نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۵، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۲، ص. ۲۵۰-۲۴۲

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 5, No. 3, Fall 2013, p. 242-250

تولید سلول‌های بنیادی رویانی با استفاده از رویان‌های شبیه سازی شده در گاومیش

محمد زندی[1*] - محمدرضا سنجابی[2] - سپیده خاموشی[3]

تاریخ دریافت:۱۳۹۱/۶/۴
تاریخ پذیرش:۱۳۹۲/۱/۲۸

چکیده

سلول‌های بنیادی رویانی از لایه زاینده داخلی رویان در مرحله بلاستوسیست تولید می‌شوند و توانایی تمایز به تمام سلول‌های لایه زاینده رویان را دارند. در این تحقیق سلول‌های بنیادی رویانی از بلاستوسیست‌های حاصل از شبیه سازی به روش Hand Made Cloning (HMC) تولید شدند و کارایی آنها با سلول‌های بنیادی رویانی حاصل از لقاح آزمایشگاهی مقایسه گردید. برای کشت سلول‌های بنیادی از لایه تغذیه کننده بعلاوه محیط کشت حاوی Knockout-Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Ko-DMEM)، Knockout Serum Replacement (KSR)، Leukemia Inhibitory Factor (LIF)، Basic Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2)، ال- گلوتامین، اسیدهای آمینه غیر ضروری و جنتامایسین استفاده شد. جهت شناسایی سلول‌های بنیادی از شناساگرهای سطح سلولی SSEA-1، SSEA-4، TRA-1-60 و TRA-1-81 و پرتوانی OCT3/4، SOX2 و NANOG استفاده گردید. نتایج نشان دادند، که نرخ رشد سلول‌های بنیادی حاصل از لقاح آزمایشگاهی بطور معنی داری بیشتر از سلول‌های بنیادی حاصل از شبیه سازی بود (به ترتیب ۱۲۰ درصد در مقایسه با ۶۵ درصد). با این وجود، نتایج حاصل از بررسی بیان ژن نشان داد، اختلاف معنی داری در بیان ژنهای OCT3/4، SOX2 و C-MYC بین سلول‌های بنیادی حاصل از شبیه سازی و لقاح آزمایشگاهی مشاهده نگردید، تنها اختلاف مشاهده شده مربوط به بیان ژن NANOG است، که در سلول‌های بنیادی حاصل از شبیه سازی بطور معنی داری افزایش یافت. سلول‌های بنیادی حاصل از هر دو منشاء قابلیت پرتوانی خود را برای بیش از دو سال حفظ کردند و به سلول‌های مختلف از جمله سلول‌های عصبی، پوششی، چربی و عضلانی تمایز یافتند.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی رویانی، شبیه سازی، لقاح آزمایشگاهی، گاومیش

مقدمه:

سلول‌های بنیادی رویانی از لایه زاینده داخلی رویان در مرحله بلاستوسیست تولید می‌شوند و تا زمانی که شرایط برای حفظ پرتوانی آنها محیا باشد قابلیت ماندگاری دارند و می‌توانند به انواع سلول‌های برون پوست، میان پوست و درون پوست تمایز یابند (۳۰). سلول‌های بنیادی رویانی علاوه بر حیوانات آزمایشگاهی مانند موش صحرایی (۱۴)، خوکچه هندی (۶) و خرگوش (۳۱) در حیوانات مزرعه ای مانند گوسفند (۲۲)، بز (۱۶)، گاو (۱۰)، گاومیش (۳۸) و اسب (۲۸) نیز تولید شده‌اند.

روش‌های متفاوتی به منظور تولید رویان در شرایط آزمایشگاه وجود دارد که از آن جمله می‌توان به لقاح آزمایشگاهی[4]، خود گشنی[5] و شبیه سازی[6] اشاره نمود (۲۱). تولید بلاستوسیست با استفاده از لقاح آزمایشگاهی مهمترین منبع به منظور تولید سلول‌های بنیادی رویانی است (۳۳)، اما روش‌های جایگزین از جمله شبیه سازی می‌تواند محدودیت‌های این روش از جمله پس زدگی پیوند سلول‌های بنیادی را مرتفع سازد. به عنوان مثال در این روش از سلول‌های بدنی بیماران به منظور تولید رویان استفاده می‌شود (۳۲).

در حال حاضر شبیه سازی در حیوانات مزرعه ای از جمله گاو، گوسفند و بز (۱۸) و همچنین در حیوانات آزمایشگاهی مانند موش و خرگوش (۱۹) موفقیت آمیز بوده است.

تکنیک Hand Made Cloning (HMC) روش تسهیل شده انتقال هسته می‌باشد که نیاز به تجهیزات پیش رفته و پرهزینه

۱و۲- استادیاران گروه دام طیور و آبزیان، پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: mz1075@yahoo.com)
۳- گروه ترویج دام، موسسه ملی دامهای شیری هندوستان، کرنال، هندوستان

4- In Vitro Fertilization
5- Parthenogenesis
6- Cloning

تکنیک Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT) را ندارد. همچنین در این روش به منظور آماده سازی سایتوپلاست و سلول‌های بدنی نیاز به زمان کمتری است (۳۴). انتقال هسته بدون استفاده از ماکرومنیپولیتور[1] نخستین بار توسط پیورا و همکاران (۲۵) با استفاده از اووسیت‌های بدون هسته و سلول‌های رویانی انجام شد و این روش توسط واجیتا و همکاران (۳۵) بهبود یافت. پس از آن آزمایشگاه‌های متعددی این روش را به منظور تولید گاو (۳۷)، اسب (۱۷)، موش (۹) و گاومیش (۲۹) بهبود دادند.

