ORIGINAL ARTICLE

Specification of Hemato-Endothelial-Like Structures and Generation of Hematopoietic Progenitor Cells from Human Pluripotent Stem Cells

Mojgan Barati[1],
Marzieh Ebrahimi[2],
Seyedeh-Nafiseh Hassani[3]

[1] PhD Student in Developmental Biology, School of Basic Sciences and Advanced Technologies in Biology, University of Science and Culture, Tehran, Iran
[2] Professor, Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran

(Received June 23, 2022 ; Accepted October 4, 2022)

Abstract

Background and purpose: Human pluripotent stem cells (hPSCs) with the ability to differentiate into adult cells have provided a new perspective for treatment of some diseases. But, the efficiency of differentiation methods to generate hematopoietic progenitor cells (HPCs) is faced with multiple challenges. In the present study, we investigated the formation of hemato-endothelial-like structures and HPCs from hPSCs.

Materials and methods: To generate hemato-endothelial structures and HPCs, in first method, three-dimensional aggregations of hPSCs were co-cultured on OP9 cells. In second and third methods, embryoid bodies (EBs) were differentiated spontaneously or directly in the culture medium containing BMP4, bFGF, SCF, and VEGF. In differentiation process, cell morphology was evaluated by microscopic observation and the expression of CD34 and CD45 markers were analyzed by flow cytometry. In addition, the ability of HPCs to differentiate into various types of blood cells was evaluated using colony formation assay, Wright-Giemsa staining, and CD86 immunofluorescence staining.

Results: Findings showed that all three methods generated cells with endothelial-like morphology and HPCs. These cells were able to proliferate, form cell clusters with different efficiency and differentiate into erythroid cells, macrophages, and dendritic cells.

Conclusion: The use of cultured cells in defined conditions without a feeder layer is preferred in cell therapy. Therefore, despite the ability of all these methods to generate HPCs, direct differentiation of EBs under defined conditions is a better option for generatingHPCs from hPSCs.

Keywords: pluripotent stem cells, hematopoietic progenitor cells, OP9 stromal cell, embryoid body

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 32 (216): 1-19 (Persian).

Corresponding Author: Seyedeh-Nafiseh Hassani- Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran. (E-mail: sn.hassani@royan-rc.ac.ir)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و دوم شماره 216 دی سال 1401 (19-1)

تخصصی شدن ساختارهای شبه هماتو-اندوتلیال و تولید سلول‌های پیش‌ساز خونی از سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی

مژگان براتی[1]
مرضیه ابراهیمی[2]
سیده نفیسه حسنی[3]

چکیده

سابقه و هدف: سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی(hPSCs) با قابلیت تمایز به سلول‌های فرد بالغ چشم‌انداز جدیدی را در درمان انواع بیماری‌ها فراهم کرده است. با این حال، بازدهی روش‌های تمایز، برای تولید سلول‌های پیش‌ساز خونی (HPCs) با چالش‌های مختلفی روبرو است. در مطالعه حاضر ما تشکیل ساختارهای شبه هماتو-اندوتلیال و پیش‌سازهای خونی از hPSCs را مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روش‌ها: برای تولید ساختارهای شبه هماتو-اندوتلیال و HPCs، در روش اول، از هم‌کشتی تجمعات سه بعدی hPSCs با سلول OP9 استفاده شد. در روش دوم و سوم، اجسام شبه جنینی(EBs) به صورت خود به خودی یا به صورت هدفمند در محیط کشت حاوی BMP4، bFGF، SCF و VEGF تمایز داده شدند. در فرآیند تمایز، مورفولوژی سلولی با مشاهده میکروسکوپی و بیان شاخص‌های CD34 و CD45 با فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. علاوه بر این، توانایی تمایز HPCs به انواع سلول‌های خونی با آزمون تشکیل کلونی، رنگ‌آمیزی رایت-گیمسا و رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت شاخص CD86 بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد از هر سه روش نام برده شده، سلول‌های با مورفولوژی شبه اندوتلیالی و HPCs حاصل شدند. این سلول‌ها با بازدهی متفاوت قابلیت تکثیر و تشکیل دستجات سلولی را داشتند و هم‌چنین سلول‌های اریتروئیدی، ماکروفاژ و سلول‌های دندریتیک از تمایز آن‌ها حاصل شدند.

استنتاج: استفاده از سلول‌های کشت داده شده در شرایط کشت با ترکیبات مشخص و بدون لایه تغذیه‌رسان در سلول درمانی ترجیح داده می‌شود. بنابراین، به رغم قابلیت تولید HPCs با هر سه روش استفاده شده، روش تمایز EBs به صورت هدفمند و در شرایط کشت با ترکیبات مشخص، گزینه بهتری برای تولید HPCs از hPSCs است.

واژه های کلیدی: سلول‌های بنیادی پرتوان، سلول‌های پیش‌ساز خونی، سلول استرومایی OP9 و اجسام شبه جنینی

مقدمه

سلول‌های بنیادی خون‌ساز با دو ویژگی خودنوزایی و تمایز در راس دودمان‌های سلول‌های خونی قرار دارند و تمام مشتقات میلوئیدی و لنفوئیدی سلول‌های خونی را تولید می‌کنند(1). این سلول‌ها در مغز استخوان و خون

مولف مسئول: سیده نفیسه حسنی - تهران: پژوهشکده زیست شناسی و فنآوری سلول‌های بنیادی جهاددانشگاهی، پژوهشگاه رویان E-mail: sn.hassani@royan-rc.ac.ir
1. دانشجوی دکتری زیست شناسی تکوینی، دانشگاه علم و فرهنگ، دانشکده علوم پایه و فنآوری‌های نوین زیستی، گروه زیست شناسی تکوینی، تهران، ایران
2. استاد، گروه سلول‌های بنیادی و زیست شناسی تکوینی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده زیست شناسی و فنآوری سلول‌های بنیادی جهاددانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران
3. استادیار، گروه سلول‌های بنیادی و زیست شناسی تکوینی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده زیست شناسی و فنآوری سلول‌های بنیادی جهاددانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران
تاریخ دریافت : 1401/4/2 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : 1401/5/2 تاریخ تصویب : 1401/7/12

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]

بندناف وجود دارند(2). پیوند آلوژنیک سلول‌های گرفته شده از مغزاستخوان برای مدت بیش از 60 سال در بیماری‌های خونی انجام شده است و همواره با چالش‌هایی از جمله وجود سازگاری HLA بین دهنده و گیرنده و رد پیوند روبرو بوده است(4،3). خون بند ناف با ویژگی منحصر به فردی که دارد می‌تواند منبع مناسبی برای پیوند این سلول‌ها باشد اما تعداد کم سلول بنیادی خون‌ساز در یک واحد خون بند ناف، استفاده از آن را محدود می‌کند(4). این سلول‌ها در طی چند پاساژ، توانایی خودنوزایی خود را از دست می‌دهند. بنابراین رسیدن به تعداد کافی از آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی چالش برانگیز است(1). در سال‌های اخیر، استفاده از کوچک مولکول‌ها توانسته است کمک زیادی به تکثیر این سلول‌ها نماید. با این حال، به علت این که مجموعه‌ای از مسیرهای پیام‌رسانی بر سرنوشت سلول بنیادی خون‌ساز تاثیر می‌گذارند و این سلول ممکن است خیلی سریع به سمت یک رده سلولی خاص تمایز پیدا کند، نیاز است همزمان چند مسیر پیام‌رسانی مورد هدف یا تنظیم قرار گیرد. بنابراین هنوز تا رسیدن به محیط کشتی که بتواند خودنوزایی این سلول‌ها را حفظ کند زمان لازم است(4). از این‌رو یک منبع جایگزین برای سلول‌های بنیادی خون‌ساز می‌تواند مزیت زیادی در پزشکی بازساختی و درمان‌های جایگزین سلولی اتولوگ داشته باشد(6،5).

