

سری درسنامه‌های صفر تا صد سلول‌های بنیادی

درسنامه هفدهم

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

کشت بدون سلول تغذیه‌کننده (Feeder-Free Culture)

محیط‌های کشت سلول‌های بنیادی پرتوان را می‌توان به دو دسته تعریف‌شده (Defined) و تعریف‌نشده (Undefined) تقسیم کرد. محیط‌های Undefined مانند ماتریژل شامل ترکیبات پیچیده‌ای با منشأ نامشخص هستند که ممکن است بین دسته‌های مختلف تغییر کنند. در مقابل، محیط‌های Defined مانند mTeSR1، Essential8 و StemFlex دارای ترکیبات مشخصی از فاکتورهای رشد، انسولین، اسیدهای آمینه ضروری و ویتامین‌ها هستند. این تفاوت بر پایداری، بازتولیدپذیری و کاربردهای بالینی تأثیر مستقیم دارد.

بسترهای مصنوعی (Synthetic Substrates)

با حذف سلول‌های تغذیه‌کننده، از بسترهای مصنوعی برای ایجاد شرایط مناسب برای اتصال و رشد سلول‌های بنیادی استفاده می‌شود.

- ماتریژل (Matrigel)

ماتریژل یک ماتریکس خارج‌سلولی مشتق‌شده از سلول‌های سرطانی موشی است که ترکیباتی مانند لامینین، کلاژن IV و فاکتورهای رشد را در خود دارد و موجب حفظ پرتوانی سلول‌ها می‌شود.

محدودیت‌های ماتریژل:

ماتریژل ترکیبی استخراج‌شده از تومورهای موشی (Engelbreth-Holm-Swarm tumor) است که ترکیبات آن ممکن است بین دسته‌های مختلف تغییر کند. این ویژگی باعث کاهش قابلیت بازتولیدپذیری (Reproducibility) در آزمایش‌ها می‌شود. به همین دلیل، در کاربردهای بالینی و تولید سلول‌های بنیادی برای درمان‌های پزشکی، ماتریژل گزینه مناسبی نیست و از بسترهای مصنوعی یا پروتئین‌های نوترکیب مانند لامینین انسانی استفاده می‌شود.

- لامینین و فیبرونکتین

این دو پروتئین کلیدی ماتریکس خارج سلولی هستند در حفظ چسبندگی، بقا و پرتوانی سلول‌های بنیادی نقش دارند.

لامینین: اتصال به اینتگرین‌های سطح سلولی و تنظیم مسیرهای پیام‌رسانی مرتبط با بقا و تکثیر.

فیبرونکتین: بهبود چسبندگی سلول‌ها از طریق تعامل با رسپتورهای سطحی.

مزایا:

- ترکیبات طبیعی ماتریکس خارج سلولی
- افزایش اتصال و بقای سلول‌های بنیادی

معایب:

- هزینه بالا
- امکان تفاوت در دسته‌های تولیدی مختلف
- پلیمرهای زیست‌سازگار

برای مدل‌سازی دقیق‌تر شرایط درون‌تنی و بهینه‌سازی محیط کشت سه‌بعدی، از پلیمرهایی مانند پلی‌اتیلن گلیکول (PEG)، پلی‌لاکتیک کوگلیکولیک اسید (PLGA) و پلی‌کاپرولاکتون (PCL) استفاده می‌شود. این پلیمرها قابل اصلاح زیستی هستند و می‌توانند چسبندگی و پرتوانی سلول‌ها را حفظ کنند.

محیط‌های کشت تعریف‌شده (Defined Medium) و جایگزین‌های MEF

StemFlex, Essential8, mTeSR1 و محیط‌های مشابه

این محیط‌های کشت بدون سلول تغذیه‌کننده شامل ترکیبات تعریف‌شده‌ای مانند $TGF-\beta$, FGF2, انسولین و اسیدهای آمینه ضروری هستند که باعث حفظ پرتوانی می‌شوند.

