14(2) 267-276, Summer 2022

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Generation of induced pluripotent stem cells from peripheral blood cells using small molecules

Javad Kazemi [1], Hosein Shahsavarani [2, 3*], Parviz Pakzad [1], Mohammadali Shokrgozar [2,4*]

[1]Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Department of Cell and Molecular Sciences, Faculty of Life Science and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran، Iran
[3]Laboratory of Regenerative Medicine and Biomedical Innovation, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
[4]Department of National Cell Bank, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Key Words

Induced pluripotent stem cells
Mouse embryonic fibroblasts
Chemical small molecule compounds
Blood cells

Abstract

Introduction: Generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) using safe and non-viral methods play pivotal role in tissue engineering and regenerative medicine. In current study, we aimed to generate iPSCs from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in the presence of different small molecule and chemical compounds.

Materials & methods: PBMCs were isolated using Ficoll gradient method and their proliferation was induced by lipopolysaccharide (LPS). Reprogramming of extracted PBMCs was mediated using a combination of small molecule such as 5-Azacitidine, Kenpaullone, sodium butyrate and RepSox, which are generally epigenetic modulator of genes (OCT4, Sox2, Klf4, c-Myc) involved on pluripotent cell. Then, resulted pluripotent stem cells were cultured and identified on feeder MEFs.

Results: LPS effectively caused an increase in the number of PMBCs after 5 hours. Blood cells were successfully converted to iPSCs after treatment with different chemical compounds and small molecules for 14 days and then transferred on supportive mouse embryonic fibroblasts.

Conclusion: The use of small molecules is a safe and cost-effective method for generating iPSCs from PBMCs. Mouse embryonic fibroblasts serve as a feeder layer for production of growth factors and preserving pluripotency of stem cells.

* Corresponding Authors email: hosein.shahsavarani@gmail.com , mashokrgozar@pasteur.ac.ir
Received: 27 April 2021; Reviewed: 5 June 2021; Revised: 26 July 2021; Accepted: 5 September 2021
(DOI): 110.22034/AEJ.2021.297827.2595

مقاله پژوهشی

تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی از سلول‌های خون محیطی با استفاده از ریزمولکول‌ها

جواد کاظمی[۱]، حسین شاهسوارانی[۲،۳*]، پرویز پاکزاد[۱]، محمد علی شکرگزار[۳،۴*]

[۱] گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۲] گروه زیست شناسی سلول و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
[۳] آزمایشگاه طب بازساختی و نوآوری‌های زیست پزشکی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
[٤] گروه بانک سلولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

کلمات کلیدی

سلول‌های بنیادی پرتوان القایی
فیبروبلاست جنین موش
ترکیبات ریزمولکول‌ها شیمیایی
سلول‌های خونی

چکیده

مقدمه: تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی با استفاده از روش‌های ایمن و غیرویروسی نقش به‌سزایی در مهندسی بافت و طب بازساختی دارد. در این تحقیق سعی شد تا سلول‌های بنیادی پرتوان القایی را در حضور انواعی از ریزمولکول‌های شیمیایی از سلول‌های خون محیطی تولید نمود.

مواد و روش‌ها: سلول‌های تک‌هسته‌ای خونی با استفاده از روش فایکول جداسازی و تکثیر آن‌ها توسط لیپوپلی ساکارید القاء گردید. بازبرنامه‌ریزی لنفوسیت‌های استخراج شده با استفاده ازترکیبی از ریزمولکول‌ها مانندآزاسیتیدین، سدیم بوتیرات، کنپائولون و رپساکس که عمدتاً مدولاتورهای اپی‌ژنتیکی موثر بر ژن‌های دخیل در پرتوانی (Oct4، Sox2، Klf4، C-Myc) صورت پذیرفت. در ادامه سلول‌های بنیادی پرتوان القایی حاصله بر روی لایه تغذیه کننده فیبروبلاست جنین موش انتقال داده شده و مورد شناسایی قرار گرفتند.

نتایج: لیپوپلی ساکارید به‌طور چشمگیری منجر به افزایش تعداد سلول‌های خونی تک هسته‌ای بعد از ٥ ساعت گردید. سلول‌های خونی پس از ١٤ روز تیمار با ترکیبات شیمیایی و ریزمولکول‌های مورد نظر به‌طور موفقیت‌آمیزی به سلول‌های بنیادی پرتوان القایی تبدیل شدند و سپس جهت تکثیر و حفظ خاصیت پرتوانی بر روی محیط حمایتی فیبروبلاست جنین موش قرار گرفتند.

بحث و نتیجه‌گیری: استفاده از ترکیبات شیمیایی و ریزمولکول‌ها روش ایمن و ارزان برای تولید موثر سلول‌های بنیادی پرتوان القایی از سلول‌های خونی می‌باشد و به‌کارگیری فیبروبلاست جنین موش به‌عنوان لایه تغذیه‌کننده فاکتورهای رشد مورد نیاز جهت حفظ حالت پرتوانی را تولید می‌کند.

* پست الکترونیکی نویسندگان مسئول: hosein.shahsavarani@gmail.com و mashokrgozar@pasteur.ac.ir

تاریخ دریافت: ۷ اردیبهشت ۱٤۰۰؛ تاریخ داوری: ۱۵ خرداد ۱٤۰۰؛ تاریخ اصلاح: ٤ مرداد ۱٤۰۰؛ تاریخ پذیرش: ۱٤ شهریور ۱٤۰۰
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.297827.2595