سلول‌های بنیادی پرتوان با توانایی خودنوزایی و تمایز به انواع سلول‌های بدن یک فرد بالغ، منبع اولیه بسیار خوبی برای تمایز به سلول‌های بنیادی خون‌ساز هستند. این سلول‌ها را می‌توان از توده سلولی داخلی جنین مرحله بلاستوسیست و سلول‌های سوماتیک طی فرآیند باز برنامه نویسی به‌دست آورد(7). استفاده از سلول‌های بنیادی پرتوان برای تولید سلول‌های خونی یک ابزار تجربی برای مطالعه روند خون‌سازی، مدل بیماری و کشف دارو فراهم کرده و پتانسیل درمانی فوق‌العاده‌ای برای اختلالات خونی دارد(8). در جنین، سلول‌های بنیادی خون‌ساز از یک ساختار هماتو-اندوتلیال به نام هموژنیک اندوتلیوم منشا می‌گیرند و در طی پروسه‌ای به نام گذار از اندوتلیال به خون، سلول‌های خونی تولید می‌شوند. بنابراین تولید سلول‌های اندوتلیال با ویژگی خون‌سازی در آزمایشگاه از اهمیت بسیاری برخوردار است(5). شناسایی سایتوکاین‌ها و مورفوژن‌های این مسیر طی تکوین جنین و شبیه‌سازی آن‌ها در محیط آزمایشگاهی کمک شایانی برای تمایز سلول‌های بنیادی پرتوان به سلول‌های هماتو-اندوتلیال و در نهایت تولید سلول‌های خونی کرده است(10،9). در مطالعات نشان داده شده است که سلول‌های استرومایی موجود در هر بافت به‌طور اختصاصی با توانایی ترشح سایتوکاین‌ها، فاکتورهای رشد و پروتئین‌های تشکیل دهنده بستر خارج سلولی از رشد، تکثیر و تمایز سلول‌ها در شرایط درون‌تنی حمایت می‌کنند(12،11). بازسازی این شرایط درمحیط آزمایشگاهی را می‌توان با هم‌کشتی سلول‌های استرومایی با سلول‌های بنیادی پرتوان فراهم کرد(14،13). یکی از سلول‌های استرومایی که برای تمایز سلول‌های خونی استفاده می‌شود سلول‌های استرومایی مستخرج از مغز استخوان موش است. این سلول‌ها به دلیل ترشح فاکتور محرک کلونی ماکروفاژی (M-CSF)، با ایجاد سلول‌های ماکروفاژی در لنفوپوئزیس تداخل ایجاد می‌کنند(15). به این دلیل در بسیاری از مطالعات از سلول‌های استرومایی OP9 که از موش دارای بیماری استئوپتروزیس حاصل شده و M-CSF ترشح نمی‌کند برای تولید سلول‌های خونی استفاده شده است(16). نتایج هم‌کشتی نشان داده است که سلول‌های حاصل، ژن‌های اختصاصی هماتو-اندوتلیال را بیان و ساختارهای هماتو-اندوتلیال را شبیه‌سازی می‌کنند(20-17). استفاده از سلول‌های استرومایی به رغم بازدهی بالا در تولید سلول‌های پیش‌ساز خونی با چالش محدودیت استفاده در پزشکی بازساختی مواجه است(21).

سلول‌های بنیادی پرتوان با توانایی ایجاد اجسام شبه جنینی اجازه‌ی تمایز سلول‌های خون‌ساز را در شرایط برون‌تنی فراهم کرده است(22). این اجسام توده‌های سه

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]

بعدی سلولی هستند که ازمراحل تکوین جنین تقلید می‌کنند و هر سه لایه زایای اکتودرمی، مزودرمی و اندودرمی در آن‌ها شکل می‌گیرد(24،23). استفاده از اجسام شبه جنینی می‌تواند بر بازدهی تمایز اثر بگذارد(25). قرارگیری این ساختارها در شرایط مناسب می‌تواند منجر به تمایز هدفمند سلول‌های بنیادی پرتوان به سلول‌های مورد نظر شود(27،26) در مطالعات نشان داده شده، دست ورزی مسیرهای پیام‌رسانی BMP، WNT (30-28) و رتینوئیک اسید(32،31) می‌تواند ساختارهای هماتو-اندوتلیال را از اجسام شبه جنینی تشکیل دهد.

در مطالعه حاضر تشکیل ساختارهای شبه هماتو-اندوتلیال با کشت سلول‌های پرتوان با لایه تغذیه‌رسان OP9 و با تشکیل اجسام شبه‌جنینی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این سلول‌ها توانایی شکل‌گیری ساختارهای شبه هماتو-اندوتلیال را دارند. همچنین سلول‌های پیش‌ساز خونی رها شده از این ساختارها می‌توانند به دودمان‌های خونی تمایز پیدا کنند.

مواد و روش ها

این مطالعه بر اساس مصوبه کمیته اخلاق پزشکی (کد اخلاق: IR.ACECR.ROYAN.REC.1395.25) و پژوهشگاه رویان انجام شده است.

کشت سلول

کشت سلول‌های فیبروبلاست جنینی موشی

سلول‌های فیبروبلاست جنینی موشی از جنین 12/5 روزه موش نژاد NMRI با روش مکانیکی در محیط کشت سلول‌های فیبروبلاستی تهیه شد. این محیط شامل محیط کشت پایه DMEM دارای غلظت بسیار بالای گلوکز به همراه بی‌کربنات سدیم، پنی‌سیلین (100 U/ml) استرپتومایسین (100 ng/ml)، بتامرکاپتواتانول (0/1mM)، گلوتامین (2mM) و سرم جنینی گاو (15درصد, FBS) است. برای استفاده از سلول‌های فیبروبلاست جنینی موشی به عنوان لایه تغذیه‌رسان، تقسیم این سلول‌ها با استفاده از مایتومایسین C (غلظت 10 µM) متوقف شد و در ظروف پوشش داده شده با ژلاتین (0/1 درصد) کشت داده شدند. سپس سلول‌های پرتوان بر روی این ظروف کشت داده شدند.