در این مطالعه سلول‌های بنیادی از رویان در مرحله بلاستوسیست با استفاده از روش شبیه سازی تولید شد و کیفیت آنها نسبت به سلول‌های بنیادی حاصل از لقاح آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها

تولید رویان با روش لقاح آزمایشگاهی

برای تولید رویان با روش لقاح آزمایشگاهی، تخمدان‌های گاومیش از کشتارگاه دهلی جمع آوری شدند و درون محلول نمکی فسفات بافری در دمای ۳۰ تا ۳۴ درجه سانتیگراد در مدت ۵ ساعت از کشتار به آزمایشگاه انتقال یافتند. به منظور استحصال مجموعه تخمک–کومولوس، فولیکول‌های با قطر ۲ تا ۸ میلی متر با استفاده از سرنگ ۱۰ میلی لیتری با سرسوزن سایز ۱۸ مکیده شدند. تخمک‌هایی که دارای بیش از سه لایه گرانولوزای فشرده و اووپلاسم یکنواخت بودند، به قطرات ۱۰۰ میلی لیتر از محیط کشت بلوغ انتقال یافتند. بطوری که هر قطره حاوی ۱۵ تا ۲۰ تخمک بود. محیط کشت بلوغ حاوی TCM-199 به همراه ٪ ۱۰ سرم جنین گاو، هورمون تحریک کننده فولیکولی (۵ µg/ mL)، β–۱۷ استرادیول (µg/mL ۱)، سدیم پیروات (۰/۸۱mM)، ۱۰ درصد مایع فولیکولی گاومیش و جنتامایسین سولفات (۵۰µg/mL) بود. تخمک ها درون محیط کشت بلوغ، تحت روغن معدنی و در دمای ۳۸/۵°C و ٪۵ دی اکسید کربن به مدت ۲۴ ساعت به بلوغ رسیدند. به منظور لقاح آزمایشگاهی، تخمک ها با محیط کشت Bracket and Oliphant's (BO) دو بار شستشو شده و درون قطره‌های µL ۵۰ از محیط کشت BO قرار گرفتند (۱۵ تا ۲۰ تخمک به ازای هر قطره). محیط کشت BO حاوی mg/mL ۱۰ آلبومین سرم گاو بود. پس از آماده سازی اسپرماتوزوآ بر اساس روش چوهان و همکاران (۲) انجام شد. پس از آن اسپرم‌های پرتحرک ($۱۰^{۶}$ × ۲–۱) به قطرات حاوی تخمک اضافه شدند و درون انکوباتور با دمای ۳۸/۵°C و ۵ درصد دی اکسید کربن به مدت ۱۸ ساعت قرار گرفتند. پس از این مدت زایگوت‌های احتمالی از سلول‌های کومولوس جدا شدند و در محیط Modified Charles Rosenkrans Medium with Amino Acids (mCR2aa) حاوی ۰/۶ درصد آلبومین سرم گاو به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. در پایان این مدت رویان ها به محیط کشت mCR2aa حاوی ۰/۶ درصد آلبومین سرم گاو و ۱۰ درصد سرم جنین گاو انتقال یافتند و به مدت ۶ روز درون انکوباتور با دمای ۳۸/۵°C و ۵ درصد دی اکسید کربن قرار گرفتند تا به مرحله بلاستوسیست برسند.

تولید رویان با استفاده از تکنیک Handmade Cloning (HMC)

برای تولید رویان با استفاده از تکنیک HMC از روش بهینه شده شاه و همکاران (۲۹) استفاده گردید. سلول‌های فایبروبلاست از سلول‌های پوست گوش گاومیش با سن کمتر از ۶ سال استحصال و به عنوان دهنده ماده ژنتیکی بکار رفتند. پس از به بلوغ رساندن تخمک ها، سلول‌های کومولوس آنها با استفاده از هیالورونیداز(۰/۰۵ mg/mL) در محیط T۲ (TCM-199 + ٪۲ سرم جنین گاو) جدا شد و به منظور حذف لایه زونا پلوسیدا از پرونیز (۲mg/mL) در محیط T۱۰ (TCM-199 + ٪۱۰ سرم جنین گاو) استفاده گردید. به منظور پیدایش برجستگی مخروطی شکل، تخمک‌های عاری از سلول‌های کومولوس به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در محیط کشت T۲۰ (TCM-199 + ٪۲۰ سرم جنین گاو) در انکوباتور حاوی ۵ درصد دی اکسید کربن با دمای ۳۸/۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از آن به محیط کشت T۲۰ حاوی سایتوکالایسین (۲/۵ µg/mL) منتقل شدند و برجستگی مخروطی شکل به کمک میکروتیغ[2] جدا شد. به منظور بازگشت حالت کروی، سایتوپلاست‌های نیمه در محیط کشت T۲۰ و انکوباتور حاوی ۵ درصد دی اکسید کربن با دمای ۳۸/۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰–۱۵ دقیقه نگهداری شدند. پس از آن سایتوپلاست‌های نیمه به فایتوهماگلوتنین (۰/۵ mg/mL) در محیط کشت T۲ به مدت ۳–۴ ثانیه آغشته شدند و پس از آن به محیط کشت T۲ حاوی سلول‌های دهنده انتقال یافتند. هر سایتوپلاست نیمه به آرامی دور سلول دهنده حرکت داده شد تا آنها به یکدیگر متصل شوند. به منظور انجام هم جوشی با استفاده از روش تک مرحله ای، زوج سایتوپلاست نیمه و سلول دهنده و یک سایتوپلاست نیمه دیگر به لام هم جوشی منتقل شدند. زوج سایتوپلاست نیمه و سلول دهنده با استفاده از پالس جریان متناوب (۴ ولت) دستگاه BTX (BTX, San Diego, CA, Electrocell Manipulator 200 USA) بطوری که سلول بدنی روبروی الکترود منفی باشد در یک خط قرار گرفتند و یک سایتوپلاست نیمه دیگر نزدیک سلول بدنی قرار گرفت. یک پالس جریان مستقیم (۳/۳۶ kV/cm) برای ۴µsec)

