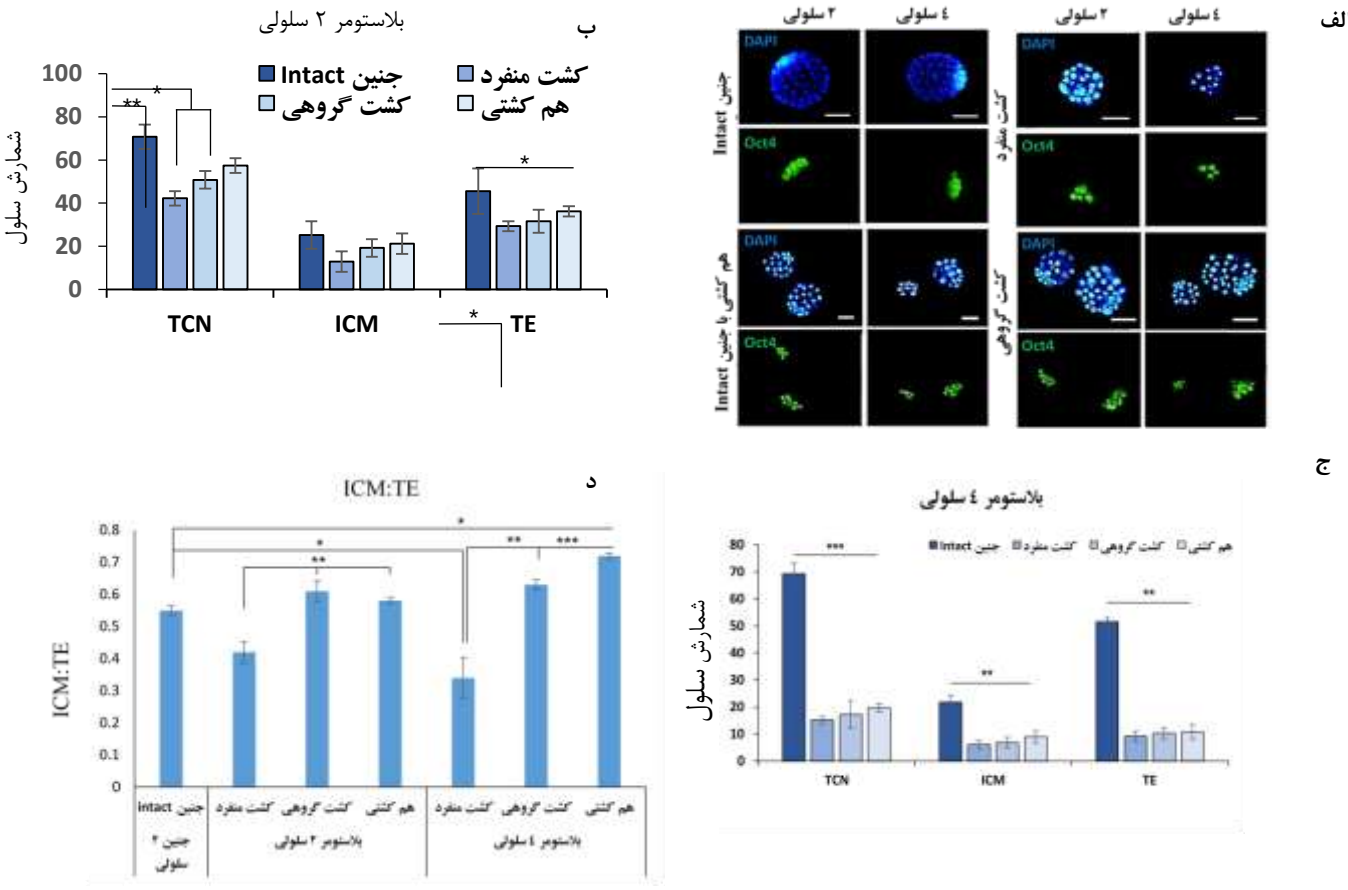
مانی‌که تمام داده‌های فوق برای بلاستومرهای ۲ سلولی و ۴ سلولی در.وضعیت‌های مختلف کشت، با آزمون (t) با یکدیگر مقایسه شدند، مشخص شد که بلاستومرهای ۲ سلولی به‌طور معنی‌داری در مقایسه با بلاستومرهای ۴ سلولی ظرفیت تکوینی بالایی دارند (شکل۳ الف). در مرحله بعد، بلاستومرهای جفت جنین ۲ سلولی و ۴ تایی جنین ۴ سلولی بر اساس قطر بلاستوسیست‌های حاصل، مورد ارزیابی قرار گرفتند و مشخص شد که هر دو بلاستومر مربوط به جنین‌های ۲ سلولی که هردو در یک قطره کشت قرار داده شدند، ظرفیت تکوینی یکسانی نشان دادند یعنی بلاستوسیست‌های مشتق از آن‌ها قطر مساوی داشتند (۴/۱ ± ۸۹/۶، n=۴۰) که نسبت به بلاستوسیست‌های کنترل تفاوت معنی‌داری نشان ندادند (۳/۱ ± ۹۸/۵، p<۰/۵، n=۴۰). این در حالی است که چهار بلاستومر از یک جنین ۴ سلولی پس از تکوین به بلاستوسیست، به‌صورت دو جفت با اندازه قطر متفاوت و معنی‌داری بوده و نسبت به کنترل نیز کمتر بوده و تفاوت معنی‌داری نشان دادند (۳/۸ ± ۶۹/۲ و ۴/۵ ± ۳۲/۱ ؛ p<۰/۵، n=۴۰). (شکل۳ ب،ج).