کشت سلول‌های استرومای OP9

رده سلولی OP9 از بانک سلول (Manassas,Virginia) ATCC خریداری شد. ظروف کشت سلولی 60 میلی‌متری به مدت سه ساعت ژلاتینه شدند و سلول‌های OP9 در محیط α-MEM بدون نوکلئوزید حاوی FBS (20درصد) به همراه پنی سیلین (100 U/ml) استرپتومایسین (100 ng/ml) و گلوتامین (2mM) کشت داده شدند. برای استفاده از سلول‌های OP9 به عنوان لایه تغذیه‌رسان، تقسیم این سلول‌ها با استفاده از مایتومایسین C (غلظت 10 µM) متوقف شد.

کشت دو بعدی سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی

دو رده سلولی بنیادی پرتوان جنینی RH5-GFP و القایی CAG-GFP-hiPSC انسانی از بانک سلولی پژوهشگاه رویان خریداری شدند. این سلول‌ها، پروتئین GFP را بیان می‌کردند و با میکروسکوپ فلورسنت به رنگ سبز دیده می‌شدند. برای کشت دو بعدی سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی، این سلول‌ها بر روی تک لایه سلول‌های تغذیه‌رسان فیبروبلاست جنینی موشی که از قبل مایتومایسینه شده بودند، کشت داده شدند. محیط کشت این سلول‌ها شامل: محیط پایه DMEM/F12، سرم جایگزین KOSR (20درصد)، پنی‌سیلین (100 U/ml) استرپتومایسین (100 ng/ml)، انسولین-ترنسفرین-سلنیوم-G (1درصد,ITS) ، گلوتامین (2mM)، آمینو اسیدهای غیر ضروری (درصد1)، بتامرکاپتواتانول (0/1mM)، کوچک مولکول Y27632 (1µM) و فاکتور رشد فیبروبلاستی (bFGF,10 ng/ml) است. محیط کشت سلول‌ها هر روز تعویض شد. این سلول‌ها هر هفت روز یک بار با استفاده از محلول آنزیمی کلاژناز،

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]

جداسازی و پاساژ داده شدند. شرایط نگهداری این سلول‌ها، انکوباتور با دمای 37 درجه سانتی‌گراد، رطوبت بالای 85 درصد و CO_2 (5 درصد) است.

کشت سه بعدی سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی

برای کشت سه بعدی سلول‌های بنیادی پرتوان، ابتدا کلونی‌های چسبیده بر لایه تغذیه‌رسان، با بافر نمکی فسفات فاقد کلسیم و منیزیم (PBS^-) شست‌وشو داده شدند و به مدت دو دقیقه با آنزیم Trypsin/EDTA در انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در این مدت، سلول‌های بنیادی پرتوان و فیبروبلاست جنینی موشی از کف ظرف کشت جدا شدند. سپس سوسپانسیون حاوی سلول‌ها بر روی یک پلیت 10 سانتی‌متری ژلاتینه شده ریخته شد. سلول‌های فیبروبلاست نسبت به سلول‌های بنیادی پرتوان با سرعت بیش‌تری به ظرف کشت ژلاتینه شده می‌چسبند. از این خاصیت می‌توان برای جداسازی سلول‌های پرتوان از فیبروبلاست جنینی موشی استفاده کرد. سپس سلول‌های بنیادی پرتوان با تراکم 300 هزار سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت، در ظروف کشت با چسبندگی بسیار کم (ظروف کشت باکتریایی) کشت داده شدند. این سلول‌ها در انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد و CO_2 (5 درصد) نگهداری شدند. محیط کشت سلول‌های پرتوان در حالت سه بعدی عبارتند از: محیط پایه DMEM/F12، KOSR (20درصد)، پنی سیلین (100 U/ml) استرپتومایسین (100 ng/ml)، ITS (1 درصد)، گلوتامکس (2mM)، آمینو اسیدهای غیر ضروری (1درصد)، بتامرکاپتواتانول (0/1mM)، کوچک مولکول Y27632 (10µM) و bFGF (100 ng/ml). هر روز محیط کشت سلول‌ها تعویض شد و هر هفت روز یک‌بار سلول‌ها پاساژ داده شدند. برای پاساژ، ابتدا تجمعات سلولی با PBS^- شست‌وشو داده شدند، سپس با آنزیم آکوماکس (Accumax™) تیمار شدند و به صورت منفرد در آمدند. در نهایت، سوسپانسیون سلولی حاصل، پس از عبور از فیلترمش 40 میکرومتری و حذف آنزیم با استفاده از سانتریفیوژ، به ظروف باکتریایی جدید منتقل شدند.

تمایز سلول‌های پیش‌ساز خونی به سلول‌های رده میلوئیدی

به منظور متعهد شدن سلول‌های پیش‌ساز خونی به سمت رده میلوییدی، سلول‌ها در محیط کشت AIM V™ حاوی گلوتامکس (2mM)، SCF (50 ng/ml)، لیگاند 3 تیروزین کیناز شبه FMS (FLT3L, 50 ng/ml)، و فاکتور محرک کلونی گرانولوسیت- مونوسیت (GM-CSF, 50 ng/ml) قرار گرفتند و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و CO_2 (5 درصد) به مدت 6 روز کشت داده شدند. در این مدت، یک روز در میان تعویض محیط با محیط مذکور انجام شد.

تمایز سلول‌های میلوئیدی به سلول‌های دندریتیک

سلول‌های میلوئیدی به مدت 6 روز در محیط کشت AIM V™ حاوی گلوتامکس (2mM)، پنی‌سیلین (100 U/ml) استرپتومایسین (100 ng/ml)، GM-CSF (50 ng/ml) و اینترلوکین 4 (IL4, 50 ng/ml) کشت داده شدند. سپس برای القای بلوغ در سلول‌های دندریتیک، به محیط کشت، فاکتور نکروز دهنده تومور (TNF-α, 10 ng/ml)، IL-6 (10 ng/ml)، اینترلوکین 1 بتا (IL1β,10 ng/ml) و پروستاگلاندین E2 (PGE2,1 µg/ml) اضافه شد. مورفولوژی سلول‌ها با میکروسکوپ فازکنتراست (Olympus) مورد بررسی قرار گرفت.

فلوسایتومتری و رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت

سلول‌های پیش‌ساز خونی با پیپتاژ از کف ظرف جدا شده و از فیلترمش 40 میکرومتری عبور داده شدند. سپس سوسپانسیون سلولی به مدت 5 دقیقه با سرعت 1500rpm سانتریفوژ شد. محیط رویی دور ریخته شد و رسوب سلولی با PBS^- شست‌وشو داده شد. پس از دوبار شست‌وشو، رسوب سلولی به دو بخش تقسیم شد. به یک قسمت 100 میکرولیتر PBS^- اضافه شد که به

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]

عنوان نمونه کنترل منفی و رنگ نشده در نظر گرفته شد. به قسمت دیگر، 100 میکرولیتر PBS^- حاوی آنتی‌بادی اختصاصی علیه شاخص‌های سطحی CD34 و CD45 نشان‌دار اضافه شد. سلول‌ها به مدت 30 دقیقه در شرایط 4 درجه سانتی‌گراد و تاریکی انکوبه شدند. سپس سلول‌ها با PBS^- شست‌وشو داده شدند و با دستگاه فلوسایتومتری (Calibur BD FACS) میزان بیان آنتی‌بادی‌ها بررسی شد. داده‌های حاصل با نرم افزار FlowJo آنالیز شدند.

