

سری درسنامه‌های صفر تا صد سلول‌های بنیادی

درسنامه شانزدهم

در این درسنامه به نحوه کشت سلول‌های بنیادی پرتوان خواهیم پرداخت.

سلول‌های بنیادی پرتوان توانایی خودنوزایی و تمایز به تمامی سلول‌های بدن را دارند. کشت و تکثیر این سلول‌ها به صورت پایدار و بدون تغییر در ویژگی‌های پرتوانی یکی از چالش‌های اساسی در پژوهش‌های زیست‌پزشکی و مهندسی بافت است.

به منظور حفظ این ویژگی‌ها، روش‌های متنوعی برای کشت سلول‌های بنیادی پرتوان توسعه یافته‌اند که هر کدام مزایا و محدودیت‌های خاص خود را دارند. این روش‌ها به طور کلی به سه دسته اصلی تقسیم می‌شوند:

۱. **کشت وابسته به سلول‌های تغذیه‌کننده:** در این روش، سلول‌های بنیادی روی یک لایه فیبروبلاستی (مانند MEF) رشد می‌کنند که فاکتورهای مورد نیاز برای حفظ پرتوانی را ترشح می‌کند.

۲. **کشت بدون سلول تغذیه‌کننده:** در این روش، سلول‌های بنیادی در محیط‌های کشت شیمیایی تعریف شده (مانند mTeSR1 یا Essential8) و روی بسترهای مصنوعی مانند ماتریژل یا پروتئین‌های نو ترکیب رشد می‌کنند.

۳. **کشت در سیستم‌های تعلیقی و سه بعدی (Suspension & 3D Culture):** این روش‌ها شامل کشت سلول‌ها به صورت شناور در محیط مایع، روی میکروکریرها یا در هیدروژل‌ها برای ایجاد محیطی مشابه بافت‌های طبیعی هستند.

❖ انتخاب روش کشت مناسب، بستگی به هدف تحقیقاتی، نیازهای تغذیه‌ای سلول‌ها و امکان استفاده برای کاربردهای بالینی دارد. در این درسنامه، به بررسی جامع روش‌های مختلف کشت سلول‌های بنیادی پرتوان، نحوه آماده‌سازی محیط‌های کشت و چالش‌های مرتبط با هر روش خواهیم پرداخت.

کشت وابسته به سلول‌های تغذیه‌کننده (Feeder-Dependent Culture)

1. فیبروبلاست‌های تغذیه‌کننده جنینی موش (MEF)

- نقش و اهمیت MEF در کشت سلول‌های بنیادی پرتوان

فیبروبلاست‌های تغذیه‌کننده جنینی موش (Mouse Embryonic Fibroblasts, MEFs) به‌عنوان یک لایه حمایتی در کشت استفاده می‌شوند. MEFها فاکتورهای رشد ضروری مانند عامل مهارکننده لوکمیای (LIF) در موش و $TGF-\beta$ و FGF2 در انسان را ترشح می‌کنند که برای حفظ ویژگی‌های پرتوانی سلول‌های بنیادی ضروری‌اند.

- مزایا و معایب استفاده از MEF

مزایا:

- تأمین سیگنال‌های زیستی لازم برای خودنوسازی
- پشتیبانی از اتصال و تکثیر سلول‌های بنیادی
- جلوگیری از تمایز ناخواسته

معایب:

- منبع حیوانی و احتمال آلودگی‌های زیستی
- ایجاد تنوع در نتایج آزمایش‌ها
- نیاز به غیرفعال‌سازی قبل از استفاده

- آماده‌سازی و غیرفعال‌سازی فیبروبلاست‌ها

برای جلوگیری از تکثیر MEF و حفظ نقش تغذیه‌ای آن‌ها، باید غیرفعال شوند که معمولاً از طریق پرتوگاما، میتوماکسین C یا تیمار با حرارت انجام می‌شود. پس از غیرفعال‌سازی، MEFها در ظروف کشت قرار داده شده و به‌عنوان بستر برای کشت استفاده می‌شوند.

ویژگی‌ها	ترکیبات اصلی	محیط کشت
پایداری بالا، مناسب برای کشت طولانی مدت	انسولین، اسیدهای آمینه، LIF, FGF2	mTeSR1
کاهش هزینه و حداقل سازی ترکیبات	۸ ترکیب اصلی شامل FGF2 و ویتامین C	Essential 8
حفظ پرتوانی در شرایط استرس سلولی	پروتئین‌های نو ترکیب، فاکتورهای رشد، آنتی اکسیدان‌ها	StemFlex

- مراحل آماده‌سازی فیبروبلاست‌های تغذیه‌کننده

۱. استخراج فیبروبلاست‌ها از جنین موش یا بافت انسانی

۲. غیرفعال سازی فیبروبلاست‌ها (پرتوگاما، میتومايسين C)

۳. پوشش‌دهی ظروف کشت با MEF

۴. تلقیح سلول‌های بنیادی روی بستر فیبروبلاست‌ها

- چالش‌ها و محدودیت‌ها

آلودگی بین‌گونه‌ای: فیبروبلاست‌های موشی ممکن است باعث انتقال ترکیبات ناهمگون شوند.

تنوع زیاد: هر دسته از MEFها ممکن است ترکیبات متفاوتی ترشح کند.

❖ فرآیند آماده‌سازی زمان‌بر است.

2. فیبروبلاست‌های تغذیه‌کننده انسانی

برای کاهش مشکلات مربوط به ناهمگونی محیط کشت و امکان آلودگی بین‌گونه‌ای، فیبروبلاست‌های انسانی جایگزین MEF شده‌اند. این سلول‌ها معمولاً از منابع زیر تهیه می‌شوند:

- فیبروبلاست‌های جنینی انسانی (HEF)

سلول‌های استرومایی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان یا بافت چربی

مهم‌ترین تفاوت این سلول‌ها با MEF در پروتئین‌های ماتریکس خارج‌سلولی و فاکتورهای رشد ترشحی است که برای سلول‌های بنیادی انسانی مناسب‌ترند.

- کاربرد در محیط‌های مناسب برای سلول‌های انسانی:

در کشت ESC‌های انسانی برای به حداقل رساندن مشکلات ایمونولوژیک

در مدل‌سازی بیماری‌های انسانی با استفاده از iPS

❖ علاوه بر MEF و HEF، سلول‌های تغذیه‌کننده دیگری نیز به‌عنوان جایگزین پیشنهاد شده‌اند. سلول‌های اندوتلیالی مشتق از بند ناف (HUVEC) و سلول‌های استرومایی مشتق از جفت (PMSCs) به دلیل توانایی آن‌ها در ترشح فاکتورهای رشد ضروری، کاهش اثرات ایمنی و افزایش بازدهی کلونی‌زایی، سلول‌های بنیادی پرتوان مورد توجه قرار گرفته‌اند. این جایگزین‌ها به‌ویژه در تحقیقات بالینی و کشت‌های بدون آلودگی حیوانی (xeno-free) اهمیت دارند.

ویژگی	MEF	فیبروبلاست انسانی
منبع	جنین موش	انسانی
فاکتورهای ترشحی	LIF برای ESC‌های موشی	TGF- β و FGF2 برای ESC‌های انسانی
چالش‌ها	احتمال آلودگی بین گونه‌ای	نیاز به بهینه‌سازی محیط

منابع

تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (مروری اجمالی بر روش‌ها و تکنیک‌ها)

سلول‌های بنیادی پرتوان القایی از تولید تا کاربرد

ارزیابی روش‌های تولید سلول‌های بنیادی پرتوان