شکل۳: مقایسه ظرفیت تکوینی بلاستومرها. الف) مقایسه درصد بلاستوسیست‌های تکوین یافته از بلاستومرهای ۲ سلولی و ۴ سلولی. ب، ج) مقایسه قطر بلاستوسیست‌های مشتق از بلاستومرهای جفت جنین ۲ سلولی و چهارتایی جنین ۴ سلولی. بلاستومرهای ۴ سلولی از نظر اندازه دو جفت می‌باشند (P1 , P2) در حالی که بلاستومرهای جفت ۲ سلولی تفاوتی باهم نداشتند. نتایج به صورت Mean±SD نمایش داده شد. $*p<0.05$، $**p<0.01$. خط مقیاس: ۵۰µm

بررسی کیفیت بلاستوسیست‌ها بر اساس تعداد سلول‌های تشکیل دهنده ICM و TE

تعداد سلول‌ها در بلاستوسیست‌های تکوین یافته براساس رنگ آمیزی هسته سلول و نیز مارکر اختصاصی سلول‌های ICM شمارش شد. در این حالت هسته تمام سلول‌ها با DAPI که رنگ فلئورسنت آبی می‌باشد مشخص شد. درحالی‌که نشان‌گر اختصاصی بخش ICM یعنی OCT4، هم با رنگ آبی DAPI و هم با رنگ فلئورسنت سبز (FITC) مشخص بودند (شکل۴ الف). در این فرایند، ۴ پارامتر مورد نظر بود که عبارتند از: تعداد کل سلول‌ها (TCN)، سلول‌های TE، سلول‌های ICM و نسبت تعداد سلولهای ICM بر سلول‌های TE (ICM:TE). با توجه به آزمایشات انجام شده مشاهده گردید که TCN در بلاستوسیست‌های مشتق از بلاستومرهای ۲ سلولی و ۴ سلولی در تمام شرایط کشت نسبت به گروه کنترل یا همان جنین‌های Intact کاهش معنی‌داری نشان داد. تعداد سلول‌های ICM و TE در گروه ۴ سلولی و فقط TE در گروه ۲ سلولی در تمامی شرایط کشت نسبت به گروه کنترل کاهش نشان دادند، این در حالی است که در گروه ۲ سلولی، تعداد سلول‌های ICM حاصل از کشت بلاستومرهای منفرد در حالت کشت گروهی و هم‌کشتی با جنین، کاهش معنی‌داری نشان نداد ولی در حالت کشت منفرد کاهش معنی‌داری نشان داد (شکل۴ب و ج).



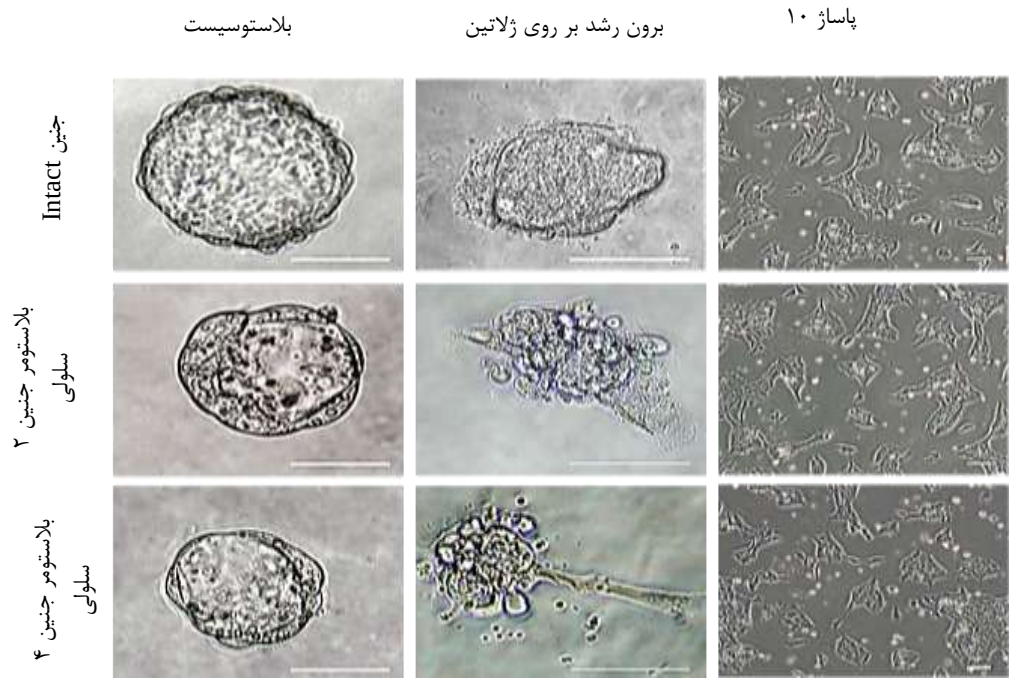
شکل۴: بررسی بیان نشانگر Oct4 و شمارش سلول. Oct4 نشانگر اختصاصی ناحیه ICM در بلاستوسیست می‌باشد که به‌روش ایمنی رنگ‌آمیزی شد و سلولهای مثبت نسبت به تمام سلول‌ها شمارش شدند (الف). پارامترهای مورد نظر شامل TCN (جمعیت کل سلول‌ها)، سلول‌های ICM، سلول‌های TE ب) و نیز نسبت ICM به TE (TCM:TE) (ج). نتایج به‌صورت Mean±SD نمایش داده شد. (د) تفاوت در نسبت تعداد سلول‌های ICM به TE برای هر گروه در مقایسه با گروه جنین‌های Intact. و نیز *p<۰/۰۵، **p<۰/۰۱، ***p<۰/۰۰۱. خط مقیاس: ۵۰µm

در بررسی پارامتر ICM:TE، مشاهده شد که بلاستوسیست‌های مشتق از بلاستومرهای۲ و ۴ سلولی که

در شرایط منفرد کشت داده شده بودند و نیز بلاستوسیست‌های مشتق از هم‌کشتی بلاستومرهای ۴ سلولی با جنین نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نشان دادند (*p<۰/۰۵ ، **p<۰/۰۱، ***p< ۰/۰۰۱) (شکل ۴ د). تفاوت بین بقیه گروه‌ها نسبت به‌یکدیگر نیز در این شکل نشان داده شده‌است.