برای رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت، از آنجا که شاخص‌های مورد بررسی(CD34 و CD86) سطحی بودند، سلول‌ها در ظروف کشت چسبنده یا روی لام قرار داده شدند. مراحل آماده‌سازی نمونه برای رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت مشابه با مراحل آماده‌سازی نمونه برای فلوسایتومتری تا مرحله قبل از خوانش با دستگاه است. به منظور رنگ آمیزی هسته، نمونه‌ها به مدت یک دقیقه با DAPI رنگ شدند و در نهایت با میکروسکوپ فلورسانت مورد بررسی قرار گرفتند.

سنجش کلونی

برای اثبات توانایی تمایز به رده‌های مختلف سلول‌های خونی، سلول‌های پیش‌ساز خونی در محیط خونی اختصاصی متوکالت(Methocult 4434) کشت داده شدند. برای انجام این کار سوسپانسیون سلولی حاوی 10 هزار سلول پیش‌ساز خونی آماده شد و با 2 میلی‌لیتر متوکالت حاوی FBS (5 درصد) مخلوط شد. سپس مخلوط حاصل به ظرف‌های کشت 35 میلی‌متری انتقال یافت و به مدت 14 روز در انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد و CO_2 (5 درصد) کشت و نگهداری شدند. پس از تشکیل کلونی‌های مختلف خونی، کلونی‌ها جمع‌آوری شدند و با PBS^- شست‌وشو داده شدند. لام سلولی با استفاده از دستگاه سیتواسپین (Shandon Cytospin) با دور 700 rpm به مدت 5 دقیقه تهیه شد و پس از فیکس سلول‌ها با متانل، رنگ‌آمیزی رایت- گیمسا انجام شد.

یافته ها

تمایز سلول‌های پیش‌ساز خونی با استفاده از هم‌کشتی تجمعات سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی با سلول‌های OP9

با کشت سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی در شرایط کشت سه بعدی، تجمعات سلولی شکل گرفتند. این سلول‌ها بیان پروتئین GFP را نشان دادند و ویژگی پرتوانی آن‌ها با رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز تایید شد (تصویر شماره 1). برای بررسی تاثیر سلول‌های استرومایی بر تمایز و شکل‌گیری ساختارهای شبه هماتو-اندوتلیالی، تجمعات سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی روی سلول‌های OP9 (تصویر شماره2، الف)، در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و CO_2 (5 درصد) کشت داده شدند. تجمعات سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی به سلول استرومایی OP9 چسبیدند (تصویر شماره2، ب) و شروع به تکثیر و رشد به صورت توده‌ای کردند. بعد از 9-7 روز، ساختارهای توده‌ای شکل به حالت توخالی و کیست مانند درآمدند و سلول‌هایی با مورفولوژی گرد در داخل آن‌ها ظاهر شدند. تعداد تک سلولی‌ها تا روز 25 تمایز افزایش پیدا کرد (تصویر شماره3، ج). از این سلول‌ها، دستجات چند سلولی شکل گرفتند که در طی روزهای بعدی به دستجات سلولی بزرگتر و ساختارهای شبه خوشه انگوری تبدیل شدند. این دستجات با لایه سلولی OP9 زیرین، اتصال سستی برقرار کردند (تصویر شماره2، د). با این وجود، سلول‌هایی نیز شکل گرفتند که با سلول‌های استرومایی OP9 اتصال محکمی برقرار کرده و مورفولوژی سلول‌های شبه اندوتلیالی را نشان دادند (تصویر شماره2، ج). برای مشخص کردن ویژگی خون‌سازی سلول‌های حاصل، سلول‌های گرد با پیپتاژ از بقیه سلول‌ها جدا و در محیط غنی متوکالت کشت داده شدند. این سلول‌ها، توانایی تولید انواع کلونی‌های خونی اریتروئیدی و گرانولوسیت-مونوسیت را نشان دادند (تصویر شماره2، ه). برای بررسی مورفولوژی این سلول‌ها، کلونی‌های خونی با سمپلر برداشته شده و با بافر PBS^- شست‌وشو داده شدند. سپس با استفاده از سیتواسپین لام سلولی تهیه و رنگ‌آمیزی

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]

رایت-گیمسا انجام شد. بررسی میکروسکوپی این لام‌ها، سلول‌هایی با مشخصات شبه ماکروفاژ را نشان داد (تصویر شماره2، و).

تکثیر و تمایز این سلول‌ها به سمت رده میلوئیدی در محیط حاوی FLT3L، SCF و GM-CSF انجام شد. در این مرحله، در کنار سلول‌های با مورفولوژی گرد، سلول‌هایی چسبیده با مورفولوژی "نیمرو مانند" نیز مشاهده شد که به تدریج از تعدادشان کم و به تعداد سلول‌های با مورفولوژی گرد و شناور افزوده شد (تصویر شماره2، ز). پس از تیمار با GM-CSF و IL-4 سلول‌ها از حالت گرد خارج شدند. سپس سلول‌ها با محیط بلوغ شامل GM-CSF، IL-4، TNF-α، IL-6، IL1-β و PGE2 تیمار داده شدند. تحت تاثیر این تیمار، سلول‌های دندریتیک با مورفولوژی سلول دندریتیک بالغ با استطاله‌های فراوان و تجمعات شناور ایجاد شدند (تصویر شماره2، ح).