مقدمه

سلول‌های بنیادی توانایی خودنوزایی نامحدودی داشته و به انواعی از سلول‌های بدن با منشاء جنینی (اندودرم، اکتودرم و مزودرم)، تمایز می‌یابند(۱، ۲، ۳). به‌همین منظور، این سلول‌ها نقش مهمی در درمان انواعی از بیماری‌ها ازجمله سرطان، بیماری‌های قلبی، دیابت، ترمیم بافت‌های آسیب‌دیده، و اختلالات خود ایمنی دارند. با توجه به‌اهمیت این سلول‌ها در زمینه پزشکی بازساختی و مهندسی بافت‌ها، ایجاد یک محیط مناسب و مغذی جهت حفظ و القاء هدف‌مند آن‌ها بسیار ارزشمند می‌باشد(۴). فیبروبلاست‌ها سلول‌های مزانشیمی هستند که در تمام بافت‌های بدن وجود داشته و نقش مهمی در ترمیم آسیب‌های بافتی ایفاء می‌کنند (۵، ۶). این سلول‌ها دارای خاصیت چند توانی بوده و قادر به بازگرداندن مجدد بخش‌های سلولی از دست رفته می باشند. البته رشد بیش از حد فیبروبلاست‌ها و تولید محصولات ماتریکس ترشحی آن‌ها منجر به گسترش انواع بیماری‌های فیبروتیک انسانی می‌گردد (۷). جنین‌ها منبع غنی از فیبروبلاست‌ها بوده و فیبروبلاست‌های جنینی موش (MEFs) اغلب به‌عنوان یک منبع غنی برای رشد و تکثیر انواعی از سلول‌های بنیادی، به‌ویژه سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (iPSCs) و جنینی (ESCs)، کاربرد دارند. فیبروبلاست‌های جنینی موش به‌طور معمول پس از برداشتن سر، دم، بافت‌ها و اندام‌های داخلی، با تریپسینه کردن و سپس کشت آن‌ها تهیه می‌شود (۸، ۹، ۱۰). کشت‌هایی که پس از چند پاساژ به‌وجود می‌آیند اغلب به‌طور عمده جمعیت‌های همگن در نظر گرفته می‌شوند. اعتقاد بر این است که MEF در پاسخ به عوامل میتوژنیک در سرم که از دگرانولاسیون پلاکت ناشی از انعقاد خون ایجاد می‌شود، تکثیر می‌یابد. ازجمله فاکتورهای رشدی که از ترشحات پلاکت شناسایی شده‌اند می‌توان به فاکتور رشد ترانسفرم کننده β1 (TGF-β1)، فاکتور رشد مشتق از پلاکت-β (PDFG-β)، آنژیوپویتین ۱، پروتئین ECM-1 و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) اشاره کرد (۱۲). تصور می‌شود چندین مورد از این فاکتور رشد نقش مهمی در تکثیر فیبروبلاست‌های استرومایی تومور دارند (۱۱). مطالعات قبلی بر روی موش‌های تراریخته‌ای که پروتئین فلورسنت سبز (GFP) را تحت کنترل یک قطعه از منطقه پروموتر VEGF-A بیان می‌کنند، انجام شده است. سلول‌های GFP مثبتی که به تومورهای کاشته شده در موش‌های تراریخته نفوذ می‌کنند به‌عنوان فیبروبلاست شناسایی شدند و مشخص شد که سلول‌های MEF جدا شده از جنین موش تراریخته، سلول‌های GFP مثبت و GFP منفی را ایجاد می‌کنند. کشت MEF از جمعیت بسیار ناهمگونی از انواع سلول‌های متمایز تشکیل شده است. به‌طورکلی، سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی پرتوان القایی انسان تحت شرایط متغیر قابل کشت هستند (۴). با این‌حال، ایجاد یک سیستم موثر برای کشت این سلول‌ها آسان نیست. از آن‌جاکه شرایط کشت می‌تواند بیان ژن را تحت تأثیر قرار دهد که پرتوانی بالقوه‌ای را در hESC و hiPSC ایجاد می‌کند، بهینه‌سازی و استانداردسازی روش کشت بسیار مهم است. تولید رده‌های hESC برای اولین بار با استفاده از MEF به‌عنوان سلول‌های لایه تغذیه کننده (Feeder layer cells) و محیط کشت حاوی سرم گاو جنین (FBS) توصیف شد (۱۳). بعدها، FBS با KSR (Knockout serum replacement) و FGF2 جایگزین شد، که باعث افزایش تکثیر hESCs می‌شود (۱۴). در نهایت، سیستم‌های کشت فاقد تغذیه‌کننده (Feeder-free culture systems)، کشت سلول‌ها را در صفحات روکش شده ماتریژل در محیط شرطی حاوی KSR (محیط شرطی‌شده توسط MEF) امکان‌پذیر می‌کنند (۱۵، ۱۶). پس از آن، شرایط کشت hESCs با وجود ترکیبات شیمیایی معین به سمت کشت فاقد لایه تغذیه‌کننده حرکت کرده است (۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۰). علاوه بر این، برای جلوگیری از آلودگی بالقوه توسط عوامل بیماری‌زا و پروتئین‌های حیوانی، روش‌هایی برپایه اجزای xeno-free ایجاد شده است (۲۱). برای به‌دست آوردن شرایط بهتر، سلول‌های تغذیه کننده موش با سلول‌های انسانی جایگزین شده‌اند. برای مثال، عضله جنین و سلول‌های پوستی (۲۲)، سلول‌های پوستی بزرگسالان (۲۳)، فیبروبلاست‌های پوست ختنه‌گاه (Human (foreskin fibroblasts (۲۴ و ۲۵) سلول‌های مزانشیمی آمنیوتیک (۲۶ و ۲۷). با این‌حال، کارایی حفظ حالت پرتوانی hESCهای تمایز نیافته با استفاده از لایه‌های تغذیه کننده مشتق از فیبروبلاست پوست ختنه‌گاه انسان به‌دلیل سطح پایین ترشح Activin A به‌اندازه سلول‌های تغذیه کننده موش نیست (۲۸). واضح است که تفاوت آشکاری در تولید فاکتور رشد توسط سلول‌های تغذیه کننده موش و انسان وجود دارد. تجزیه و تحلیل ترانسکریپتوم سلول‌های تغذیه کننده موش و انسان تفاوت معنی‌داری بین سلول‌های حمایت‌کننده و غیرحمایت‌کننده نشان‌داد. FGF2 برون‌زا برای حفظ بازبرنامه‌ریزی hESC و hiPSC بسیار مهم است و به‌عنوان یک عامل اصلی تنظیم‌کننده بیان TGFβ1، Activin A و Gremlin (آنتاگونیست BMP) در سلول‌های تغذیه‌کننده شناخته شده است. مشخص داده شده است که Activin A بیان OCT4، SOX2 وNANOG را در hESCs القاء می‌کند (۲۹، ۳۲). برای کشت طولانی مدت، hESCها و hiPSCها را می‌توان بر روی MEFهای که به لحاظ میتوزی غیرفعال هستند یا تحت شرایط بدون سلول تغذیه کننده در MEF-CM (محیط شرطی MEF) در صفحات پوشیده شده با ماتریژل رشد داد تا حالت تمایز نیافته آن‌ها حفظ شود. موفقیت در هر دو شرایط کشت کاملاً به کیفیت سلول‌های تغذیه‌کننده بستگی

دارد، زیرا مستقیماً بر رشد hESC تأثیر می‌گذارند. در این‌جا، یک روش بهینه‌شده برای بازبرنامه‌ریزی و کشت سلول‌های بنیادی پرتوان القایی انسان از سلول‌های سوماتیک گلبول‌های سفید خونی بر روی لایه‌های تغذیه‌کننده فیبروبلاست جنین موش مورد مطالعه قرار گرفت. بنابراین، هدف از این مطالعه، بررسی نقش سلول‌های تغذیه کننده MEF در بازبرنامه‌ریزی iPSCs می‌باشد. یافته‌های این تحقیق تأیید کرد که سلول‌های MEF برای بیان چهار فاکتور شروع بازبرنامه‌ریزی لازم هستند، اما آن‌ها برای حفظ پرتوانی و تکثیر سلول‌های iPS پس از آن‌که بازبرنامه‌ریزی انجام شد، بسیار حائز اهمیت‌اند.

مواد و روش‌ها

مواد و تجهیزات لازم: جنین‌های ۱۳/۵-۱۲/۵ روزه، فسفات بافر سالین (PBS) بدون Ca^{2+} و Mg^{2+}، محیط DMEM حاوی ۴/۵ گرم بر لیتر D-گلوکز، محیط RPMI-1640، لیپوپلی‌ساکارید (LPS)، سرم جنین گاوی (FBS)، L-گلوتامین، محلول 1x پنی‌سیلین-استرپتومایسین، محلول فایکول، ۰/۲۵ ٪ تریپسین-EDTA، اتانول ۷۰٪، دی متیل سولفوکسید (DMSO)، انواع مختلف استوک ترکیبات شیمیایی ریزمولکول شامل 5-Azacytidine، BIX01294، AzNep، سدیم بوتیرات، AS-8351، OAC2، RepSox، Kenpaullon و SC1 (همه ترکیبات از شرکت wako خریداری شد)، ژلاتین، محیط کشت MEF با سرم جنین گاو ۱۰٪ ، نوار پوشاننده، تخته تشریح موش، قیچی، دسته و تیغ اسکالپل استریل، دستکش آزمایش، پتری‌دیش، لوله‌های یک‌بار مصرف یا فالکون ۵۰ میلی‌لیتری، فلاسک کشت بافت T75، انکوباتور کشت بافت ۳۷ درجه سانتی‌گراد با CO_2 ۵٪، هود کشت بافت، میکروسکوپ معکوس، کرایوویال.