تولید سلول‌های ES بر روی سطح پوشیده شده با ژلاتین

در مرحله بعد برای نشان دادن اینکه بلاستوسیست‌ها دارای کیفیت و عملکرد برای کاربرد را دارند، جهت تولید رده سلول‌های ES مورد استفاده قرار گرفتند. بعد از انتقال بلاستوسیست‌ها به محیط کشت اختصاصی ESC در ظروف پوشانده شده با ژلاتین، مشاهده شد که بعد از ۵ روز، به سطح ظروف چسبیدند و سلول‌های TE به‌طور کامل بر روی سطح گسترده شدند اما سلول‌های ناحیه ICM، به‌صورت تجمعات گنبدی شکل قابل تشخیص بودند (شکل۵).



شکل۵: تولید رده سلول‌های بنیادی جنینی از بلاستوسیست‌های مشتق از بلاستومرها. الف) مقایسه تکوین بلاستومرهای منفرد در محیط T6 و T6+R2i. آنالیز داده‌ها به‌وسیله آزمون (t) صورت گرفت. $p<0.05$. ب) جنین‌های Intact و بلاستومرهای جدا شده از جنین‌های ۲ سلولی و ۴ سلولی در قطره‌های ۱ میکرولیتری محیط T6+R2i کشت داده شدند و بعد از ۲/۵ روز به بلاستوسیست تکوین پیدا کردند. سپس بلاستوسیست‌ها به ظروف پوشیده شده با ژلاتین و حاوی محیط N2B27+R2i منتقل شدند و بعد از ۵ روز برون رشد سلول‌های ES مشاهده شد که این ساختارها تحت تیمار آنزیمی پاساژ داده شده و کلونی‌های ویژه سلول‌های بنیادی جنینی را تولید نمودند. خط مقیاس: ۵۰µm

این سلول‌ها بعد از اولین پاساژ، در محیط گسترده شده و تمام سطح ظرف کشت را پوشاندند (شکل۵). درصد بلاستوسیست‌های مشتق از بلاستومرهای ۲ سلولی، ۴ سلولی و جنین‌های ۲ سلولی به‌عنوان گروه کنترل به ترتیب برابر بود با ۶۳، ۲۷ و ۹۰ (جدول۲). بعد از این‌که بلاستوسیست‌ها به محیط کشت اختصاصی سلول‌های ES منتقل شدند، درصد بلاستوسیست‌هایی که برون‌رشد Out (growth) نشان داده بودند به‌ترتیب فوق برابر بودند با۵۸/۳، ۴۰ و ۱۰۰ (جدول۲) و از این تعداد نیز به‌ترتیب ۱۰۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد موارد تبدیل به سلول‌های ES شدند (جدول۲).

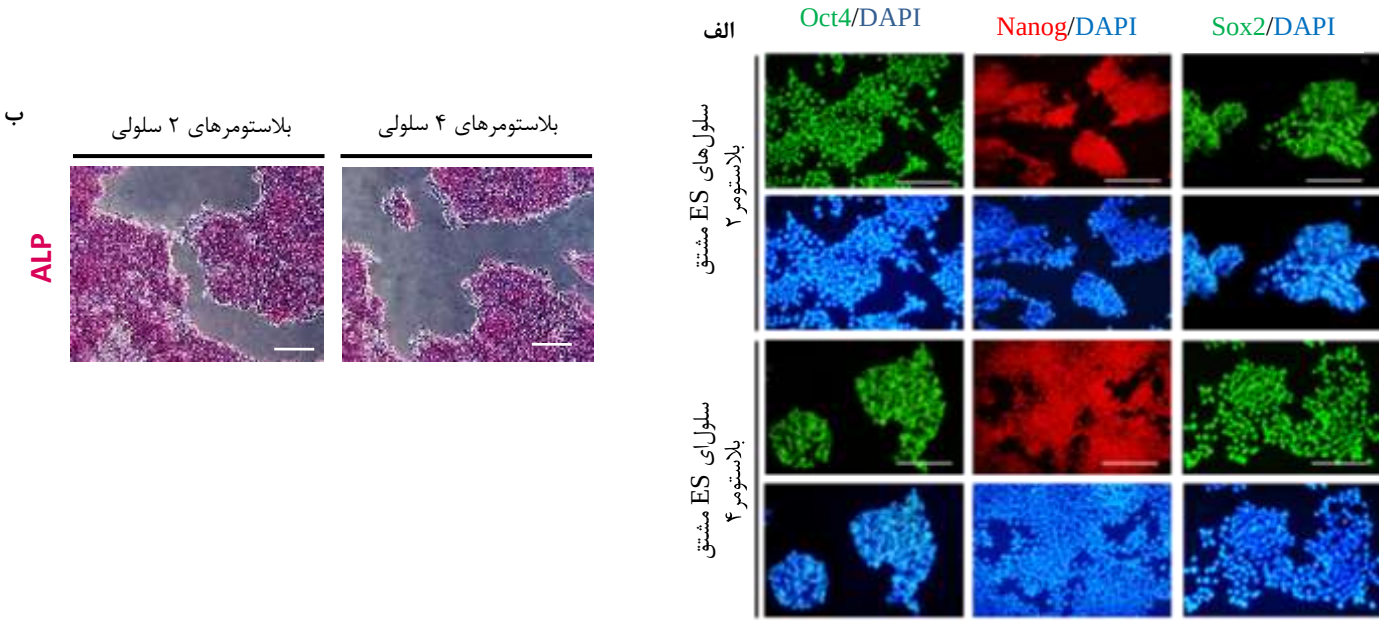
جدول۲: درصد بلاستوسیست‌های تکوین یافته از بلاستومرها و سلول‌های بنیادی جنینی تولید شده

SB/Embryo	NO	Culture volume (µl)	* BL rate (%)	Outgrowth (%)	Established ESC line (%)
Intact 2-cell	10	5	9/10 (90)	9/9 (100)	9/9 (100)
2-cell SB	38	1	24/38 (63.1)	14/24 (58.3)	14/14 (100)
4-cell SB	36	1	10/36 (27.7)	4/10 (40)	3/4 (75)