تمایز خودبه‌خودی سلول‌های پیش‌ساز خونی با تولید اجسام شبه جنینی

یکی از ویژگی‌های مهم سلول‌های بنیادی پرتوان، تمایز به انواع سلول‌های سوماتیک است. این سلول‌ها هم به صورت خودبه‌خودی و هم به صورت هدفمند با قرارگیری در محیط کشت حاوی القاگرهای اختصاصی توانایی تمایز به انواع سلول‌ها را در شرایط آزمایشگاهی دارند. به منظور بررسی قابلیت تمایز خودبه‌خودی این سلول‌ها به سلول‌های پیش‌ساز خونی، از سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی که در شرایط دو بعدی و بر لایه تغذیه‌رسان فیبروبلاست جنینی موشی کشت داده شده بودند (تصویر شماره3، الف) استفاده شد. در اولین مرحله برای تمایز خودبه‌خودی این سلول‌ها، اجسام شبه جنینی تشکیل شد. بدین منظور، سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی از سلول‌های فیبروبلاست جنینی جداسازی شدند. سپس میزان 300000 سلول در هر میلی‌لیتر محیط تمایزی در ظروف کشت باکتریایی کشت شدند. محیط کشت سلول‌ها هر یک روز درمیان تعویض شد. محیط کشت تمایز خودبه‌خودی مشابه با محیط کشت سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی است با این تفاوت که به جای سرم KOSR از FBS (20درصد) استفاده شده است. هم‌چنین ترکیبات ITS و bFGF که مواد حمایت کننده خودنوزایی سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی است از محیط کشت تمایز خودبه‌خودی حذف شدند. سلول‌ها در این محیط در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و CO_2 (5 درصد) کشت داده شدند. سلول‌های بنیادی پرتوان بعد از 24 ساعت از کشت در ظروف کشت باکتریایی، شروع به تشکیل اجسام شبه جنینی کردند (تصویر شماره3، ب). اجسام شبه جنینی بعد از 96 ساعت در ظروف کشت چسبنده که از قبل با ژلاتین (0/1 درصد) پوشش داده شده بودند کشت داده شدند. در این شرایط، اجسام شبه جنینی به ظرف کشت چسبیده و شروع به رشد و تکثیر می‌کنند (تصویر شماره3، ج). شش روز بعد از کشت اجسام شبه جنینی، ساختارهای شبه هماتو-اندوتلیال شروع به شکل‌گیری و گسترش به اطراف کردند. علاوه بر این، ساختارهای کیست مانندی که در داخل آن‌ها سلول‌های گرد شکل با مورفولوژی سلول‌های خونی قابل مشاهده بودند شکل گرفتند (تصویر شماره3، د). برای تعیین هویت این سلول‌ها، سلول‌های گرد با پیپتاژ جدا شدند و برای شاخص‌های سطحی CD34 و CD45 رنگ‌آمیزی شدند. نتایج خوانش با دستگاه فلوسایتومتری نشان داد که این سلول‌ها، شاخص‌های سطحی سلول‌های پیش‌ساز خونی CD34 را به میزان 11/5 درصد و CD45 را به میزان 8 درصد بیان می‌کنند (تصویر شماره3، ه). به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌های بنیادی پرتوان توانایی ذاتی برای تمایز به سلول‌های پیش‌ساز خونی را دارند و اگر در شرایط اختصاصی‌تر قرار بگیرند توانایی تولید این سلول‌ها را با بازدهی بالاتر دارند.

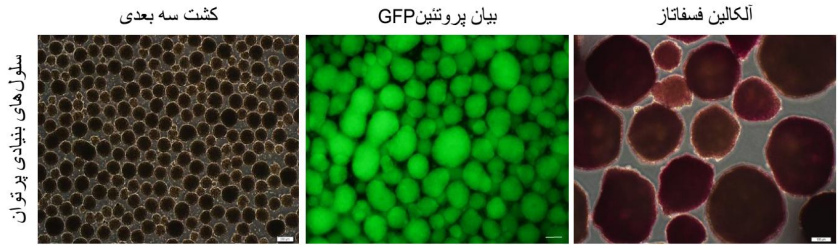
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]

تمایز هدفمند سلول‌های پیش‌ساز خونی با تولید اجسام شبه جنینی

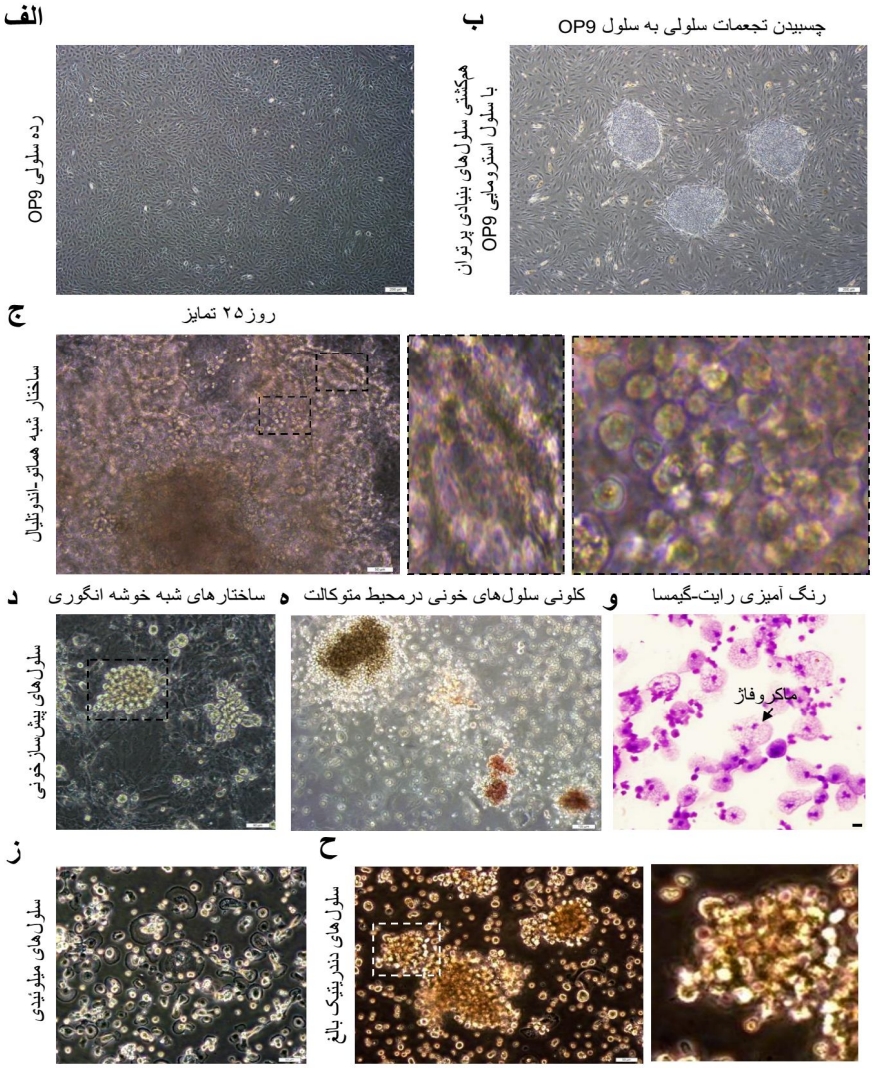
به منظور تمایز هدفمند سلول‌های پیش‌ساز خونی، از تجمعات سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی استفاده شد. اندازه این تجمعات سلولی از 70/03±23/4 میکرومتر در روز یک به 310/6±60/01 میکرومتر در روز هفت افزایش پیدا کرد. تجمعات سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی پس از رسیدن به اندازه 300-150 میکرومتر، دو بار با PBS^+ (بافر نمکی فسفات حاوی کلسیم و منیزیم) شست‌وشو شدند و به پلیت‌های 6 خانه کاملا نچسب منتقل شدند. سپس در محیط کشت Stem Pro-34 حاوی پنی‌سیلین (100 U/ml) استرپتومایسین (100 ng/ml)، پروتئین مورفوژن استخوان 4 (BMP4, 10 ng/ml)، گلوتامکس (2mM)، مونوتیوگلیسرول (MTG, 4×10^{-4} M) و آسکوربیک اسید (ASA, 50 µg/ml) کشت داده شدند. کشت سلول‌های بنیادی پرتوان در این شرایط منجر به تشکیل اجسام شبه جنینی می‌شود. ماده BMP4 مورد استفاده در محیط کشت، سرنوشت مزودرمی را در سلول‌های بنیادی پرتوان القا می‌کند. تیمار با BMP4 باعث شد اطراف اجسام شبه جنینی حاصله از حالت صاف خارج و مضرس شکل گردد. سلول‌ها به مدت 24 ساعت در این محیط در دمای 37 درجه سانتی‌گراد، CO_2 (5 درصد) و O_2 (5 درصد) کشت داده شدند. پس از 24 ساعت نیمی از محیط کشت با دقت برداشته شد و محیط تازه به همراه فاکتور رشد فیبروبلاستی (bFGF,5 ng/ml) (محیط القایی شماره یک) اضافه شد. bFGF تولید پیش‌ساز خونی مزودرمی را تقویت می‌کند. سلول‌ها به مدت 72 ساعت در این محیط انکوبه شدند. پس از طی 72 ساعت کل محیط سلول‌ها برداشت شد و سلول‌ها در محیط القایی شماره‌ی یک به همراه فاکتور رشد سلول بنیادی (SCF, 100 ng/ml) و فاکتور رشد اندوتلیال (VEGF, 20 ng/ml) که در تکوین سلول‌ها به سمت پیش‌سازهای خونی نقش دارند، به مدت 96 ساعت انکوبه شدند تا اندوتلیوم خون‌ساز شکل بگیرد.