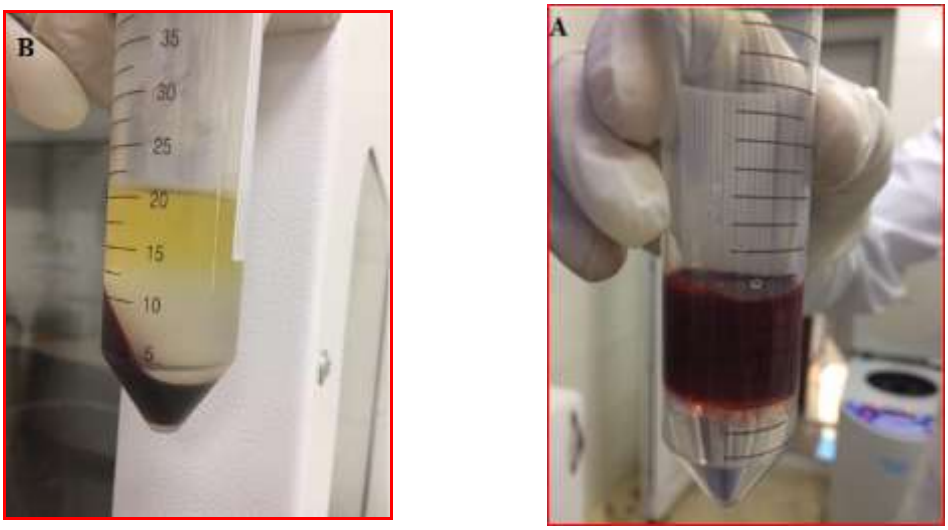
محیط‌ها و محلول‌ها

محیط کشت MEF: ۱۰٪ سرم جنین گاو (FBS) شامل ۹۰٪ DMEM با گلوکز بالا به‌همراه پنی‌سیلین/استرپتومایسین (۰/۵ mL/۱۰۰mL) که در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید.

محیط فریزکننده 2X: ۲۰٪ FBS، ۲۰٪ DMSO، ۶۰٪ DMEM. همه ترکیبات در ظرف فیلتر دار ۰/۲۲ میکرومتری فیلتر شدند.

محلول میتومایسین C: ۸ میکروگرم در میلی‌لیتر. ۲ میلی‌گرم میتومایسین C وزن گردید و به ۲۵۰ میلی‌لیتر DMEM اضافه شد. با کمک یک فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری محلول فیلتر شد و ۷mL یا ۱۴ mL از این محلول در لوله فالکون تقسیم و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید.

خونگیری و کشت سلول‌های خونی: در این مرحله، نمونه خون محیطی از یک شخص بالغ و با رضایت شخصی گرفته شد تا برای استخراج سلول‌های تک هسته‌ای، به‌ویژه لنفوسیت‌ها و در مراحل بعدی برای تولید iPSCs مورد استفاده قرار گیرند. جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای با استفاده از روش فایکول انجام گردید. به‌طور خلاصه، ۵ mL نمونه خون محیطی به‌داخل لوله‌های جمع‌آوری مخصوص هپارینه اضافه و سپس نمونه خون کامل با مقدار هم حجم از PBS بافر 1X (pH7.4) در داخل فالکون ۵۰ mL رقیق گردید. محلول فایکول به مقدار ۴ mL به‌داخل فالکون ۵۰ mL اضافه گردید. محلول رقیق شده خون با PBS به‌آرامی بر روی فایکول سانتریفوژ در دور ۵۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۷ درجه سانتی‌گراد اضافه شد (شکل ۱).

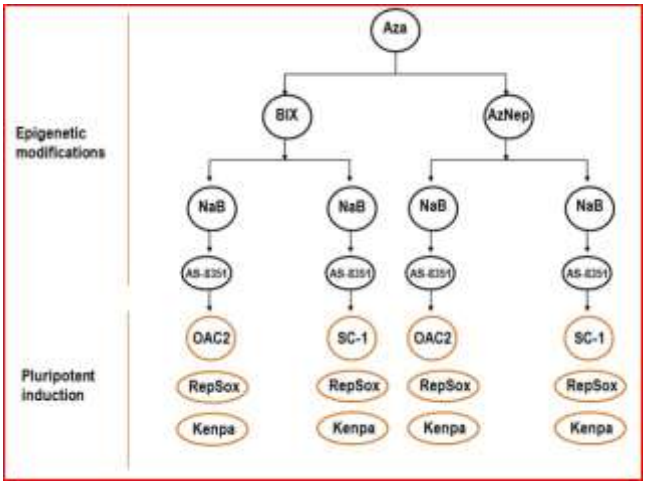


شکل ۱: جداسازی سلول‌های خونی با استفاده از شیب گرادیان محلول فایکول A) افزودن خون رقیق شده به آرامی بر روی محلول فایکول و B) جداسازی لایه زیر سرمی پس از سانتریفوژ

مراحل بعدی شامل موارد زیر بوده است: جداسازی لایه زیر سرم (زرد رنگ) که حاوی سلول‌های تک هسته‌ای و انتقال به یک فالکون ۱۵ mL استریل، اضافه کردن محلول PBS به‌مقدار ۴-۳ میلی‌لیتر جهت شستشو و حذف پلاکت‌ها و سپس سانتریفوژ مجدد با دور ۲۰۰g به‌مدت ۱۰ دقیقه با دمای ۷ درجه سانتی‌گراد، دور ریختن محلول رویی، اضافه کردن محیط RPMI-1640 به‌مقدار ۳-۲ میلی‌لیتر جهت شستشوی نهایی، پیپت میکس کردن و سانتریفوژ مجدد بادور ۲۰۰g به‌مدت ۱۰ دقیقه با دمای ۷ درجه سانتی‌گراد. دور ریختن محیط رویی و سپس اضافه کردن محیط جدید RPMI-1640 با ۲۰٪ FBS و پنی‌سلین/ استرپتومایسین (۱٪ P/S) و پیپت میکس کردن رسوب سلولی تا به‌حالت سوسپانسیون کامل درآید و در نهایت شمارش سلولی توسط لام نئوبار.

تکثیر و ازدیاد سلول‌های خونی: پس از شمارش سلولی، سوسپانسیون سلولی به پلیت ۲۴ خانه‌ای (۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی برای هر چاهک) انتقال یافت. با توجه به این‌که لوکوسیت‌ها در محیط کشت و بدون وجود یک القاءکننده به تنهایی قادر به تکثیر و ازدیاد نیستند و ماندگاری بسیار پایینی دارند، پس از انتقال سوسپانسیون سلولی به چاهک‌ها، مقدار ۳ میکروگرم در هر میلی‌لیتر لیپوپلی ساکارید (LPS) به سوسپانسیون سلولی اضافه گردید. سپس پلیت حاوی محیط کشت (RPMI-1640 با ۲۰٪ FBS و ۱٪ P/S) در انکوباتور CO_2 و دمای ۳۷ درجه قرار گرفتند.