*BL: blastocyst

بیان نشانگرهای اختصاصی سلول‌های ES

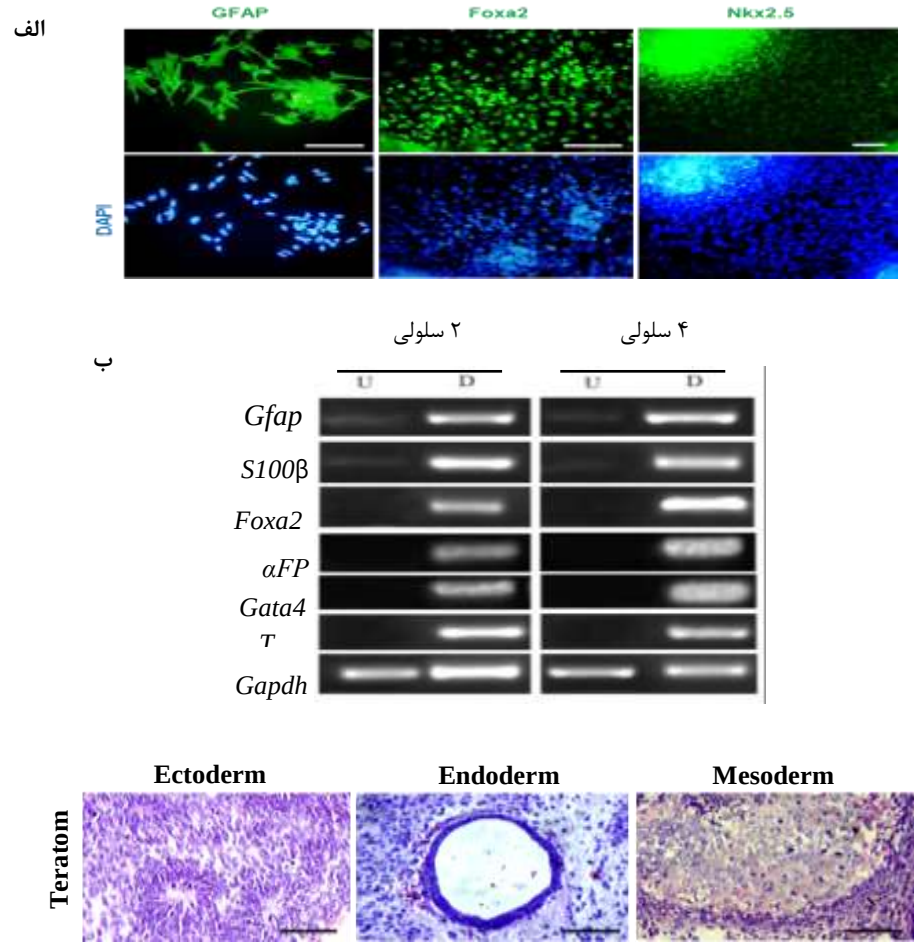
سلول‌های بنیادی جنینی همچنین تحت عنوان سلول‌های بنیادی پرتوان نامیده می‌شوند که ویژگی‌های بیان ژنی مختص خود را دارند. از جمله این ژن‌ها که در این مطالعه نیز بیان آن‌ها در سطح پروتئین مورد ارزیابی قرار گرفته است شامل Oct4، Nanog و Sox2 هستند و در شکل ۶ الف، نتیجه رنگ‌آمیزی به‌روش ایمونوسیتوشیمی این نشانگرهای پروتئینی داخل هسته‌ای نشان داده شده است که به‌واسطه رنگ‌های فلئورسنتی قرمز (Alexa Flour 568) و سبز (Alexa Fluor 488) مشخص می‌باشند. دیگر نشانگر اختصاصی سلول‌های بنیادی پرتوان، آلکالین فسفاتاز(ALP) می‌باشد که نتیجه رنگ‌آمیزی آن نیز مثبت بود (شکل۶ ب).



شکل۶: بررسی بیان نشانگرهای پرتوانی در سلول‌های ES. الف) نشانگرهای Oct4، Nanog و Sox2 جزو عوامل رونویسی داخل هسته‌ای می‌باشند که به‌روش ایمونوسیتوشیمی و با مواد فلئورسنت سبز(Alexa Flour 488) و قرمز (Alexa Flour 568) کونژوگه شده با آنتی‌بادی، رنگ‌آمیزی شدند. رنگ آبی فلئورسنت اختصاصی برای هسته سلول، به‌وسیله DAPI برای رنگ‌آمیزی زمینه استفاده شد. ب) الکالین‌فسفاتاز یکی دیگر از نشانگرهای اختصاصی در این سلول‌ها می‌باشد که با استفاده از کیت مخصوص رنگ‌آمیزی شده و به‌رنگ ارغوانی مشخص می‌باشد. خط مقیاس: ۵۰µm

بیان نشانگرهای تمایزی پس از القای تمایز در سلول‌های ES در شرایط in vivo

سلول‌های ES بعد از القای تمایز به دودمان‌های اکتودرمی، اندودرمی و مزودرمی، از نظر مورفولوژی و بیان نشانگرهای تمایزی مورد ارزیابی قرار گرفتند و با استفاده از روش ایمونوسیتوشیمی، نشانگرهای اختصاصی برای این سلول‌ها به‌ترتیب فوق شامل GFAP، Foxa2 وNkx2.5 رنگ‌آمیزی شدند و همگی با رنگ فلئورسنت سبز (Alexa Fluor 488) مشخص می‌باشند (شکل۷ الف). برای ارزیابی بیان ژن در سطح mRNA، از روش RT-PCR نیز استفاده شد که نشانگرهای gfap و S100β (برای آستروسیت)، T و Gata4 (برای مزودرم) و ژن‌های Foxa2 و αFP (برای اندودرم) برای این منظور مورد بررسی قرار گرفتند (شکل۷ ب).