اجسام شبه جنینی شکل گرفته در این شرایط در ابتدا توپر بودند، در حالی که بعد از گذشت 8 روز از تمایز، ساختارهای کیست مانند را شکل دادند (تصویر شماره4، الف). ادامه تمایز به صورت شناور، منجر به رهایش سلول‌های پیش‌ساز خونی در داخل ساختارهای کیست مانند شد (تصویر شماره4، ب). به منظور گسترش سلول‌های پیش‌ساز خونی، ساختارهای کیست مانند در روز 9 تمایز بر روی پلیت‌های 96 خانه ماتریژله در محیط IMDM حاوی سرم اسب (15 درصد ,HS)، گلوتامکس (2mM)، MTG (4×10^{-4} M)، هالوترانسفرین (150 µg/ml)، bFGF (1 ng/ml)، VEGF (20 ng/ml)، SCF (10 ng/ml)، اینترلوکین6 (IL6,20 ng/ml)، اینترلوکین3 (IL3,20 ng/ml)، فاکتور رشد شبه انسولین 1 (IGF-1,25 ng/ml) و اریتروپویئتین (EPO,40 ng/ml) قرار گرفتند و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و CO_2 (5 درصد) به مدت حداقل 8 روز کشت داده شدند.کیست‌ها به ظرف کشت چسبیده و بعد از گذشت 12 روز، سلول‌های شبه اندوتلیالی و سلول‌های پیش‌ساز خونی با مورفولوژی گرد شکل گرفتند (تصویر شماره4، ج). سپس سلول‌های پیش‌ساز خونی به تعداد زیاد و همگن تکثیر شدند و ساختارهای شبه خوشه انگوری را ایجاد نمودند (تصویر شماره4، د). سلول‌های رها شده بیش از 90 درصد شاخص سطحی CD34 را بیان کردند (تصویر شماره5، الف). مورفولوژی سلول‌ها با میکروسکوپ فاز کنتراست (Olympus) و میکروسکپ فازکنتراست فلورسنت IX71 مورد بررسی قرار گرفت. ادامه کشت این سلول‌ها در همان شرایط، منجر به تمایز به سمت رده‌های مختلف سلول خونی از جمله سلول‌های شبه اریتروئیدی (تصویر شماره5، ب) شد. علاوه بر این، جداسازی و کشت این سلول‌ها در یک ظرف جدید بدون ماتریژل و در محیط تکثیری باعث رشد و تکثیر سلول‌های پیش‌ساز خونی شد (تصویر شماره5، ج).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]



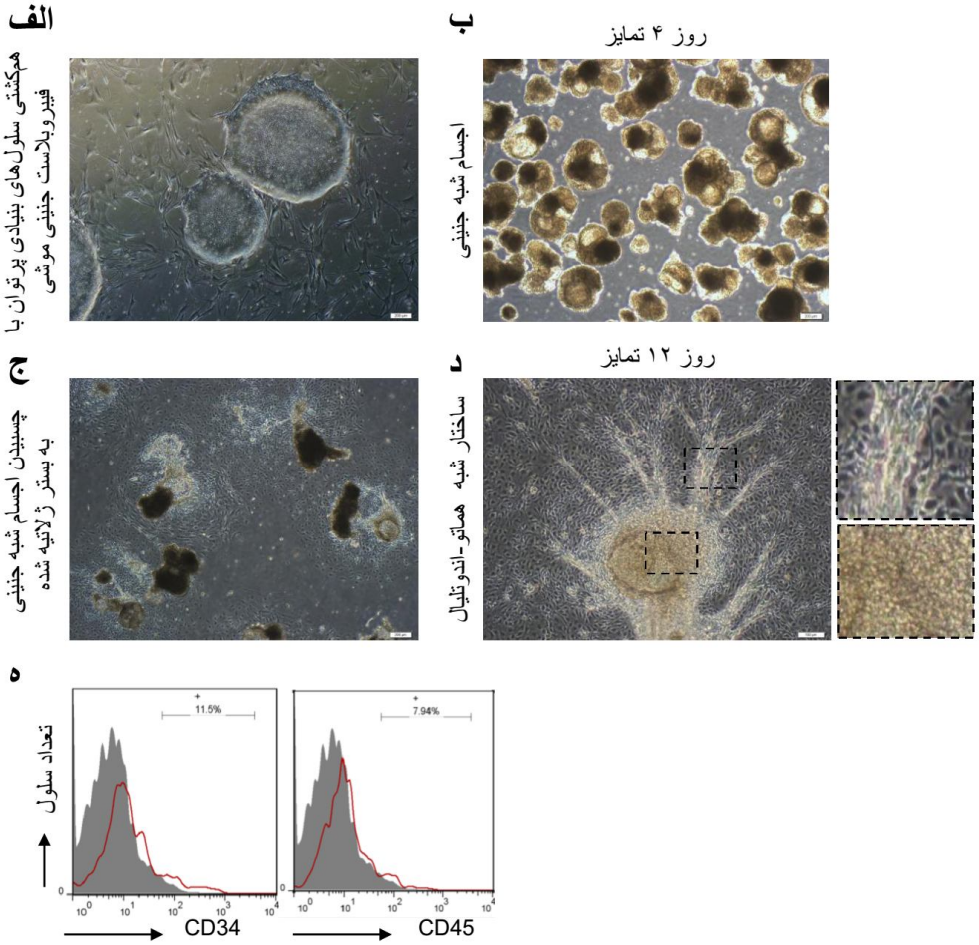
تصویر شماره 1: کشت سه بعدی سلول‌های بنیادی پرتوان. (شکل سمت چپ) مورفولوژی سلول‌های بنیادی پرتوان در شرایط کشت سه بعدی سلول‌های بنیادی پرتوان و ایجاد ساختارهای توپر سلولی (تجمعات سلولی). (شکل وسط) تصویر ایمونوفلورسنت از کشت سه بعدی سلول‌های بنیادی پرتوان و بیان پروتئین GFP و (شکل سمت راست) رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز سلول‌های بنیادی پرتوان کشت شده را در شرایط کشت سه بعدی را نشان می‌دهد. علامت اندازه، معادل 200 و 100 میکرومتر است.