1- Micromanipulator

2- Micro Blade

بلافاصله بعد از قرار گرفتن سلول بدنی بین دو سایتوپلاست نیمه برقرار شد. پس از آن ترکیب سه تایی در محیط کشت T۲۰ در انکوباتور حاوی ۵ درصد دی اکسید کربن و دمای ۳۸/۵°C به مدت ۶ ساعت قرارگرفتند تا به شکل کروی درآیند. به منظور فعال سازی، آنها در محیط کشت T۲۰ حاوی کلسیمایسین۲۳۱۸۷ A (۲μM) درون انکوباتور حاوی ۵ درصد دی اکسید کربن و دمای ۳۸/۵°C به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند. سپس تخمک ها سه بار در محیط T۲۰ شستشو داده شدند و در قطره های ۵ μL از T۲۰ حاوی ۶- دای متیل آمینو پیورین(۲mM) تحت روغن معدنی درون انکوباتور حاوی ۵٪ دی اکسید کربن و دمای ۳۸/۵°C قرار گرفتند. در پایان رویان ها چهار بار در محیط کشت RVCL حاوی ۱ درصد آلبومین سرم گاو بدون اسید چرب شستشو داده شدند و در ۴۰۰ μL از این محیط در ظروف چهار خانه ای (۱۰ تا ۱۵ رویان در هر خانه) تحت روغن معدنی در انکوباتور حاوی ۵ درصد دی اکسید کربن و دمای ۳۸/۵°C به مدت ۸ روز تا مرحله بلاستوسیست نگهداری شدند.

تولید سلول‌های بنیادی رویانی

سلول‌های بنیادی رویانی از بلاستوسیت‌های با منشاء لقاح آزمایشگاهی و شبیه سازی بر اساس روش مظفر و همکاران (۲۱) تولید شدند. سلول‌های لایه زاینده داخلی بلاستوسیست ها با روش مکانیکی جدا شده و بر روی لایه تغذیه کننده ای که از سلول‌های فایبروبلاست جنینی گاومیش تولید شده بود کاشته شدند. از محیط کشت KO-DMEM (GIBCO/BRL) حاوی ۱۵ درصد KSR (GIBCO/BRL)، ال- گلوتامین (۲mM)، اسیدهای آمینه غیر ضروری (۱٪ v/v) (GIBCO/BRL)، LIF موشی (۱۰۰۰U/mL) و FGF-2 (۵ ng/mL) استفاده شد. محیط کشت حاوی ۵٪ دی اکسید کربن و دمای ۳۸/۵°C بود. محیط کشت هر ۴۸ ساعت تعویض می‌شد و کلونی ها پس از هر ۷ روز به لایه‌های تغذیه کننده جدید منتقل می‌شدند.

شناسایی سلول‌های بنیادی

رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز

به منظور انجام رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز، سلول‌های بنیادی دوبار با[1] DPBS شستشو داده شدند. سپس آنها با استفاده از کیت رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز (Sigma, Catalog No. 86C) رنگ آمیزی شدند.

آنالیز ایمونو سیتوکمیکال[2]

به منظور شناسایی سلول‌های بنیادی گاومیش، بیان شناساگرهای پرتوانی که شامل شناساگرهای سطح سلولی SSEA-1، SSEA-4، TRA-1-60 و TRA-1-81 و شناساگرهای داخل سلولی OCT4، SOX2، NANOG می‌باشند، بوسیله رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس بر اساس روش آناند و همکاران (۱) انجام گرفت. کلونی‌های سلول‌های بنیادی با استفاده از DPBS حاوی ۴ درصد پارافورمالدئید به مدت ۳۰ دقیقه شستشو شدند تا تثبیت شوند. سپس به منظور افزایش نفوذپذیری، سه بار با DPBS شستشو شده و به مدت ۳۰ دقیقه با DPBS حاوی ۰/۱ درصد Triton X-100 تیمار شدند. پس از شستشوی مجدد با DPBS، با مایع انسداد کننده (سرم بز ۴ درصد) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردیدند و پس از آن با آنتی بادی‌های اولیه با نسبت ۱ به ۱۰ به مدت یک ساعت در دمای اتاق درمان شدند. پس از شستشوی مجدد با DPBS، به مدت دو ساعت در دمای اتاق با آنتی بادی ثانویه که با FITC نشان دار شده بود انکوبه شدند. پس از این مرحله نمونه ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسانت (Diaphot, Nikon, Tokyo Japan) مورد بررسی قرار گرفتند. آنتی بادی‌های ثانویه شامل Goat Anti-Mouse IgM-FITC Conjugate و Goat Anti-Mouse IgG-FITC Conjugate (Sigma) و Goat Anti-Rat IgM-FITC Conjugate (Pierce Biotechnology Inc) بودند و به نسبت ۱ به ۲۰۰ رقیق شدند. از آنتی بادی اولیه در گروه کنترل استفاده نشد.

استخراج RNA، RT-PCR و Real-Time PCR (qPCR)

کل محتوای RNA هر گروه آزمایشی با استفاده از روش ترایزول (Invitrogen) استخراج شد و از آنزیم DNAse (Ambion Cat#AM1906) به منظور جلوگیری از آلودگی با DNA استفاده گردید. نسخه برداری معکوس با استفاده از آنزیم MMLV (USB) و آغازگر Oligo dT انجام گرفت. qPCR با استفاده از SYBR Green mix (ABI) انجام گرفت. ترکیب واکنش ها بطور مجزا در سه تکرار برای ژن مورد نظر و ژن پایه GAPDH تهیه شد. واکنش qPCR در حجم ۱۰ μL انجام گرفت. شرایط واکنش شامل واسرشتی ابتدایی در ۹۵°C به مدت ۱۰ دقیقه به همراه ۴۵ چرخه PCR بود (مرحله واسرشت سازی: ۹۵°C برای ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال آغازگرها: میزان دما بر اساس هر ژن در جدول ۱ آمده است و به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله تکثیر رشته: ۷۵°C به مدت ۳۰ ثانیه). محاسبات بر اساس روش ΔΔCt انجام پذیرفت و از ژن GAPDH به منظور بهینه سازی استفاده گردید. توالی آغازگرهای پیشرو و پیرو ژنهای مورد آزمایش در جدول ۱ آمده است.

1- Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline

2- Immunocytochemical Analysis

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده به منظور انجام qPCR

نام ژن	توالی	دمای اتصال	تعداد بازهای محصول	شماره دسترسی از بانکهای اطلاعاتی
SOX2	F-5'CGTGGTTACCTCTTCTTCC3' R-5'CTGGTAGTGCTGGGACAT3'	60	139	GQ85388
OCT3/4	F-5'TTGCAGCTCAGTTTCAAG3' R-5'GTTGTTGTCAGCTTCCTC3'	54	75	EU926737
NANOG	F-5'CCGAAGCATCCAACTCTAGG3' R-5'GAGACAGTGTCCGTGTCGAG3'	60	100	NM001025344.1
cMYC	F-5'CTCCTCACAGCCCGTTAGTC3' R-5'ATTTGCGGTTGTTGCCTATC3'	53	156	GU296437.1
GAPDH	F-5'TCAAGAAGGTGGTGAAGCAG3' R-5'CCCAGCATCGAAGGTAGAAG3'	57	121	GU324291.1

F: آغازگر پیشرو، R: آغازگر پیرو

تولید امبریوئید بادی و تمایز سلول‌های بنیادی

به منظور تولید امبروئید بادی، کلونی‌های سلول‌های بنیادی به اندازه‌های کوچکتر تقسیم شدن و در محیط کشت سلول‌های بنیادی حاوی ۵ درصد FBS بدون استفاده از FGF-2 و LIF به مدت ۳ روز بصورت معلق کشت شدند. پس از این مدت، به منظور تمایز سلول‌های بنیادی، امبروئید بادی‌های تولید شده به ظروف ۹۶ خانه منتقل شده و به مدت ۳ هفته کشت داده شدند، بطوری که هر ۴۸ ساعت یک بار محیط کشت تعویض می‌شد.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (SPSS 11.5, 2004) با استفاده از رویه ANOVA انجام گرفت. به منظور مقایسه میانگین ها از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

شناسایی سلول‌های بنیادی

هدف از مطالعه اخیر تولید سلول‌های بنیادی از بلاستوسیست‌های حاصل از شبیه سازی و مقایسه آنها با سلول‌های بنیادی حاصل از لقاح آزمایشگاهی بود. بدین منظور سلول‌های بنیادی بطور همزمان از هر دو منشاء تولید شدند. بنابراین اختلافی از نظر نوع محیط کشت، لایه تغذیه کننده و سایر عوامل محیطی در بین آنها وجود نداشت. سلول‌های بنیادی در فواصل زمانی معین با استفاده از شناساگرهای سطح سلولی، داخل سلولی و رنگ آمیزی آلکالین فسفاتیز شناسایی شدند (شکل ۱).

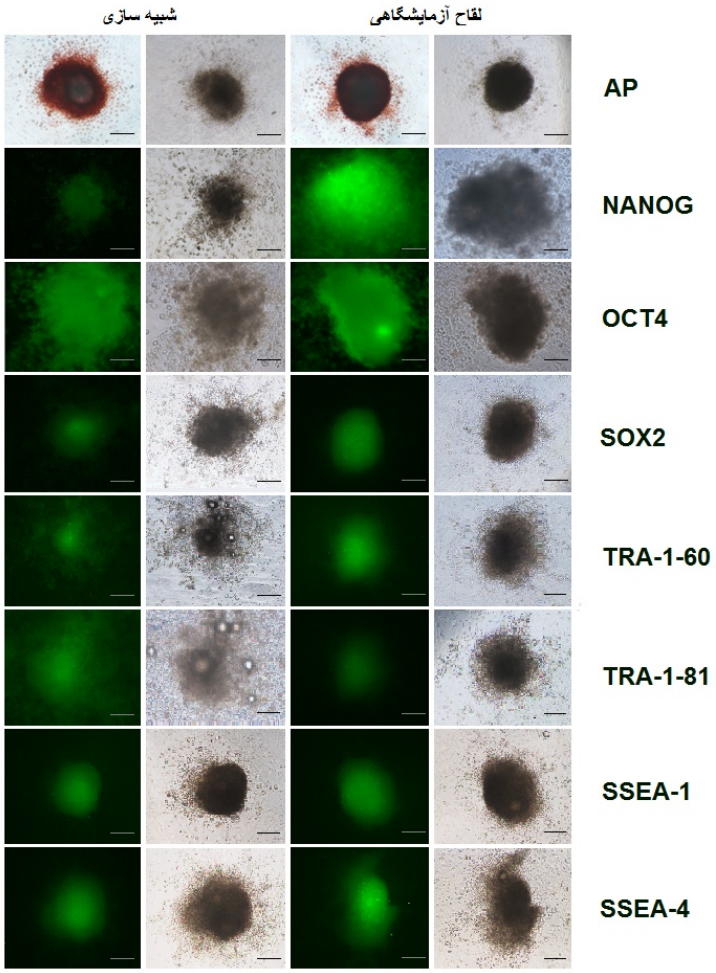
شناساگرهای سطح سلولی شامل گلایکوپروتئین‌های SSEA-1 و SSEA-4 و آنتی ژنهای کراتین فسفات TRA-1-60 و TRA-1-81 بودند. در ارتباط با سلول‌های بنیادی گاومیش، هانگ و همکاران (۱۳) بیان شناساگرهای SSEA-1، SSEA-3 و SSEA-4 را گزارش کرده بودند و این در حالی است که آناند و همکاران (۱) تنها بیان SSEA-4 را در مقایسه با SSEA-1 و SSEA-3 گزارش کردند. بطور کلی SSEA-1 تنها درسلول‌های بنیادی موش (۲) و SSEA-4 تنها در سلول‌های بنیادی انسان (۷) بیان می‌شوند. دلیل وجود چنین اختلافی هنوز به خوبی مشخص نیست.