شکل۷: بررسی ظرفیت تمایزی سلول‌های ES. الف) نشانگرهای GFAP، Foxa2 و Nkx2.5 به‌ترتیب برای دودمان‌های اکتودرمی-عصبی، اندودرمی و مزودرمی-قلبی مورد بررسی قرار گرفتند که با ماده فلئورسنت سبز (Alexa Flour 488) کونژوگه شده با آنتی‌بادی، رنگ آمیزی شده و در شکل، مشخص می‌باشند. رنگ آبی فلئورسنت اختصاصی برای هسته سلول، به‌وسیله DAPI برای رنگ‌آمیزی زمینه استفاده شد. ب) بیان ژن‌های ویژه تمایزی برای سه دودمان اصلی جنینی در سطح mRNA مورد ارزیابی قرار گرفتند. Gfap و S100β برای آستروسیت (اکتودرم)، Foxa2 و αFP برای اندودرم و Gata4 و T برای پیش ساز عضله قلبی (مزودرم) مورد نظر بودند. Gapdh به‌عنوان کنترل داخلی ارزیابی شد. U: غیر تمایز یافته، D: تمایز یافته. ج) الکالین‌فسفاتاز یکی دیگر از نشانگرهای اختصاصی در این سلول‌ها می‌باشد که با استفاده از کیت مخصوص رنگ آمیزی شده و به‌رنگ ارغوانی مشخص می‌باشد. خط مقیاس: ۵۰µm

تمایز سلول‌های بنیادی جنینی تولید شده در شرایط in vivo و تشکیل تراتوما

سلول‌ها با غلظت ۱۰ میلیون در میلی‌لیتر در ناحیه زیر پوست موش Nude که فاقد سیستم ایمنی فعال بود تزریق شدند. پس از ۲۰ روز تورم زیر پوست نشان‌دهنده تشکیل تراتوما بود که حاوی سلول‌های بنیادی پرتوان و سلول‌های تمایز یافته از هر سه دودمان اکتودرمی، مزودرمی و اندودرمی بود. در شکل۷ ج، ساختارهای اکتودرمی (Neural rosette)، مزودرمی (Cartilage) و اندودرمی (Gastrointestinal tract) نشان داده شده است.

بحث

در این مطالعه، نتایج به‌دست آمده نشان دادند که کشت بلاستومرهای ۲ سلولی و ۴ سلولی موش در محیط کشت T6 با حجم ۱ میکرولیتر صورت گرفت که بسیار کمتر از روش‌های معمول می‌باشد تکوین آن‌ها به بلاستوسیست را میسر می‌کند. در مطالعات پیشین کشت بلاستومر بیشتر با هدف تولید سلول‌های بنیادی جنینی و نیز با کمک لایه سلولی تغذیه کننده انجام می‌شد (۱۴، ۲۲-۲۰). گروهی از محققین نیز توانایی و پتانسیل تکوینی بلاستومرها را در شرایط in vivo و نیز در شرایط in vitro مورد بررسی قرار داده‌اند که قابل بحث می‌باشد. یکی از اولین کارهایی که نشان داد که یک یا چندین بلاستومر کنار هم قادر هستند یک بلاستوسیست را ایجاد کنند مطالعه تارکووسکی در سال ۱۹۵۹ بود (۳). این محقق چنین نشان داد که اگر در مرحله ۲ سلولی یا ۴ سلولی جنین موش، نیمی از جمعیت بلاستومرها باقی بماند قادر هستند تا یک بلاستوسیست کامل هر چند با اندازه کوچک را ایجاد کنند. همچنین وی بلاستوسیست‌های تشکیل شده درون زوناپلوسیدا را به رحم موش ماده آماده حاملگی انتقال داد و تشکیل جفت و حتی جنین زایی تا مرحله تولد را مشاهده کرد. اما بازدهی این مطالعه بسیار پایین بود و دلیل این مساله جمعیت کم سلول‌های بلاستوسیست مشتق از بلاستومر منفرد بود. بنابراین در این مطالعه قصد بر این بود که روشی اتخاذ کنیم تا تکوین و تشکیل بلاستوسیست از بلاستومر منفرد هم از نظر کمیت در قالب درصد بلاستوسیست‌ها و هم از نظر کیفیت در قالب تعداد سلول‌های ICM و TE افزایش یابد. برای مشخص شدن این‌که عوامل ترشحی اتوکراین و پاراکراین تا چه حد می‌توانند بر فرایند تکوین تاثیر مثبت داشته باشند، کشت بلاستومرها در سه وضعیت متفاوت انجام شد که عبارتنداز: کشت منفرد، کشت گروهی (دو بلاستومر در یک قطره) و هم‌کشتی با جنین Intact. این آزمون نشان داد که هرچه تجمع فاکتورهای اتوکراین (در حجم کمتر) و پاراکراین (کشت گروهی و هم‌کشتی با جنین) بیشتر باشد سرعت و کیفیت تکوین بلاستومرها و نیز درصد تشکیل آن‌ها نیز بیشتر می‌شود (شکل۲). طراحی چنین آزمایشی بر اساس مطالعات پیشین در گذشته بود که تاثیر مثبت عوامل اتوکراین و پاراکراین بر تکوین جنین را نشان داده بودند. در سال ۲۰۱۲ نشان داده شد که وقتی به محیط کشت جنین‌های پیش از لانه‌گزینی انسان، تعدادی از عوامل رشد و نموی که جزو عوامل اتوکراین/پاراکراین می‌باشند اضافه شود، تکوین جنین‌ها با سرعت و کیفیت بالایی پیش می‌رود (۴). در مورد جنین‌های گاو نیز ثابت شده است که برهم‌کنش‌های اتوکراین و پاراکراینی بین جنین‌های پیش از لانه‌گزینی، سرعت و کمیت تکوین آن‌ها را افزایش داده است (۷). این بررسی به این شکل بوده که حضور بیش از یک جنین در محیط، می‌توانست نتایج بهتری در مقایسه با نبود آن‌ها نشان دهد. در مطالعه حاضر نیز، اولین ایده‌ی مشابه و مهمی که مطرح می‌شود، کاهش حجم محیط کشت و یا افزایش تعداد جنین یا بلاستومر در حجم مشخصی برای تجمع سریع و بیشتر عوامل ترشحی می‌باشد و تاکید اصلی مطالعات فوق بر این مبنا بوده است. به‌علاوه ثابت شده است که اگر تعداد جنین در یک حجم مشخص افزایش یابد باعث بهبود تکوین جنین خواهد شد (۷ و ۲۴). اما این درحالی است که تا به‌حال، هیچ مطالعه‌ای، تکوین بلاستومرهای منفرد در وضعیت‌های کشت مختلف شامل حالت منفرد، گروهی و هم‌کشتی با جنین و با تاکید بر تاثیر عوامل اتوکراین و پاراکراین بررسی نکرده و