تصویر شماره 2: تمایز سلول‌های پیش‌ساز خونی با استفاده از هم‌کشتی تجمعات سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی با سلول‌های OP9. الف) مورفولوژی سلول استرومایی OP9. ب) مورفولوژی تجمعات سلول‌های بنیادی پرتوان یک روز پس از هم‌کشتی با سلول استرومایی OP9. ج) مورفولوژی

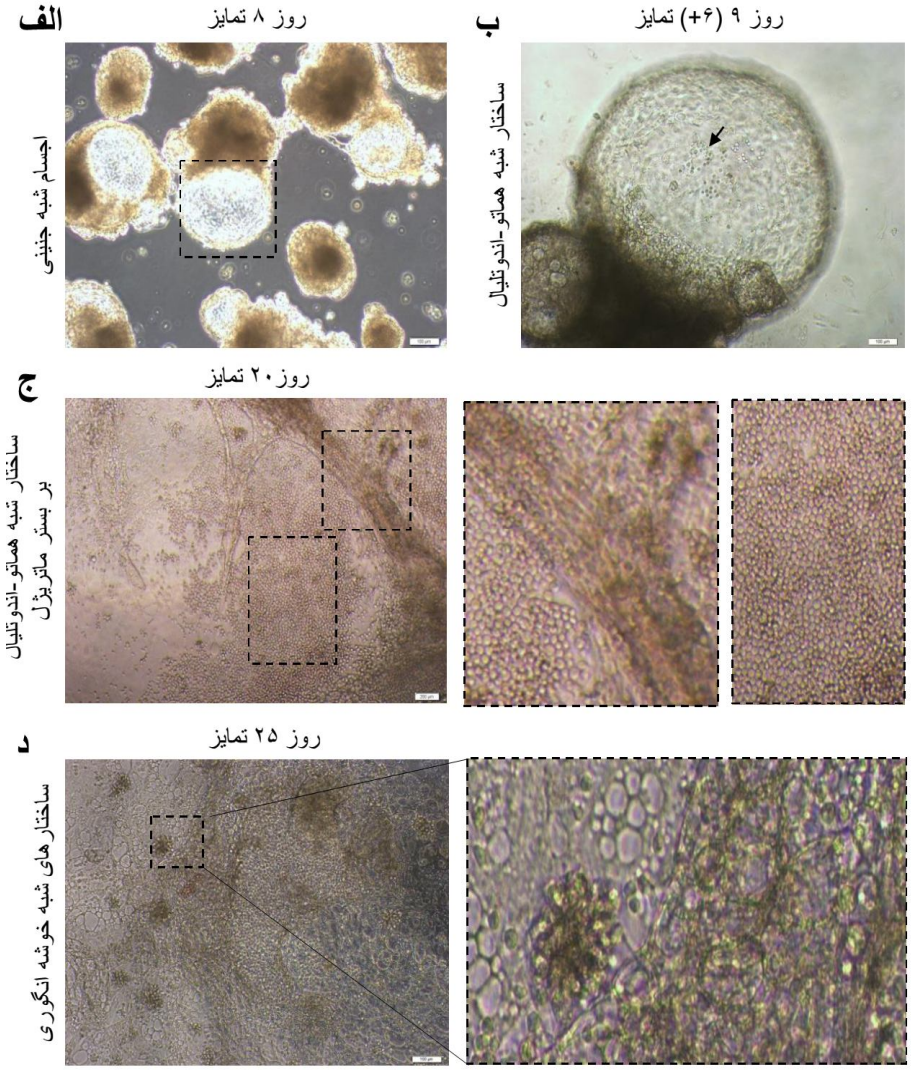
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]

ساختارهای شبه هماتو-اندوتلیال حاصل از تجمعات سلول بنیادی پرتوان هم‌کشتی شده با سلول استرومایی OP9 پس از گذشت 25 روز از شروع تمایز (سمت چپ)، نمای بزرگتر سلول‌های شبه اندوتلیالی حاصل از تمایز (وسط) و سلول‌های با مورفولوژی کروی در داخل کیست (سمت راست). د) تشکیل ساختارهای شبه خوشه انگوری حاصل از تکثیر سلول‌های پیش‌ساز خونی. ه) کشت سلول‌های پیش‌ساز خونی در محیط متوکالت و تشکیل انواع کلونی‌های خونی. و) مورفولوژی سلول‌های کشت شده در محیط متوکالت پس از تهیه لام با سیتواسپین و رنگ‌آمیزی رایت-گیمسا. فلش سیاه تصویر یک ماکروفاژ را نشان می‌دهد. ز) مورفولوژی سلول‌های شبه میلوئیدی و ح) مورفولوژی سلول‌های دندریتیک بالغ مشتق از سلول بنیادی پرتوان پس از کشت در محیط حاوی ترکیبات بلوغ (وسط) و نمای بزرگتر دستجات سلول‌های دندریتیک بالغ (سمت راست). علامت اندازه، معادل 200، 100 و 50 میکرومتر است.