اضافه کردن هم‌زمان ترکیبات ریزمولکول شیمیایی القاء کننده تغییرات اپی‌ژنتیک و افزایش‌دهنده بیان ژن‌های پرتوانی: قبل از افزودن ترکیبات القاءکننده ژن‌های پرتوانی، نیازمند القاء تغییرات اپی‌ژنتیک ازجمله مهار DNA متیل ترانسفراز، مهار هیستون متیل ترانسفراز، هیستون داستیلاز و هیستون دمتیلاز (KDM5B یا JARID1B) می‌باشد. در این تحقیق جهت مهار DNA متیل ترانسفراز از ترکیب 5-Azacytidine (از غلظت‌های ۱ تا ۵ میکرومولار)، مهار هیستون متیل ترانسفراز از ترکیب BIX01294 (از غلظت‌های ۱ تا ۵ میکرومولار) یا AzNep (از غلظت‌های ۱ تا ۵ میکرومولار)، مهار هیستون داستیلاز از ترکیب سدیم بوتیرات (NaB) (از غلظت‌های ۱۰۰ تا ۵۰۰ میکرومولار)، و مهار هیستون دمتیلاز از ترکیب AS-8351 (از غلظت‌های ۱۰ تا ۵۰ میکرومولار) استفاده گردید (شکل ۲). ترکیبات شیمیایی مورد استفاده برای القاء پرتوانی سلول‌های تک هسته‌ای خونی به iPSCs شامل OAC2 (جهت القاء بیان ژن OCT4) (از غلظت‌های ۱۰ تا ۶۰ میکرومولار)، RepSox (جهت القاء بیان ژن SOX2) (از غلظت‌های ۱۰ تا ۶۰ میکرومولار)، Kenpaullon (جهت القاء بیان ژن KLF4) (از غلظت‌های ۴ تا ۳۶ میکرومولار) و SC1 (جهت القاء بیان ژن OCT4) (از غلظت‌های ۱ تا ۵ میکرومولار) بودند (شکل ۲). پس از ۶ ساعت که تعداد سلول‌های خونی تیمار شده با LPS زیاد شد، ترکیبات شیمیایی مذکور با ۵ غلظت مختلف همراه با ۵۰۰ میکرولیتر محیط RPMI-1640 حاوی ۲۰٪ FBS و ۱٪ P/S به چاهک‌های حاوی سلول (حاوی ۵۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی) اضافه گردید و سپس در انکوباتور قرار گرفت. پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت وضعیت سلول‌ها در زیر میکروسکوپ بررسی و بهترین شرایط ثبت گردید (شکل ۲). ترکیبات شیمیایی مربوط به ژن‌های پرتوانی (شامل OAC2، BIX، RepSox و Kenpaullon) مجدداً بعد از هر ۳ روز در غلظت‌های تعریف شده به چاهک‌های مربوطه همراه با تعویض محیط اضافه می‌شدند.



شکل ۲: مراحل اضافه کردن ترکیبات ریزمولکول شیمیایی مورد نظر جهت ایجاد تغییرات اپی‌ژنتیکی و سپس القاء بیان ژن‌های مربوط به پرتوانی

روش جداسازی MEF: به‌طور خلاصه، موش حامله وقتی که جنین آن حدود ۱۲/۵-۱۳/۵ روزه بودند با روش قطع نخاع کشته شد. بخش شکمی آن با اتانول ۷۰٪ استریل و حفره شکمی برای بریدن شاخ رحم تخلیه گردید. شاخ رحم به پتری‌دیش ۱۰۰ mm حاوی PBS منتقل گردید (شکل ۳). از دو پنس برای برش جنین‌های موجود در رحم استفاده شد. جنین‌ها به ظرف جدید حاوی PBS منتقل گردید و تعداد جنین‌ها شمارش شد. جنین‌های به‌دست آمده ۳ بار با PBS شستشو داده شدند. سر و اندام‌های احشایی (کبد، قلب، کلیه، ریه و رده) با همان ابزار جدا گردید. برای حذف خون و باقی‌مانده‌های سلول، ظرف ۳ بار با PBS شستشو داده شد. جنین با استفاده از قیچی تیز قطعه قطعه گردید. ۱۰ ml تریپسین-EDTA (۵۰ ٪ و ۱۰x) به فالکون ۵۰mL منتقل شد و حداقل به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت. ۱۰ mL محیط MEF برای خنثی‌سازی تریپسین اضافه شد و سوسپانسیون

سلول کاملاً پیپتاژ گردید. سوسپانسیون سلول در فلاسک کشت T75 تقسیم شد (دو جنین در هر فلاسک) و برای رسانده حجم به ۲۰ mL محیط MEF اضافه شد. سلول‌ها در یک انکوباتور CO_2 ٪۵ کشت داده شد تا به تراکم مناسب برسد و وقتی محیط به رنگ زرد تبدیل شد محیط تعویض گردید. بعد از ۲ تا ۳ روز کشت، یک لایه متراکم از MEF ایجاد گردید. هر فلاسک تریپسینه شده و مجدداً محیط با فلاسک T75 پلیت شد. وقتی فلاسک به تراکم مناسب رسید (معمولاً بعد از ۲ تا ۳ روز)، سلول‌ها فریز شدند.

شکل ۳: انتقال جنین موش۱۲/۵ روزه به پلیت جهت جداسازی بخش‌های سر و ارگان‌های قرمز داخلی و سلول‌های فیبروبلاست جنین

روش فریزکردن MEF: زمانی‌که تراکم MEF به ٪۹۰-۸۰ رسید، سلول‌ها فریز گردید. محیط و همه توده‌های ممکن از فلاسک حذف شد و سپس mL ۳ تریپسین-EDTA (۰/۲۵ ٪ و ۱۰x) اضافه گردید تا کل سطح فلاسک کشت را بپوشاند و حداقل به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس mL ۶ محیط MEF برای خنثی‌کردن تریپسین اضافه گردید و دیواره درونی فلاسک با محیط شستشو داده شد. سوسپانسیون سلول در یک لوله فالکون mL ۵۰ جمع‌آوری شد و به‌مدت ۵ دقیقه با دور ۲۰۰g سانتریفوژ شد. سوپرناتانت برداشته شده و رسوب سلولی در حجم دلخواه از محیط MEF دوباره سوسپانسیون شد و چندین بار پیپتاژ شد تا رسوب سلولی کاملاً جدا شوند. حجم مساوی از محیط فریزکننده به‌صورت قطره قطره اضافه شد و به‌آرامی مخلوط گردید. هر ویال به mL ۱ از سوسپانسیون سلول تقسیم گردید و ظرف مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد و نهایتاً در نیتروژن مایع ذخیره گردید.