تشکیل کلونی و سرعت رشد سلول‌های بنیادی

مدت زمان تشکیل کلونی پس از کاشت لایه زاینده داخلی بلاستوسیست‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی در حدود ۸ تا ۱۲ روز بود. در حالی که این زمان برای بلاستوسیست‌های حاصل از شبیه سازی در حدود ۱۰ تا ۱۵ روز به طول انجامید. میانگین تشکیل تعداد کلونی اولیه بطور معنی داری در سلول‌های بنیادی حاصل از لقاح آزمایشگاهی بیشتر از نوع شبیه سازی آن بود (به ترتیب ۲/۲ ±۵۴/۲۳ و ۳/۲۳±۳۶/۴۳) (P<۰/۰۵) (جدول ۲). نتایج متفاوتی در ارتباط با میانگین تشکیل تعداد کلونی در بین حیوانات مختلف گزارش گردیده است. بطوری که این میزان در گاومیش ۵۲ درصد تا ۶۱ درصد (۸، ۱۰، ۲۳ و ۲۴)، در گاو ۴۱/۲ درصد (۲۷) و در بز ۶۶/۶ (۲۸) می‌باشد. این اختلاف بخصوص در مورد گاومیش می‌تواند به اختلاف روش کار میان آزمایشگاه ها و محیط‌های کشت مرتبط باشد.

سلول‌های بنیادی حاصل از شبیه سازی سرعت رشد کمتری در مقایسه با سلول‌های بنیادی حاصل از لقاح آزمایشگاهی داشتند (به ترتیب ۶۵ درصد در مقایسه با ۱۲۰ درصد)، بطوری که هردو نوع در یک زمان کشت شدند، با این وجود زمانی که سلول‌های بنیادی حاصل از لقاح آزمایشگاهی به پاساژ ۱۰۰ رسیدند، سلول‌های بنیادی حاصل از شبیه سازی در پاساژ ۶۹ بودند (جدول ۲).

نتایج حاصل از پژوهش اخیر نشان داد، نه تنها نرخ تشکیل کلونی در سلول‌های بنیادی حاصل از شبیه سازی با نوع لقاح آزمایشگاهی آن متفاوت است، بلکه سلول‌های بنیادی حاصل از شبیه سازی سرعت رشد کمتری را نسبت به سلول‌های بنیادی حاصل از لقاح آزمایشگاهی دارند و مؤید نتایج گزارش مظفر و همکاران (۱۰) می‌باشد.



شکل ۱- آلکالین فسفاتیز(AP) و رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس برای شناساگرهای NANOG، OCT4، SOX2، TRA-1-60، TRA-1-81 ، SSEA-1 و SSEA-4 به منظور شناسایی سلول‌های بنیادی رویانی گاومیش حاصل از لقاح آزمایشگاهی و شبیه سازی (خط مقیاس 100µm)

جدول ۲- تشکیل کلونی و سرعت رشد سلول‌های بنیادی حاصل از لقاح آزمایشگاهی و شبیه سازی

منشاء	مدت زمان تشکیل کلونی اولیه (روز)	میانگین تشکیل کلونی اولیه (میانگین± خطای استاندارد)	سرعت رشد (بر اساس تعداد کلونی در هر پاساژ)(٪)	تعداد پاساژ
لقاح آزمایشگاهی	۸ تا ۱۲ روز	۵۴/۲۳± ۲/۲[a]	۱۲۰	۱۰۰
شبیه سازی	۱۰ تا ۱۵ روز	۳۶/۴۳±۳/۲۳[b]	۶۵	۶۹

b,a- میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی دار می‌باشند (P <۰/۰۵)

بطوری که کلونی‌های حاصل از شبیه سازی نیاز به مدت زمان بیشتری برای اتصال به لایه تغذیه کننده دارند. به نظر می‌رسد تفاوت کیفیت بلاستوسیست در بین دو روش مورد مطالعه در سرعت تشکیل کلونی مؤثر باشد. رایبی آیرو و همکاران (۲۷) گزارش کردند، با استفاده از روش HMC می‌توان بلاستوسیست بیشتری تولید کرد. به طوری که در این روش از دو تخمک به منظور تولید یک بلاستوسیست استفاده می‌شود و این عمل منجر به افزایش محتوای سایتوپلاسمی و تعداد بیشتر سلول می‌شود. واجیتا و همکاران (۱۱) نشان دادند، رویان هایی که سرعت رشد بیشتری دارند، تعداد سلول بیشتر، نسبت لایه زاینده داخلی با تروفکتودرم بالاتر و احتمال

بیشتری برای رسیدن به مرحله بلاستوسیت دارند.

اگرچه بلاستوسیست‌های حاصل از شبیه سازی کیفیت بهتری با توجه به تعداد بیشتر سلول و دستیابی بیشتر به مرحله بلاستوسیست داشتند، نتایج نشان داده است، گوساله‌های حاصل از شبیه سازی قدرت زنده مانی کمتری نسبت به لقاح آزمایشگاهی دارند. از مهمترین عوامل در این زمینه می‌توان به تفاوت متیلاسیون و استیلاسیون در این رویان ها اشاره کرد. بطوری که میزان متیلاسیون به علت استفاده از سلول بدنی در تولید رویان‌های شبیه سازی شده بیشتر از لقاح آزمایشگاهی می‌باشد (۳۶). بنابراین به منظور مقایسه کیفیت بلاستوسیست‌های حاصل از شبیه سازی با لقاح آزمایشگاهی، نیاز به تکنیک‌های دیگری از جمله قابلیت زنده مانی قبل و بعد از تولد و انجام آزمایشاتی در جهت شناسایی عوامل مؤثر در کیفیت رویان می‌باشد.