گزارش نداده است. طراحی آزمایشی که در مطالعه حاضر صورت گرفت، به‌خوبی نشان داد که بلاستومرهای منفرد به تنهایی دارای فعالیت پیام‌رسانی به‌صورت ترشح عوامل پیام‌دهنده می‌باشند که این عوامل می‌توانند به‌صورت اتوکراین بر روی خود سلول اثر کرده و مسیرهای سیگنال دهنده داخل سلول را به‌نفع تقویت چرخه سلولی و تکثیر، فعال می‌کنند و به پیشروی تکوین آن کمک می‌نمایند و این واقعیت در اولین بررسی یعنی مقایسه تاثیر حجم های ۱ و ۵ میکرولیتری به‌وضوح نشان داده شد. تایید بیشتر بر این موضوع این بود که در حالت دو بلاستومر در یک قطره یا هم‌کشتی بلاستومر با جنین نتایج به‌مراتب بهتری مشاهده شد. هرچند ایده تاثیر اتوکراینی و پاراکراینی قبلا در مورد جنین‌های Intact نشان داده شده است (۷،۱۷،۲۳) اما نقطه قوت مطالعه ما این بود که نتایج نشان داد علاوه بر اینکه کمیت تکوین بلاستومرها با غلظت بالای فاکتورهای ترشحی، افزایش می‌یابد بلکه کیفیت تکوین در قالب افزایش جمعیت سلول‌های بلاستوسیست به‌خصوص سلول‌های ICM نیز مشاهده می‌شود. فراهم نمودن چنین شرایطی این امکان را ایجاد کرد که مقایسه ظرفیت تکوینی بلاستومرهای ۲ سلولی و ۴ سلولی نیز به‌طور دقیق قابل انجام باشد. توضیح بیشتر این‌که لازم بود تا هر دو بلاستومر جدا شده از جنین ۲ سلولی و یا ۴ بلاستومر جدا شده از جنین ۴ سلولی در شرایط مشابه کشت، تکوین یافته تا وضعیت تکوینی آن‌ها مورد ارزیابی قرار گیرد. . این بررسی به این صورت بود که تعداد بلاستوسیست‌های تکوین یافته از بلاستومرهای هر جنین ۲ سلولی یا ۴ سلولی مورد نظر قرار گرفته و قطر آن‌ها با یکدیگر مقایسه شد. آن‌چه که قابل انتظار و بدیهی بود، بلاستومرهای ۲ سلولی دارای ظرفیت تکوینی بالایی بودند چون طبق داده‌های ما درصد بالایی از بلاستوسیست‌های تکوین یافته را نشان دادند و نیز قطر هر دو بلاستوسیست مشتق از جفت بلاستومر ۲ سلولی یکسان بود و این نتیجه، طبق مطالعه اخیر که در مورد بلاستومرهای ۲ سلولی گزارش شده هم‌خوانی دارد (۱۷).

طی مطالعه‌ای بر روی مراحل مختلف تکوین جنین‌های پیش از لانه‌گزینی موش صورت گرفت، الگوی بیان ژنی بین بلاستومرهای ۲ سلولی و ۴ سلولی تفاوت جزئی نشان داد (۱۸). این تفاوت جزئی، در مطالعه ما، در قالب تفاوت در کمیت و کیفیت تکوین به بلاستوسیست خود را نشان داد. در مورد بلاستومرهای جنین‌های ۴ سلولی مشاهده شد که از نظر اندازه و قطر بلاستوسیست حاصل، به دو جفت تقسیم می‌شوند که یک جفت آن اندازه کوچکتری داشتند. به نظر می‌رسد که تکوین این بلاستومرها احتمالا فقط به‌صورت گروهی یا هم‌کشتی با جنین امکان‌پذیر باشد و در شرایط منفرد امکانپذیر نباشد که شاید بتوان گفت پایین بودن درصد بلاستوسیست‌های تکوین یافته حاصل از بلاستومرهای منفرد ۴ سلولی در بررسی‌های ابتدایی مطالعه به این خاطر بوده است. این واقعیت که بلاستومرهای ۴ سلولی درصد پایینی در تکوین به بلاستوسیست را نشان دادند احتمالا به این دلیل است که فقط دو عدد از بلاستومرهای جنین ۴ سلولی به‌خاطر این‌که ماهیت قطب جانوی دارند یعنی تماما در تشکیل جنین شرکت می‌کنند، تکوین بهتری نشان می‌دهند. سومین بلاستومر، جانوری-گیاهی بوده و چهارمین به‌طور کامل گیاهی می‌باشد. دو بلاستومر آخر طبیعتا ظرفیت محدودی دارند. این مساله تاحدودی قابل انتظار بود چون در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۵ صورت گرفت این واقیت به‌وضوح در شرایط In vivo به اثبات رسیده است (۱۹). در حقیقت امر، طراحی آزمایش در تجربه ما، این مساله را به طریقی ساده‌ترکه بدون مداخله پارامترهایی دیگر از جمله تاثیر سلول‌های مجاور یا دورتر می‌باشد بیان نمود.