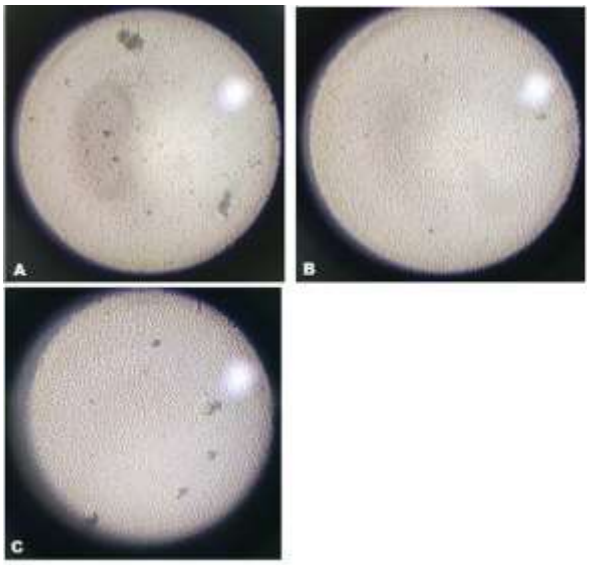
ذوب‌کردن یخ ویال حاوی MEF: ویال از نیتروژن مایع خارج شده و یخ آن به‌طور مختصر در حمام آب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد آب شد. وقتی یک رسوب سلولی کوچکی از سلول یخ زده باقی ماند با استفاده از اتانول ٪۷۰ پاک شد. یک بار محتوای ویال پیپتاژ شد و سلول‌ها در یک لوله فالکون mL ۱۵ منتقل گردید. قطره قطره mL ۲ محیط MEF اضافه و به‌آرامی مخلوط گردید. به‌مدت ۵ دقیقه در دور g ۲۰۰ سانتریفوژ شد. رسوب سلولی در mL ۵ محیط MEF مجدداً سوسپانسیون شد و سپس دوبار پیپتاژ شد. سوسپانسیون سلول را به یک فلاسک T75 منتقل شد و mL ۱۰ محیط MEF اضافه گردید.

آماده‌کردن لایه تغذیه‌کننده MEF: محیط شرطی از فلاسک T75 حذف شد و mL ۷ محلول میتومایسین C (۸ میکروگرم در میلی‌لیتر) در هر فلاسک اضافه گردید. سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، CO_2 ٪۵ به‌مدت ۳-۲ ساعت انکوبه شدند. محلول میتومایسین C را خارج گردید و با mL ۱۰۰ PBS دوبار شستشو داده شد. mL ۳ تریپسین-EDTA (۰/۲۵ ٪) به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اضافه شد. mL ۶ محیط MEF برای خنثی کردن تریپسین اضافه شد و برای جدا کردن سلول‌ها همه توده‌های سلولی محیط پیپتاژ شد. سوسپانسیون سلول به یک فالکون منتقل شد و به‌مدت ۵ دقیقه با دور g ۲۰۰ سانتریفوژ شد. سوپرناتانت دور ریخته شد و رسوب سلولی در mL ۱۰ محیط MEF مجدداً سوسپانسیون شد. سلول‌ها شمارش گردید و به محیط کشت با حجم مناسب منتقل شد. سلول‌ها فوراً به پلیت‌های کشت بافت حاوی محیط MEF منتقل شد. برای پلیت‌های ۶ خانه‌ای، ۴۰۰۰۰۰ سلول در هر چاهک و mL ۲ محیط در هر چاهک مورد نیاز است. لذا اجازه داده شد تا سلول‌ها تغذیه کننده MEF حداقل ظرف ۲ ساعت متصل گردیدند، ولی قبل از کشت سلول‌ها ESC یا iPSCs ترجیحاً به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. قبل از اضافه کردن iPSCs محیط فعلی با محیط ESC فوراً تعویض شد. تغذیه کننده MEF تیمار شده با میتومایسین C را می‌توان ظرف مدت ۵ روز استفاده کرد که هر سه روز باید محیط آن تعویض شود.

آماده‌سازی پلیت MEF: ml ۱ ژلاتین ٪۰/۱ به هر چاهک از پلیت ۶ خانه‌ای اضافه گردید و حداقل به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. ژلاتین اضافه خارج شد و ml ۲/۵ از MEF غیرفعال شده با چگالی حدود ۱×۱۰^{۵} سلول در هر میلی‌لیتر به هر چاهک ۶ خانه‌ای اضافه شد و به‌آرامی پلیت تکان داده شد تا سلول‌ها پراکنده شوند. قبل از استفاده به‌مدت یک شبانه‌روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد تا تراکم سلول‌ها به حدود ٪۹۰-۸۰ رسید. قبل از استفاده محیط خارج گردید و پلیت با محیط DMEM/F12 استریل شستشو داده شد، محیط دور ریخته شد و ۱ میلی‌لیتر محیط کشت سلول بنیادی به هر چاهک اضافه گرفت.

نتایج

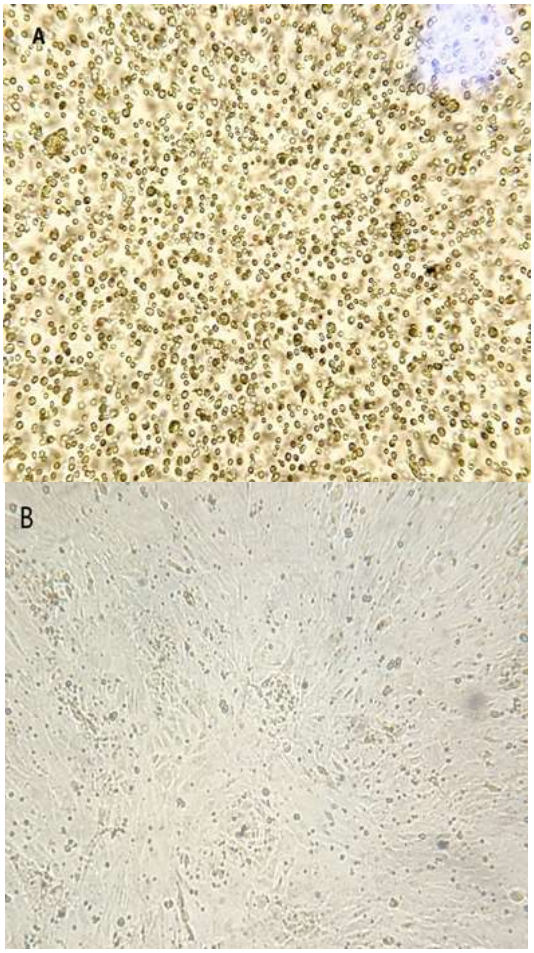
ازدیاد سلول‌های خونی پس از افزودن LPS: همان‌طورکه در شکل ۴ نشان داده شده است، سلول‌های خونی هسته‌دار، به‌ویژه لنفوسیت‌ها، ۱، ۳ و ۵ ساعت پس از افزودن لیپوپلی ساکارید به‌طور چشمگیری افزایش یافت. به‌طوری‌که ۵ ساعت پس از تیمار کردن محیط با لیپو پلی‌ساکارید، تعداد لنفوسیت‌ها به حداکثر رسیده بود. این موضوع دال بر تاثیر LPS در القاء تکثیر سلول‌های خونی هسته‌دار می باشد.