برای مقایسه محیط‌های کشت mTeSR1، Essential8 و StemFlex که برای سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (iPSC) استفاده می‌شوند، باید به چند جنبه کلیدی توجه کرد:

- ترکیبات کلیدی

- mTeSR1 حاوی فاکتورهای رشد مانند $TGF-\beta$ و FGF2 است که برای حفظ ویژگی‌های پرتوانی سلول‌های iPSC ضروری هستند. با این حال، برخی ترکیبات آن از منابع حیوانی مشتق شده‌اند.
- Essential8 از فقط هشت ترکیب ضروری شامل FGF2، $TGF-\beta$ ، انسولین و ویتامین B7 تشکیل شده است که محیطی کاملاً تعریف‌شده و عاری از مشتقات حیوانی (xeno-free) را فراهم می‌کند.
- StemFlex علاوه بر FGF2 و $TGF-\beta$ ، دارای فاکتورهای بقای سلولی و ترکیبات حمایتی بیشتر است که باعث افزایش پایداری محیط و کاهش استرس سلولی می‌شود. این ویژگی‌ها آن را برای کشت تک‌سلولی و پاساژهای طولانی مدت مناسب‌تر می‌باشد.

- تفاوت‌های عملکردی

- mTeSR1: این محیط، یکی از اولین محیط‌های کشت تعریف‌شده برای iPSCها بود که اجازه می‌داد سلول‌ها را در شرایط feeder-free (بدون نیاز به فیبروبلاست‌های تغذیه‌کننده) نگه داشت. با این حال، به دلیل حضور برخی ترکیبات مشتق از حیوانات، ممکن است برای مطالعات بالینی ایده‌آل نباشد.
- Essential8: به دلیل فرمولاسیون ساده و حذف پروتئین‌های حیوانی، برای کاربردهای بالینی و مطالعاتی که نیاز به محیط کاملاً تعریف‌شده (chemically defined) دارند، مناسب‌تر است. اما این محیط نسبت به تنش‌های محیطی و انبوه‌سازی (passaging) حساس‌تر است.
- StemFlex: این محیط نسبت به سایر گزینه‌ها انعطاف‌پذیری بیشتری دارد و به دلیل داشتن ترکیبات حمایتی بیشتر، پایداری بالاتری را ارائه می‌دهد. همچنین برای روش‌های کشت تک‌سلولی (single-cell passaging) گزینه بهتری محسوب می‌شود.

❖ چرا برخی محیط‌ها برای iPSC مناسب‌تر هستند؟

- ۱- اگر هدف تولید انبوه سلول برای مطالعات بالینی باشد، Essential8 مناسب‌تر است چون کاملاً xeno-free و chemically defined است.

۲- اگر پایداری و بقا در شرایط آزمایشگاهی چالش اصلی باشد، StemFlex گزینه بهتری است زیرا به دلیل حضور ترکیبات حمایتی، به حفظ سلامت سلول‌ها در شرایط کشت تک‌سلولی و پاساژهای طولانی کمک می‌کند.

۳- اگر تمرکز روی شرایط استاندارد کشت در آزمایشگاه باشد، mTeSR1 همچنان یک انتخاب محبوب است، اما ممکن است در برخی مطالعات به دلیل ترکیبات مشتق از حیوانات محدودیت ایجاد کند.