در قدم بعدی نشان دادیم که بلاستوسیست‌هایی که از بلاستومرهای منفرد تکوین پیدا می‌کنند قابلیت تبدیل شدن به رده سلول‌های بنیادی را دارند. مهم‌ترین نکته از این مرحله از مطالعه، استفاده از کوچک مولکول‌های SB431542 و PD0325901 تحت عنوان R2i می‌باشد که به‌ترتیب مسیرهای سیگنال سلولی TGF-β و Erk1/2 را

مهار می‌کنند. در سال ۲۰۱۲ طی مطالعه‌ای نشان داده شد که فعال نمودن مسیر سیگنالی TGF-β باعث سرعت بخشی به فرایند تمایز می‌شود (۲۳). مطالعات دیگری در این مورد نشان دادند که مسیر TGF-β علاوه براینکه باعث توقف چرخه سلولی می‌شود که متعاقب آن، سلول می‌تواند وارد تمایز می‌شود، همچنین باعث فعال شدن مسیر آپوپتوزیس نیز می‌شود (۲۴،۲۵). بنابراین چنین نتیجه‌گیری می‌شود که مهار این مسیر سیگنالی، هم به ادامه تکوین جنین سرعت می‌بخشد و هم مانع از توقف چرخه سلولی در بلاستومرها می‌شود. مسیر MAPK یکی دیگر از مسیرهای سیگنالی می‌باشد که بر رفتارهای مختلف سلولی از جمله آپوپتوزیس، تکثیر، تمایز و تکوین جنینی تاثیر نشان می‌دهد (۱۷). مسیر سیگنالی MAPK، انشعابات متفاوتی دارد که هرکدام موارد بالا را وساطت می‌کنند اما یکی از مهم‌ترین انشعابات این مسیر، MAPK/ERK1 می‌باشد که سطح بیان آن در تخمک لقاح نیافته بسیار پایین است ولی از مرحله زایگوت تا مرحله بلاستوسیست به‌تدریج رو به افزایش است، به‌ویژه در مرحله ۲ سلولی که ژن‌های زایگوتی شروع به بیان می‌کنند، افزایش ناگهانی نشان می‌دهد (۱۹و۱۸). این مطالعات ثابت می‌کنند که این مسیر می‌تواند تاثیرات مثبتی بر روند تکوین جنین داشته باشد. در مغایرت با این مطالعات، شواهدی نیز ثابت کرده‌اند که مسیر MAPK/ERK1 می‌تواند باعث توقف چرخه سلولی و یا آپوپتوزیس شود (۲۰). به‌علاوه مطالب فوق، اخیرا محققین پژوهشگاه رویان ثابت کرده‌اند که مهار کردن دو مسیر سیگنالی فوق (TGF-β و MAPK/ ERK1) یعنی استفاده از R2i، باعث متیلاسیون بیشینه در سلول‌های ES شده که مشخص ترین نتیجه این متیلاسیون، مهار تقریبا تمام ژن‌های تمایزی می‌باشد (۱۵). در مطالعه مذکور، برای اطمینان از صحت این نتیجه، یکی از مهم‌ترین عوامل متیلاسیون به نام متیل-ترانسفراز RG108، مهار شد و مشاهده شد که در چنین شرایطی، تاثیر قبلی R2i مشاهده نشد و بازدهی تولید سلول‌های ES کاهش پیدا کرد.

نتیجه‌گیری

آنچه که به‌عنوان نتیجه‌گیری نهایی می‌توان به آن اشاره کرد موفقیت این مطالعه در خصوص شفاف سازی و نحوه بررسی ظرفیت تکوینی بلاستومرهای ۲ سلولی و ۴ سلولی به‌طور مقایسه‌ای بود که در سه شرایط کشت منفرد، گروهی و هم کشتی با جنین انجام گرفت. این شرایط کشت، تاثیر و اهمیت عوامل ترشحی اتوکراین و پاراکراین را مشخص می‌کنند که درصد موفقیت هم از نظر کمی (درصد تشکیل) و هم از نظر کیفی (تعداد سلول) به‌ترتیب در سه شرایط مختلف که مطرح شد بیشتر می‌شود. مهم‌تر این‌که در میان نتایج به‌دست آمده، توانایی یک سلول منفرد در تولید عوامل اتوکراین و بهره‌گیری از آن‌ها در فعال نمودن و تنظیم مسیرهای سیگنالی در جهت مسیر رشد و نموی نشان داده شد. در زمینه تولید سلول‌های ES، می‌توان یک ادعا مبنی بر این باشد که ما در این مطالعه توانستیم سلول‌های بنیادی جنینی را از بلاستومرهای منفرد ۲ سلولی و ۴ سلولی و بدون لایه تغذیه کننده تولید کنیم که برتری نسبی در مقایسه با سایر مطالعات نشان می‌دهد و این دستاورد می‌تواند در مورد گونه‌های دیگر جانوری و یا حتی انسان داشته باشد که تولید سلول‌های بنیادی جنینی انسانی در شرایط بدون سلول‌های تغذیه کننده، یک مزیت خوب و در عین حال یک چالش جدی محسوب می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از عوامل و کادر محترم دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی تشکر به‌عمل می‌آید. همچنین به‌طور ویژه از جناب آقای دکتر حسین بهاروند و سرکار خانم دکتر نفیسه حسنی از پژوهشگاه رویان تهران جهت هماهنگی برای استفاده از امکانات و تجهیزات نهایت قدردانی را داریم.

منابع

1. Gilbert SF. Birds and mammals early development and axis formation. Developmental biology.9th Ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. 2010; 300-310.

2. Sadler TW. Gametogenesis: Conversión of germ cells into male and female gametes. Langman's medical embryology. 13th Ed. Philadelphia: Williams & Wilkins; 2015; 18-29.

3. Tarkowski AK. Experiments on the development of isolated blastomers of mouse eggs. Nat. 1959; 7-12.

4. Rossant J. Postimplantation development of blastomeres isolated from 4- and 8-cell mouse eggs. J Embryol Exp Morphol. 1976; 36(2): 90-99.

5. Kelly SJ. Studies of the developmental potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres. J Exp Zool. 1977; 20(3): 69-77.

6. Gandolfi F. Autocrine, paracrine and environmental factors influencing embryonic development from zygote to blastocyst. Therio. 1994; 4(1): 95-100.