شکل ۴: تصویر میکروسکوپی از کشت سلول‌های خونی ۱ ساعت (A)، ۳ ساعت (B) و ۵ ساعت (C) پس از اضافه کردن LPS

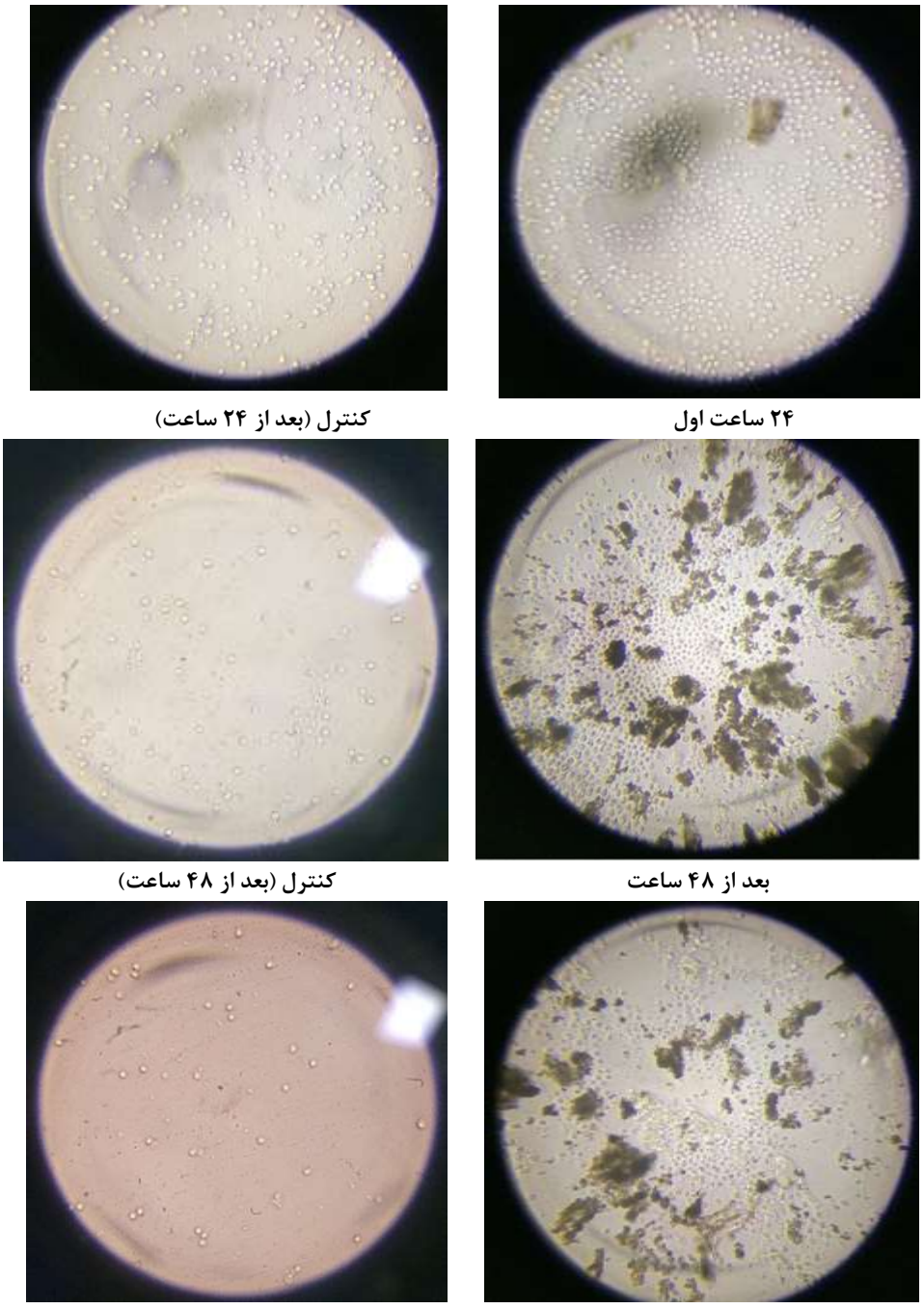
تکثیر MEF در محیط کشت: نتایج مربوط به استخراج و تکثیر MEF در شکل ۵ نشان داده شده است. سلول‌های MEF یک روز پس از استخراج و کشت بر روی محیط کشت، به کف فلاسک چسبیده و مورفولوژی آن به‌صورت کشیده و دوکی شکل بوده است. هم‌چنین تراکم سلول‌ها به محدوده ۹۰-۸۰٪ رسیده و کل فلاسک را پوشانده است که آماده برای انتقال سلول‌های iPSCs می‌باشد.

تولید سلول بنیادی پرتوان القایی (iPSCs) با کمک ریزمولکول‌ها: تصویر مربوط به تیمار سلول‌های خونی توسط ترکیبات شیمیایی جهت تولید iPSCs در بازه‌های زمانی مختلف در شکل ۶ نشان داده شده است. همان‌طورکه در تصویر میکروسکوپی قابل مشاهده می‌باشد، سلول‌های تیمار شده با ترکیب شیمیایی پس از ۴۸ ساعت به‌صورت کلامپ تشکیل داده و به‌عبارتی در حال اتصال و نزدیک شدن به‌هم در جهت تشکیل کلونی می‌باشند که از ویژگی‌های بارز سلول‌های iPS می‌باشد (شکل ۶).



شکل ۵: سلول‌های فیبروبلاست جنین موش. A) تصویر سلول‌های MEF استخراج شده را نشان می‌دهد B) تصویر سلول‌های MEF یک روز پس از استخراج را نشان می‌دهد که پس از اتصال به کف فلاسک به‌صورت کشیده و دوکی شکل در می‌آیند در این تصویر تراکم سلول‌ها ۹۰-۸۰٪ از کل فلاسک را می‌پوشاند.

ترکیبات شیمیایی مربوط به ژن‌های پرتوانی (شامل OAC2، BIX، RepSox و Kenpaullon) مجدداً بعداز هر ۳ روز در غلظت‌های تعریف شده به چاهک‌های مربوطه همراه با تعویض محیط اضافه می‌شدند. پس از روز ۶ ام سلول‌های موجود در چاهک کنترل به‌طور کامل از بین رفتند، درحالی‌که که سلول‌های تیمار شده با ترکیبات شیمیایی به‌صورت کلامپ درآمدن، هرچند در طول شستشوی محیط پس از هر ۳ روز سلول‌های مرده و شناور از محیط به آرامی حذف می‌شدند (شکل ۷). تصاویر میکروسکوپی مربوط به سلول‌ها پس از ۱۲ روز در شکل ۷ قابل مشاهده می‌باشند. کلونی‌های iPSCs انسانی بر روی محیط MEF ۱۴ روز پس از بازبرنامه‌ریزی قابل مشاهده شدند (شکل ۸).