مورفولوژی سلول‌های بنیادی

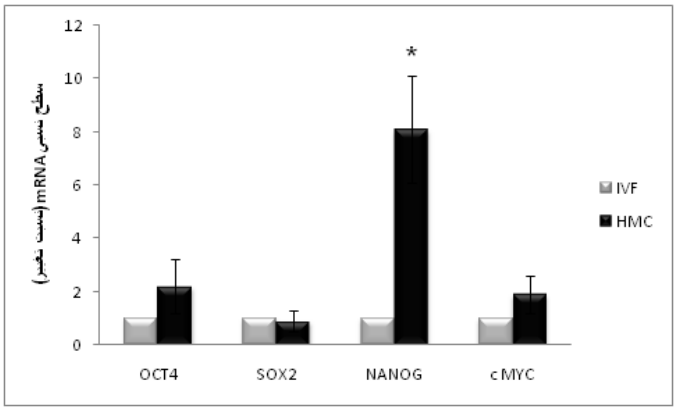
نتایج مطالعه اخیر نشان داد، کلونی‌های حاصل از منشاء شبیه سازی همانند نوع لقاح آزمایشگاهی آن کاملا فشرده، چند لایه و گرد هستند، بطوری که تمایز در آنها از قسمت اطراف کلونی انجام می‌پذیرفت. این نتایج با نتایج مظفر و همکاران (۲۱) در مورد گاومیش و ونگ و همکاران (۴۰) در مورد گاو مطابقت داشت. در حالی که برخی گزارشات از تشکیل سلول‌های بنیادی بصورت صفحه تک لایه ای در مورد گوسفند حکایت دارد (۳ و ۲۰).

مقایسه بیان ژن‌های پرتوانی بین سلول‌های بنیادی حاصل از لقاح آزمایشگاهی و شبیه سازی

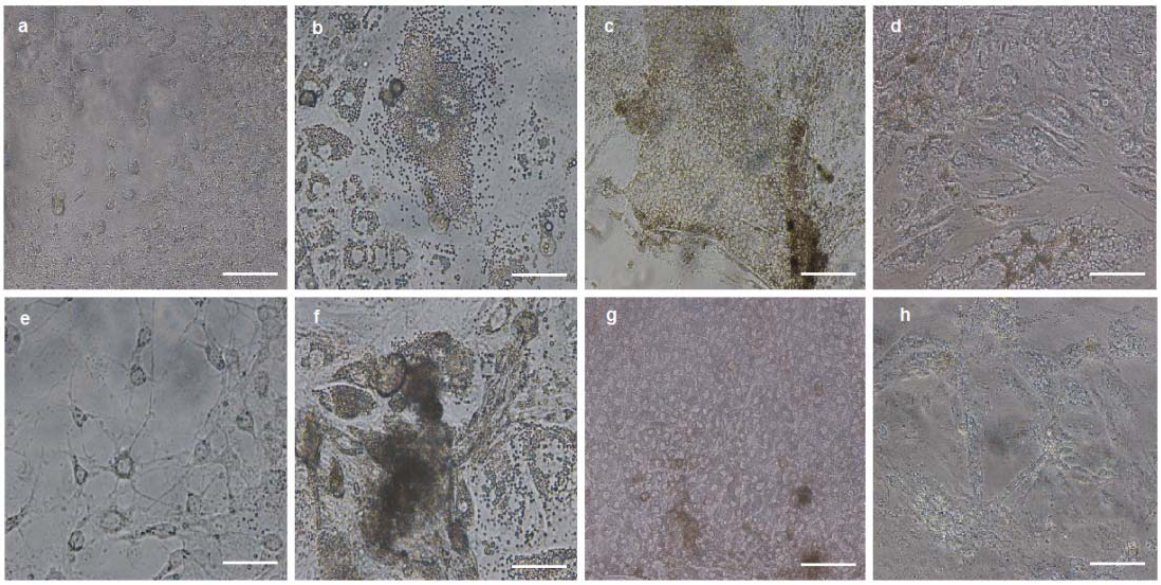
فراوانی نسخه‌های mRNA ژنهای پرتوانی OCT4، SOX2، cMYC و NANOG بین سلول‌های بنیادی حاصل از لقاح آزمایشگاهی و شبیه سازی در شکل ۲ آمده است. نتایج حاصل از qPCR نشان داد، اختلاف معنی داری در بیان ژن‌های OCT4، SOX2 و cMYC بین سلول‌های بنیادی حاصل از لقاح آزمایشگاهی و شبیه سازی وجود ندارد ($P>0/05$)، اما بیان ژن NANOG بطور معنی داری ($P<0/05$) در سلول‌های بنیادی حاصل از شبیه سازی بیشتر بود (شکل ۲). اگر چه سلول‌های بنیادی حاصل از شبیه سازی کیفیت ضعیف تری نسبت به گروه شاهد بر اساس تشکیل کلونی اولیه و سرعت رشد داشتند با این وجود ژن NANOG بیان بیشتری در این سلول ها داشت. این نتایج با مشاهدات مظفر و همکاران (۲۱) نیز مطابقت داشت. افزایش بیان NANOG منجر به حفظ پرتوانی و ممانعت از تمایز در سلول‌های بنیادی موش و انسان می‌شود (۲۳).

تمایز سلول‌های بنیادی

مطالعات مربوط به تمایز سلول‌های بنیادی نشان داد، سلول‌های بنیادی گاومیش از هر دو منشاء قابلیت تشکیل امبروئید بادی و تمایز به انواعی از سلول ها، از جمله سلول‌های بافت‌های عصبی، پوششی، عضلانی و کبدی را داشتند. تشکیل امبروئید بادی برای اولین بار در موش با استفاده از روش کشت معلق در سال ۱۹۸۵ توسط دوتسچمن و همکاران (۵) گزارش شد. پس از آن در دیگر گونه ها مانند گاو (۳۹) گاومیش (۱)، گوسفند (۴) و انسان (۲۶) گزارش شد. امبروئید بادی ها ساختارهای کروی هستند که پس از پایان کشت معلق و اتصال به سطح پتری دیش، به لایه‌های رویانی برون پوست، میان پوست و درون پوست تبدیل می‌شوند (۱۵).