مزایا و معایب	نحوه عملکرد	روش غیرفعال سازی
سریع و موثر - ایجاد سمیت	متوقف کردن تکثیر سلولی از طریق مهار سنتز DNA	میتومايسين C
کمترین تغییرات محیطی - تجهیزات خاص	تخریب DNA و غیرفعال سازی تقسیم سلولی	پرتوگاما
ارزان و ساده - ممکن است بر عملکرد MEF اثر کند	غیر فعال سازی با دمای بالا	حرارت دهی

جدول ۳

کشت در سیستم‌های تعلیقی و سه‌بعدی (Suspension & 3D Culture)

۱- کشت به صورت توده‌های سلولی شناور (Embryoid Bodies یا EBs)

- روش‌های تشکیل EBs

Embryoid Bodies تجمعات سه‌بعدی از سلول‌های بنیادی پرتوان هستند که در شرایط تعلیقی یا بدون چسبندگی رشد می‌کنند. این ساختارها محیطی را فراهم می‌کنند که در آن سلول‌ها می‌توانند به سه لایه زایای جنینی (اکتودرم، مزودرم و اندودرم) تمایز یابند. تشکیل EB یکی از روش‌های پرکاربرد در تمایز سلول‌های بنیادی پرتوان به انواع سلول‌های اختصاصی است.

- روش‌های رایج تشکیل EBs

1. روش قطره معلق (Hanging Drop Method): در این روش، قطرات کوچکی از سوسپانسیون سلولی (معمولاً با تراکم مشخص) روی سطح داخلی درپوش پتری‌دیش قرار داده می‌شوند. پس از بسته شدن ظرف، نیروی جاذبه باعث می‌شود که سلول‌ها در قسمت تحتانی قطره تجمع کرده و EB تشکیل دهند. این روش امکان کنترل اندازه EB را فراهم می‌کند اما به مهارت و دقت بالایی نیاز دارد.

2. کشت در ظروف با سطح غیرچسبنده (Suspension Culture in Low-Adhesion Plates): در این روش، سلول‌ها در ظرفی با پوشش خاص (مانند ظروف Ultra-Low Attachment) به صورت معلق کشت داده می‌شوند. سلول‌ها به صورت خودبه‌خودی تجمع کرده و EB تشکیل می‌شود. روشی ساده و مناسب برای تولید تعداد زیادی EB است اما کنترل دقیق اندازه آن‌ها دشوار است.

3. استفاده از میکروکریرها (Microcarrier-Based Culture)

- فاکتورهای مهم در تشکیل EBs

- چگالی اولیه سلولی: تراکم بالای سلول‌ها می‌تواند منجر به تشکیل EBهای نامنظم شود.
- مدت زمان کشت: طولانی شدن زمان کشت ممکن است باعث نکروز مرکزی در EBها شود.
- ترکیب محیط کشت: حضور فاکتورهای رشد و تغییرات محیطی بر روند تمایز تأثیر می‌گذارد.

- کشت روی میکروکریرها (Microcarriers)

میکروکریرها از جنس ژلاتین، دکستران، پلی‌استایرن و PLGA ساخته شده‌اند و سطح اتصال مناسبی را برای کشت در مقیاس بالا فراهم می‌کنند.

- روش‌های برداشت سلولی

آنزیمی (Trypsin, Accutase)

غیرآنزیمی (EDTA و روش‌های مکانیکی)

سلول‌ها روی میکروکریه‌های زیست‌سازگار قرار گرفته و در شرایط چرخشی یا تعلیقی رشد می‌کنند. این روش امکان افزایش سطح کشت و کنترل تمایز را فراهم می‌کند.

۲- کشت در هیدروژل‌ها و ماتریس‌های سه‌بعدی

هیدروژل‌ها پلیمرهای آبدوست هستند که می‌توانند محیطی شبیه ماتریکس خارج‌سلولی ایجاد کنند.

- ویژگی‌های کلیدی هیدروژل‌ها:

- تنظیم سختی و الاستیسیته برای کنترل تمایز سلولی
- امکان کپسوله‌سازی سلول‌ها برای کشت سه‌بعدی
- بهبود زیست‌سازگاری و بقای سلول‌ها

مزایا:

- تقلید بهتر از محیط درون‌تنی
- افزایش کارایی تمایز سلولی

معایب:

- هزینه بالا
- دشواری در کنترل ویژگی‌های مکانیکی

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