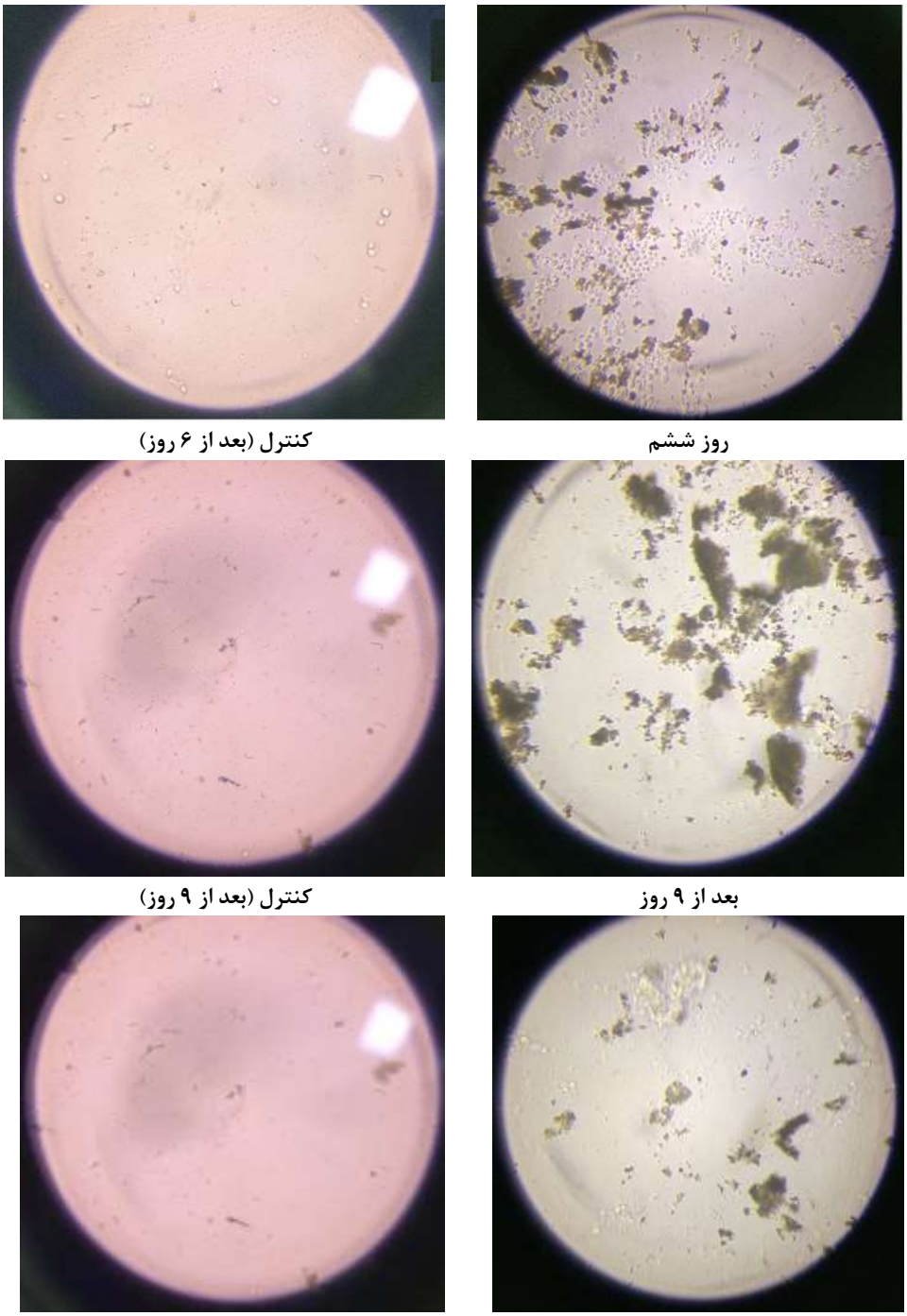


۲۴ ساعت اول | کنترل (بعد از ۲۴ ساعت)

بعد از ۴۸ ساعت | کنترل (بعد از ۴۸ ساعت)

بعد از ۷۲ ساعت | کنترل (بعد از ۷۲ ساعت)

شکل ۶: تصویر میکروسکوپی سلول‌های تیمار شده با ترکیبات شیمیایی در طول ۲۴ تا ۷۲ ساعت

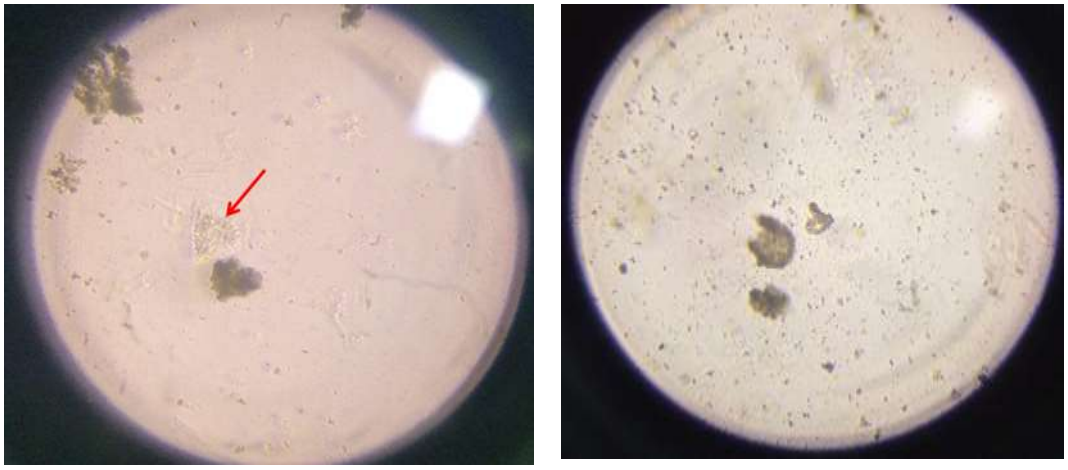


روز ششم | کنترل (بعد از ۶ روز)

بعد از ۹ روز | کنترل (بعد از ۹ روز)

بعد از ۱۲ روز | کنترل (بدون سلول)

شکل ۷: تصویر میکروسکوپی سلول‌های تیمار شده با ترکیبات شیمیایی در طول روزهای ۶ تا ۱۲



شکل ۸: تشکیل کلنی‌های iPSCs (فلش قرمز رنگ) پس از روز ۱۴

بحث

سلول‌های سوماتیک را می‌توان از طریق انتقال عوامل رونویسی Oct 3/4، Sox2، c-Myc و Klf4 به‌حالت سلول بنیادی پرتوان برنامه‌ریزی کرد. این چهار عامل هم‌چنین می‌توانند سلول‌های سوماتیک انسان را به یک حالت پرتوان بازبرنامه‌ریزی کنند که امکان ایجاد سلول‌های بنیادی مختص بیمار را فراهم می‌کند و پتانسیل درمانی فوق العاده‌ای در بیماری‌های انسانی دارد. سلول‌های تغذیه‌کننده فیبروبلاست جنین موش محیط مناسب جهت بازبرنامه‌ریزی سلول‌های سوماتیک و تولید سلول‌های iPS پس از انتقال ژن پرتوانی یا استفاده از ریزمولکول‌های مناسب پرتوان سازی را فراهم می‌سازد. سلول‌های تغذیه کننده MEF پروتئین‌ها و فاکتورهای محلول متعددی تولید می‌کنند، ازجمله Activin A، TGFβ، bFGF، Wnt و BMP4، که برای حفظ و تکثیر و پرتوانی سلول‌های بنیادی جنینی یا سلول‌های بنیادی پرتوان القایی مهم هستند. هم‌چنین مشاهده گردید که سلول‌های تغذیه‌کننده MEF باعث افزایش تکثیر در کلنی‌های اولیه iPS می‌شوند. مطالعات قبلی نیز گزارش کرده‌اند که وقتی سلول‌های iPS در محیط فاقد سلول‌های تغذیه‌کننده کشت می‌شوند نتوانستند حالت تمایز نیافته خود را حفظ کنند. یافته‌ها نشان می‌دهد که فاکتورهای تولید شده توسط تغذیه‌کننده‌های MEF که برای تسریع در تکثیر و حفظ حالت پرتوانی سلول‌های iPS پس از بازبرنامه‌ریزی بسیار مهم هستند، بسیار کامل است. در این مطالعه مشخص شد که استفاده هم‌زمان از چندین ریزمولکول شیمیایی شامل 5-Azacytidine، BIX01294، AzNep، سدیم بوتیرات، AS-8351، OAC2، RepSox، Kenpaullon و SC1 در غلظت‌های بهینه همراه با لایه‌های تغذیه کننده فیبروبلاست جنین موش که تأمین‌کننده فاکتورهای رشد مورد برای سلول‌های iPSCs هستند، سبب افزایش تکثیر و حفظ حالت پرتوانی سلول‌های بازبرنامه‌ریزی شدند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از موسسه ملی تحقیقات علوم پزشکی ایران (نیماد) بابت تامین بخشی از هزینه‌های انجام این پژوهش به شماره ۹۷۳۳۶۴ قدردانی می‌نمایند.