شکل ۲- بیان ژن‌های پرتوانی در سلول‌های بنیادی حاصل از لقاح آزمایشگاهی و شبیه سازی با استفاده از qPCR (IVF: سلول‌های بنیادی حاصل از لقاح آزمایشگاهی، HMC: سلول‌های بنیادی حاصل از شبیه سازی با استفاده از روش HMC)



شکل ۳- تمایز سلول‌های بنیادی حاصل از لقاح آزمایشگاهی (ردیف بالا) و شبیه سازی (ردیف پایین) به سلول‌های عصبی (a و e)، سلول‌های کبدی(b و f)، سلول‌های بافت پوششی (c و g) و سلول‌های بافت عضلانی(d و h)

بنابر این، در مطالعه اخیر سلول‌های بنیادی رویانی با موفقیت از بلاستوسیست‌های حاصل از شبیه سازی تولید شدند و برای مدت طولانی (نزدیک به دو سال) در محیط کشت باقی ماندند. این سلول‌ها سرعت رشد کمتری در مقایسه با سلول‌های بنیادی رویانی حاصل از لقاح آزمایشگاهی داشتند، با این وجود قابلیت پرتوانی، خودنوسازی[1] و تمایز به امبروئید بادی و سلول‌های مختلف را در خود حفظ کردند. با توجه به محدودیت‌های تولید سلول‌های بنیادی رویانی با استفاده از لقاح آزمایشگاهی در انسان، شبیه سازی می‌تواند به عنوان یک روش جایگزین مطرح باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از پروفسور مان ماهان سینگ چوهان که با حمایت‌های خود در انجام این پروژه ما را همراهی نمودند کمال تشکر را داریم.

منابع

1- Anand, T., D. Kumar, M. K. Singh, R. A. Shah, M. S. Chauhan, R. S. Manik, S. K. Singla, and P. Palta. 2011. Buffalo (Bubalus bubalis) embryonic stem cell-like cells and preimplantation embryos exhibit comparable expression of pluripotencyrelated antigens. Reproduction in Domestic Animals. 46:50–58.
2- Chauhan, M. S., S. K. Singla, P. Palta, R. S. Manik, and M. L. Madan. 1998. In vitro maturation and fertilization and subsequent development of buffalo (Bubalus bubalis) embryo: Effect of oocyte quality and type of serum. Reproduction, Fertility, and Development. 10:173-177.
3- Cibelli, J. B., S. L. Stice, P. J. Golueke, J. J. Kane, J. Jerry, C. Blackwell, F. A. Ponce de leon, and J. M. Robl. 1998. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. Nature Biotechnology. 16:642–646.
4- Dattena, M., B. Chessa, D. Lacerenza, C. Accardo, S. Pilichi, L. Mara, F. chessa, L. Vincenti, and P. Cappai. 2006. Isolation, culture and charecterization of embryonic cell lines from vitrified sheep blastocysts. Molecular Reproduction and Development. 31:31–39.
5- Doetschman, T., P. Williams, and N. Maeda. 1988. Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells. Developmental Biology. 127:224–227.
6- Doetschman, T.C., H. Eistetter, M. Katz, W. Schmidt, and R. Kemler. 1985. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. Journal of

1- Self Renewal

Embryology & Experimental Morphology. 87:27–45.
7- Draper, J. S., C. Pigott, J. A. Thomson, and P. W. Andrews. 2002. Surface antigens of human embryonic stem cells: changes upon differentiation in culture. Journal of Anatomy. 200:249–258
8- Du, Z., S. Vincent-Naulleau, H. Gilbert, F. Vignoles, F. Crechet , T. Shimogiri, H. Yasue, J. J. Leplat and S. Bouet. 2007. Detection of novel quantitative trait loci for cutaneous melanoma by genome-wide scan in the MeLiM swine model. International Journal of Cancer. 120:303-320.
9- Durcova, G., M. Yanaguchi, S. Takahashi and H. Imai. 1998. Immunomagnetic isolation of mouse embryonic stem cells from hererogeneous cell population. Journal of Reproduction and Development. 44:85-89.
10- First, N. L., M. M. Sims, S. P. Park, and M. J. Kent-First. 1994. Systems for production of calves from cultured bovine embryonic cells. Reproduction, Fertility and Development. 6:553–562.
11- George, A., R. Sharma, K. P. Singh, K. S. Panda, S. K. Singla, P. Palta, R. Manik, and M. S. Chauhan. 2011. Production of Cloned and Transgenic Embryos Using Buffalo (Bubalus bubalis) Embryonic Stem Cell-Like Cells Isolated from In Vitro Fertilized and Cloned Blastocysts. Cell Reprogramming. 13: 263-272.
12- Gong, G., M. L. Roach, L. Jiang, X. Yang, and X. C. Tian. 2010. Culture conditions and enzymatic passaging of bovine ESC-like cells. Cell Reprogramming. 12:151–160.
13- Huang, B., T. Li, X. L. Wang, T. S. Xie, Y. Q. Lu, F. M. da Silva, and D. S. Shi. 2010. Generation and characterization of embryonic stem-like cell lines derived from in vitro fertilization Buffalo (Bubalus bubalis) embryos. Reproduction in Domestic Animals. 45:122–128.
14- Iannaccone, P. M., G. U. Taborn, R. L. Garton, M. D. Caplice, and D. R. Brenin. 1994. Pluripotent embryonic stem cells from the rat are capable of producing chimeras. Developmental Biology. 163:288–292.
15- Itskovitz-Eldor, J., M. Schuldiner, D. Karsenti, A. Eden, O. Yanuka, M. Amit, H. Soreq, and N. Benvenisty. 2000. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers. Molecular Medicine. 6:88-95.
16- Keefer, C. L., C. N. Karatzas, A. Lazaris-Karatzas, I. Gagnon, S. Poulin, and B. R. Downey. 1996. Isolation and maintanance of putative embryonic stem cells derived from Nigerian dwarf goat embryos. Biology of Reproduction. 54: 462.
17- Lagutina, I., G. Lazzari, R. Duchi, S. Colleoni, N. Ponderato, P. Turini, G. Crotti, and C. Galli. 2005. Somatic cell nuclear transfer in horses: effect of oocyte morphology, embryo reconstruction method and donor cell type. Reproduction 130:559–567.
18- Lan, G. C., Z. L. Chang, M. J. Luo, Y. L. Jiang, D. Han, Y. G. Wu, Z. B. Han, S. F. Ma, and J. H. Tan. 2006. Production of cloned goats by nuclear transfer of cumulus cells and long-term cultured fetal fibroblast cells into abattoir-derived oocytes. Molecular Reproduction and Development. 73:834-840.
19- Loi, P., C. Galli, and G. Ptak. 2007. Cloning of endangered mammalian species: any progress? Trends in Biotechnology. 25:195-200.
20- Mitalipova, M., Z. Beyhan, and N. L. First, 2001. Pluripotency of bovine embryonic cell line derived from precompacting embryos. Cloning 3:59–67.
21- Muzaffar, M., N. L. Selokar, K. P. Singh, M. Zandi, M. K. Singh, R. A. Shah, M. S. Chauhan, S. K. Singla, P. Palta, and R. Manik. 2012. Equivalency of Buffalo (Bubalus Bubalis) Embryonic Stem Cells Derived From Fertilized, Parthenogenetic and Handmade cloned Embryos. Cell Reproduction. 14:267-279.
22- Notarianni, E., C. Galli, S. Laurie, R. M. Moor, and M. J. Evans. 1991. Derivation of pluripotent, embryonic cell lines from the pig and sheep. Journal of Reproduction and Fertility. 43:255–260.
23- Pan, G. and J. A. Thomson, 2007. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. Cell Research 1-8
24- Pawar, S. S., D. Malakar, A. K. De, and Y. S. Akshey. 2009. Stem cell-like outgrowths from in vitro fertilized goat blastocysts. The Indian Journal of Experimental Biology. 47:635–642.
25- Peura, T. T., I. M. Lewis, and A.O. Trounson. 1998. The effect of recipient oocyte volume on nuclear transfer in cattle. Molecular Reproduction and Development. 50:185-191
26- Reubinoff, B. E., M. F. Pera, C. Y. Fong, A. Trouson, and A. Bongso. 2000. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. Nature Biotechnology. 18:399–404.
27- Ribeiro, E. S., R. P. Gerger, L. U. Ohlweiler, I. J. Ortigari, J. C. Mezzalira, F. Forell, L. R. Bertolini, J. L. Rodriques, C. E. Ambrosio, M. A. Miqlino, A. Mezzalira and M. Bertolini. 2009. Developmental potential of bovine handmade clone embryos reconstructed by aggregation or fusion with distinct cytoplasmic volumes. Cloning Stem Cells. 11:377–386.
28- Saito, S., H. Ugai, K. Sawai, Y. Yamamoto, A. Minamihashi, K. Kurosaka, Y. Kobayashi, T. Murata, Y. Obata, and K. Yokoyama. 2002. Isolation of embryonic stem-like cells from equine blastocysts and their differentiation in vitro. FEBS. Letters. 531:389–396.
29- Schoonjans, L., G. M. Albright, J. L. Li, D. Collen, and R. W. Moreadith. 1996. Pluripotential rabbit embryonic stem (ES) cells are capable of forming overt coat color chimeras following injection into blastocysts. Molecular Reproduction & Development. 45:439–443.