7. Gopichandran N, Leese HJ. The effect of paracrine/autocrine interactions on the in vitro culture of bovine preimplantation embryos. Reprod. 2006; 131(2): 69-77.

8. Hasegawa K, Pomeroy JE, Pera MF. Current technology for the derivation of pluripotent stem cell lines from human embryos. Cell stem cell. 2010; 6(6): 521-31.

9. Hug K. Sources of human embryos for the stem cell research: ethical problems and their possible solutions. Medicina J. 2005; 41(12): 1002-1010.

10. Sivarama MAF, Noor SNM. Ethics of embryonic stem cell research according to Buddhist, Hindu, Catholic, and Islamic religions: perspective from Malaysia. Asi Biomed. 2014; 8(1): 43-52.

11. Hassani SN, Asgari B, Taei A, Baharvand H. Suppression of transforming growth factor beta signaling promotes ground state pluripotency from single blastomeres. Hum Reprod. 2014; 29(8): 1739-48.

12. Fischbach GD, Fischbach RL. Stem cells: science, policy, and ethics. 2004; 114(10): 1364-1370.

13. Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu SJ, Lanza R. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. Nature. 2008; 444(7118): 481-5.

14. Geens M, Mateizel I, Sermon K, De Rycke M, et al. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres of two 4-cell stage embryos. Hum Reprod. 2009; 24(11): 2709-17.

15. Totonchi M, Hassani SN, Sharifi-Zarchi A, Tapia N, et al. Blockage of the Epithelial-to-Mesenchymal Transition Is Required for Embryonic Stem Cell Derivation. Stem cell reports. 2017;9(4):1275-90.

16. Caro CM, Trounson A. Successful fertilization, embryo development, and pregnancy in human in vitro fertilization (IVF) using a chemically defined culture medium containing no protein. J In Vitro Fert Embryo Transf. 1986; 3(4): 7-12.

17. Casser E, Israel S, Witten A, Schulte K, et al. Totipotency segregates between the sister blastomeres of two-cell stage mouse embryos. Sci Repo. 2017;7(1): 82-99.

18. Fernando H, Biase XC, Sheng Z. Cell fate inclination within 2-cell and 4-cell

mouse embryos revealed by single-cell RNA sequencing. Genome Research. 2014; 24(11): 17-29

19. Piotrowska Nitsche K, Perea Gomez A, Haraguchi S, Zernicka-Goetz M. Four-cell stage mouse blastomeres have different developmental properties. Dev. 2005; 132(3): 479-90.

20. Gonzalez S, Ibanez E, Santalo J. Establishment of mouse embryonic stem cells from isolated blastomeres and whole embryos using three derivation methods. J Ass. Reprod gen. 2010; 27(12): 67-82.

21. Lorthongpanich C, Yang SH, Piotrowska-Nitsche K, Parnpai R, et al. Development of single mouse blastomeres into blastocysts, outgrowths and the establishment of embryonic stem cells blastomeres. Reproduction. 2008;135(6): 805-13.

22. Suwinska A, Czolowska R, Ozdzenski W, Tarkowski AK. Blastomeres of the mouse embryo lose totipotency after the fifth cleavage division: expression of Cdx2 and Oct4 and developmental potential of inner and outer blastomeres of 16- and 32-cell embryos. Dev Biol. 2008; 322(1): 133-44.

23. Kawamura K, Chen Y, Shu Y, Cheng Y, et al. Promotion of human early embryonic development and blastocyst outgrowth in vitro using autocrine/paracrine growth factors. PloS one. 2012; 7(11): 81-93.

24. O'Neill C. Evidence for the requirement of autocrine growth factors for development of mouse preimplantation embryos in vitro. Biol reprod. 1997; 56(1): 29-37.

25. Casser E, Israel S, Witten A, Schulte K, et al. Totipotency segregates between the sister blastomeres of two-cell stage mouse embryos. Sci Repo. 2017;7(1): 82-99.

26. Piotrowska-Nitsche K, Perea-Gomez A, Haraguchi S, Zernicka-Goetz M. Four-cell stage mouse blastomeres have different developmental properties. Dev. 2005; 132(3): 479-90.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Autumn 2018; 9(3)

Original Article

Development of single blastomeres isolated from mouse 2-celled and 4-celled embryo into blastocysts for the isolation and production of embryonic stem cells without using feeder cells

Yekani F, Ph.D.*, Azarnia M, Ph.D.

- Department of animal biology, Faculty of biological sciences. Kharazmi university, Tehran, Iran

* Email corresponding author: yekani.farshid@gmail.com

Received: 5 Sep. 2018 Accepted: 4 Dec. 2018

Abstract

Aim: The main goal of this study is to determine optimum conditions for mouse 2-celled and 4-celled single blastomeres for high-qualified development into a blastocyst and the production of embryonic stem cells (ESCs) from these blastocysts without the presence of feeder cells.

Material and methods: At first step, 2 and 4-celled embryos were collected from oviducts. Blastomeres were isolated and cultured in 1 and 5µl of medium in the conditions single, group and with intact embryos. Then, the resultant blastocysts were cultured on gelatin-coated dishes for ESCs production. The expression of specific markers for both blastocysts and ESCs were analyzed with immunocytochemistry and PCR.

Results: The results revealed that the volume 1µl was better than 5µl and co-culture with embryos and group culture significantly better supported blastocyst development than single culture. Based on Oct4 expression in the ICM of blastocysts, cell count was performed and also showed significant increase in blastocyst quality. We also demonstrated that 4-celled blastomeres not only have heterogeneity in the potential of development among them, but also have lower potential than 2-celled blastomeres. Finally, it was also shown that, single culture derived-blastocysts could generate embryonic stem cells in the specific medium and these cells showed the differentiation potential into different cells.

Conclusion: The method of the present study for the evaluation of single blastomeres developmental potential and the production of ESCs can be used for other species. The production of ESCs without feeder cells in human is an important and big challenge.

Keywords: blastocyst, co-culture, 2 and 4-celled embryos, group culture, single blastomeres