منابع

1. **Singhal, P.K., Sassi, S., Lan, L., Au, P., Halvorsen, S.C. and Fukumura, D., 2016.** Mouse embryonic fibroblasts exhibit extensive developmental and phenotypic diversity. Proceedings of the National Academy of Sciences. 113(1): 122-127.
2. **Jopling, C., Boue, S. and Belmonte, J.C.I., 2011.** Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. Nature reviews Molecular cell biology. 12(2): 79-89.
3. **Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M,, Narita, M., Ichisaka, T. and Tomoda, K., 2007.** Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. cell. 131(5): 861-872.
4. **Takahashi, K. and Yamanaka, S., 2006.** Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. cell. 126(4): 663-676.
5. **Ma, X., Kong, L. and Zhu, S., 2017.** Reprogramming cell fates by small molecules. Protein & cell. 8(5): 328-348.
6. **Lipinski, C.A., 2004.** Lead-and drug-like compounds: the rule of five revolution. Drug discovery today: Technologies. 1(4): 337-341.
7. **Schuppan, D. and Pinzani, M., 2012.** Anti-fibrotic therapy: lost in translation? Journal of hepatology. 56: S66-S74.

8. **Dvorak, H.F., Weaver, V.M., Tlsty, T.D. and Bergers, G., 2011.** Tumor microenvironment and progression. Journal of surgical oncology. 103(6): 468-474.
9. **Ishii, G., Ochiai, A. and Neri, S., 2016.** Phenotypic and functional heterogeneity of cancer-associated fibroblast within the tumor microenvironment. Advanced drug delivery reviews. 99: 186-196.
10. **Öhlund, D., Elyada, E. and Tuveson, D., 2014.** Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. Journal of Experimental Medicine. 23(8): 211.
11. **Pickup, M., Novitskiy, S. and Moses, H.L., 2013.** The roles of TGFβ in the tumour microenvironment. Nature Reviews Cancer. 13(11): 788-799.
12. **Wijten, P., van Holten, T., Woo, L.L., Bleijerveld, O.B., Roest, M. and Heck, A.J., 2013.** High precision platelet releasate definition by quantitative reversed protein profiling- brief report. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 33(7): 1635-1638.
13. **Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J. and Marshall, V.S., 1998.** Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. 282(5391): 1145-1147.
14. **Amit, M., Carpenter, M.K., Inokuma, M.S., Chiu, C.P., Harris, C.P. and Waknitz, M.A., 2000.** Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. Developmental biology. 227(2): 271-278.
15. **Al Abbar, A., Ngai, S.C., Nograles, N., Alhaji, S.Y. and Abdullah, S., 2020.** Induced pluripotent stem cells: Reprogramming platforms and applications in cell replacement therapy. BioResearch open access. 9(1): 121-136.
16. **Xu, C., Inokuma, M.S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P. and Gold, J.D., 2001.** Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. Nature biotechnology. 19(10): 971-974.
17. **Ludwig, T.E., Levenstein, M.E., Jones, J.M., Berggren, W.T., Mitchen, E.R. and Frane, J.L., 2006.** Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. Nature biotechnology. 24(2): 185-187.
18. **Liu, B., Chen, S., Xu, Y., Lyu, Y., Wang, J. and Du, Y., 2021.** Chemically defined and xeno-free culture condition for human extended pluripotent stem cells. Nature communications. 12(1): 1-12.
19. **Walsh, P., Truong, V., Nayak, S., Saldías Montivero, M., Low, W.C. and Parr, A.M., 2020.** Accelerated differentiation of human pluripotent stem cells into neural lineages via an early intermediate ectoderm population. Stem Cells. 38(11): 1400-1408.
20. **Dakhore, S., Nayer, B. and Hasegawa, K., 2018.** Human pluripotent stem cell culture: current status, challenges and advancement. Stem cells international.
21. **Skottman, H. and Hovatta, O., 2006.** Culture conditions for human embryonic stem cells. Reproduction. 132(5): 691-698.
22. **Desai, N., Rambhia, P. and Gishto, A., 2015.** Human embryonic stem cell cultivation: historical perspective and evolution of xeno-free culture systems. Reproductive Biology and Endocrinology. 13(1): 1-15.
23. **Zheng, J., Yun, W., Park, J., Kang, P.J., Lee, G. and Song, G., 2020.** Long-term expansion of directly reprogrammed keratinocyte-like cells and in vitro reconstitution of human skin. Journal of biomedical science. 27(1): 1-16.
24. **Oliveira, T., Costa, I., Marinho, V., Carvalho, V., Uchôa, K. and Ayres, C., 2018.** Human foreskin fibroblasts: From waste bag to important biomedical applications. Journal of Clinical Urology. 11(6): 385-394.
25. **Li, P., Wang, S., Zhan, L., He, X., Chi, G. and Lv, S., 2017.** Efficient feeder cells preparation system for large scale preparation and application of induced pluripotent stem cells. Scientific reports. 7(1): 1-15.
26. **Soong, Y.K., Huang, S.Y., Yeh, C.H., Wang, T.H., Chang, K.H. and Cheng, P.J., 2015.** The use of human amniotic fluid mesenchymal stem cells as the feeder layer to establish human embryonic stem cell lines. Journal of tissue engineering and regenerative medicine. 9(12): E302-E307.
27. **Zhang, K., Cai, Z., Li, Y., Shu, J., Pan, L. and Wan, F. 2011.** Utilization of human amniotic mesenchymal cells as feeder layers to sustain propagation of human embryonic stem cells in the undifferentiated state. Cellular Reprogramming (Formerly Cloning and Stem Cells). 13(4): 281-288.
28. **Eiselleova, L., Peterkova, I., Neradil, J., Slaninova, I., Hampl, A. and Dvorak, P., 2004.** Comparative study of mouse and human feeder cells for human embryonic stem cells. International Journal of Developmental Biology. 52(4): 353-563.
29. **Tan, F., Qian, C., Tang, K., Abd-Allah, S.M. and Jing, N., 2015.** Inhibition of transforming growth factor β (TGF-β) signaling can substitute for Oct4 protein in reprogramming and maintain pluripotency. Journal of Biological Chemistry. 290(7): 4500-4511.
30. **Mullen, A.C. and Wrana, J.L., 2017.** TGF-β family signaling in embryonic and somatic stem-cell renewal and differentiation. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 9(7): a022186.
31. **Vallier, L., Touboul, T., Brown, S., Cho, C., Bilican, B. and Alexander, M., 2009.** Signaling pathways controlling pluripotency and early cell fate decisions of human induced pluripotent stem cells. Stem cells. 27(11): 2655-2666.
32. **Gordeeva, O., 2019.** TGFβ family signaling pathways in pluripotent and teratocarcinoma stem cells' fate decisions: balancing between self-renewal, differentiation, and cancer. Cells. 8(12): 1500.