30- Shah, R. A., A. George, M. K. Singh, D. Kumar, T. Anand, M. S. Chauhan, R. S. Manik, P. Palta, and S. K. Singla. 2009. Pregnancies established from handmade cloned blastocysts reconstructed using skin fibroblasts in buffalo (Bubalus bubalis). Theriogenology. 71:1215-1219.
31- Sharma, R., A. George, N. M. Kamble, K. P. Singh, M. S. Chauhan, R. S. Manik, S. K. Singla, and P. Palta. 2011. Optimization of culture conditions to support long-term self-renewal of buffalo (bubalus bubalis) embryonic stem cell-like cells. Cell. Reprogram. 13:539-549.
32- Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda and S. Yamanaka. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell. 131:861–872.
33- Tecirlioglu, R. T., M. A. Cooney, I. M. Lewis, N. A. Korfiatis, R. Hodgson, N. T. Ruddock, G. Vaita, S. Downie, A. O. Trounson, M. K. Holland, and A. J. French. 2005. Comparison of two approaches to nuclear transfer in the bovine: handmade cloning with modifications and the conventional nuclear transfer technique. Reproduction, Fertility, and Development. 17:573-585.
34- Trounson, A., 2006. The Production and Directed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. Endocrine Reviews. 27:208-219.
35- Vajta, G., I. M. Lewis, A. O. Trounson, S. Purup, P. Maddox-Hyttel, M. Schmidt, H. G. Pedersen, T. Greve, and H. Callesen. 2003. Handmade somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing to high efficiency in vitro. Biology of Reproduction. 68:571–578.
36- Vajta, G., I. M. Lewis, P. Hyttel, G. A. Thouas, and A. O. Trounson. 2001. Somatic cell cloning without micromanipulators, Cloning. 3:89-95.
37- Vajta, G., P. Bartels, J. Joubert, M. D. L. Rey, R. Treadwell, and H, Callesen. 2004. Production of a healthy calf by somatic cell nuclear transfer without micromanipulators and carbon dioxide incubators using the Handmade Cloning (HMC) and the Submarine Incubation System (SIS). Theriogenology, 62:1465-1472.
38- Verma, V., S. K. Gautam, B. Singh, R. S. Manik, P. Palta, S. K. Singla, S. L. Goswami, and M. S. Chauhan. 2007. Isolation and characterization of embryonic stem cell-like cells from in vitroproduced buffalo (Bubalus bubalis) embryos. Molecular Reproduction and Development. 74:520–529.
39- Wang, L., E. Duan, L. Y. Sung, B. S. Jeong, X. Yang, and X. C. Tian. 2005. Generation and characterization of pluripotent stem cells from cloned bovine embryos. Biology of Reproduction. 73:149-155.
40- Yadav, P. S., W. A. Kues, D. Herrmann, J. W. Carnwath, H. Niemann. 2005. Bovine ICM derived cells express the Oct4 ortholog. Molecular Reproduction and Development. 72:182–190.