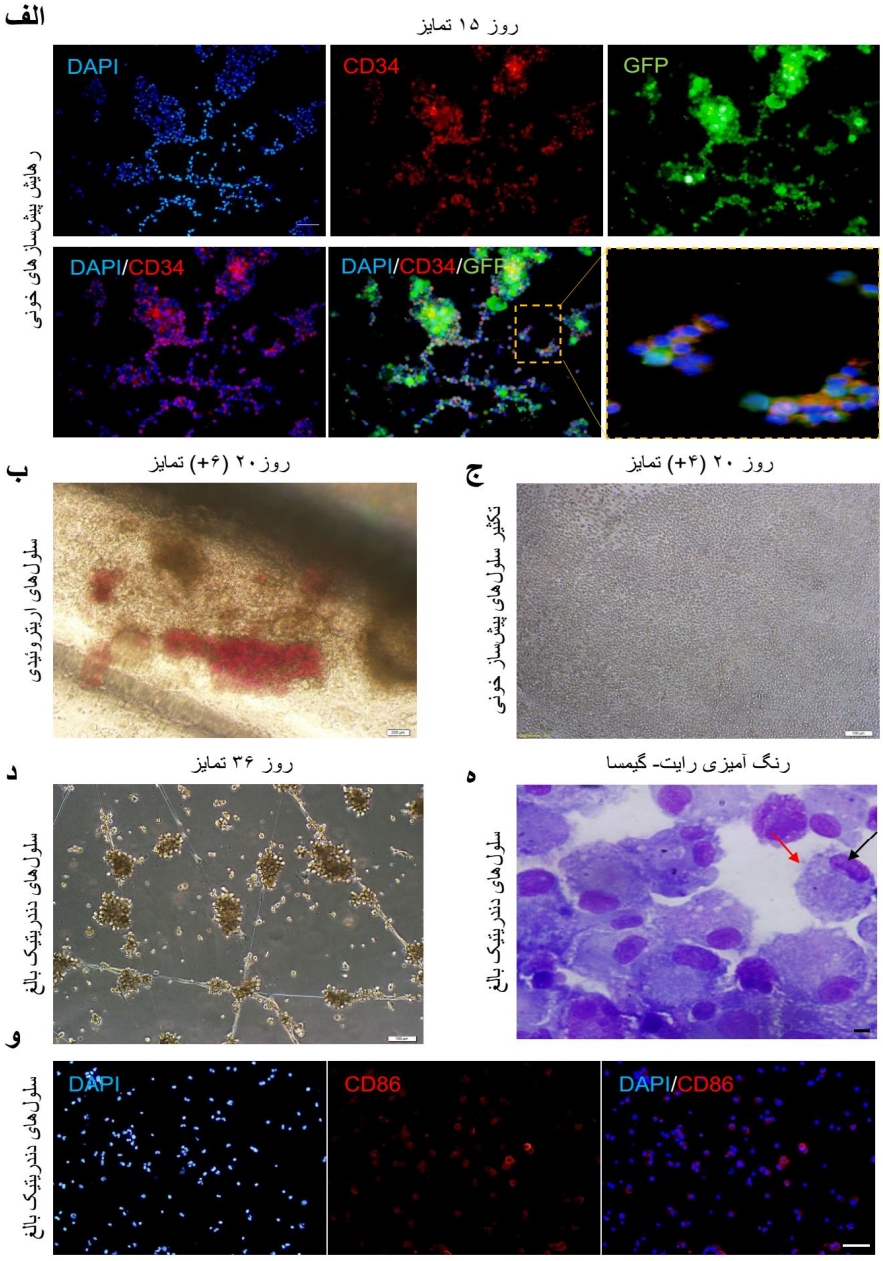
تصویر شماره 2: تمایز خود به خودی سلول‌های پیش‌ساز خونی با تولید اجسام شبه جنینی. الف) مورفولوژی سلول‌های بنیادی پرتوان هم‌کشتی شده با سلول‌های فیبروبلاست جنینی موشی. ب) مورفولوژی اجسام شبه جنینی پس از گذشت 4 روز از شروع تمایز ب) مورفولوژی اجسام شبه جنینی پس از چسبیدن به بستر ژلاتینه ج) مورفولوژی ساختارهای شبه هماتو-اندوتلیال حاصل از اجسام شبه جنینی پس از گذشت 12 روز از شروع تمایز و چسبیدن به بستر ژلاتینه (سمت چپ)، سلول‌های شبه اندوتلیالی حاصل از تمایز (سمت راست، بالا) و سلول‌های با مورفولوژی کروی در داخل کیست (سمت راست، پایین). د) آنالیز بیان شاخص‌های سطحی CD34 و CD45 در سلول‌های با مورفولوژی کروی. داده‌ها با استفاده از نرم افزار FlowJo آنالیز شد. علامت اندازه، معادل 200 و 100 میکرومتر است.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]



تصویر شماره 4: تمایز هدفمند سلول‌های پیش‌ساز خونی با تولید اجسام شبه جنینی. الف) تشکیل کیست در اجسام شبه جنینی پس از 8 روز تیمار در محیط تمایزی اختصاصی. ب) تصویر اجسام شبه جنینی و رهایش سلول‌های پیش‌ساز خونی پس ازگذشت 15 روز از شروع تمایز در شرایط کشت شناور ج) مورفولوژی ساختارهای شبه هماتو-اندوتلیال حاصل از اجسام شبه جنینی پس از گذشت 20 روز از شروع تمایز و چسبیدن به بستر ماتریژلی (سمت چپ)، نمای بزرگتر سلول‌های شبه اندوتلیالی حاصل از تمایز (وسط) و سلول‌های با مورفولوژی کروی (سمت راست). د) تشکیل ساختارهای شبه خوشه انگوری حاصل از تکثیر سلول‌های پیش‌ساز خونی پس از گذشت 25 روز از شروع تمایز و تیمار در محیط تمایزی اختصاصی (سمت چپ) و نمای بزرگتر آن (سمت راست). علامت اندازه، معادل 100 و 200 میکرومتر است.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]



تصویر شماره 5: شناسایی و بررسی عملکرد سلول‌های پیش‌ساز خونی تولید شده با استفاده از روش تمایز هدفمند سلول‌های پیش‌ساز خونی با تولید اجسام شبه جنینی. الف) شکل ایمونوفلورسانت از سلول‌های بنیادی پیش‌ساز خونی رنگ‌آمیزی شده با شاخص سطحی CD34. رنگ‌آمیزی هسته با DAPI (بالا، چپ) و بیان GFP (بالا، راست) به تصویر کشیده شده است. بیان همزمان CD34، GFP و DAPI (پایین، وسط) و نمای بزرگتر آن (پایین، راست). ب) تمایز خود به خودی سلول‌های بنیادی پیش‌ساز خونی تولید شده در روز 20 تمایز و تمایز به پیش‌ساز اریتروئیدی و شکفتن کلونی حاصل از این سلول‌ها پس از 6 روز کشت در محیط اختصاصی تکثیر. ج) تکثیر سلول‌های پیش‌ساز خونی پس از جداسازی از سلول‌های شبه اندوتلیال در روز 20 تمایز و کشت در ظرف کشت نچسب ومحیط اختصاصی تکثیر به مدت 4 روز. د) موفولوژی سلول‌های دندریتیک بالغ پس از کشت در محیط حاوی ترکیبات بلوغ. ه) مورفولوژی سلول‌های دندریتیک بالغ پس ازتهیه لام با سیتواسپین و رنگ‌آمیزی رایت-گیمسا (سمت چپ) و نمای بزرگتر آن (سمت راست). پیکان سیاه هسته کناری و پیکان قرمز استطاله‌های سلول دندریتیک بالغ را نشان می‌دهد. و) شکل ایمونوفلورسانت از سلول‌های دندریتیک بالغ رنگ‌آمیزی شده با شاخص سطحی CD86. رنگ‌آمیزی هسته با DAPI (چپ) و بیان همزمان CD86 و DAPI (راست) به تصویر کشیده شده است. علامت اندازه، معادل 200 و 100میکرومتر است.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]

بحث

در سال‌های اخیر محققان تلاش زیادی در جهت شناسایی مراحل خون‌سازی از سلول‌های بنیادی پرتوان نموده‌اند. با این حال تولید سلول‌های خونی با تعداد مناسب و دارای قابلیت بازسازی مغز استخوان همچنان موضوعی چالش‌برانگیز است. در مطالعات مشخص شده است که تولید ساختارهای هماتو-اندوتلیال در مسیر تمایز سلول‌های خون‌ساز، موضوعی ضروری است که با دو رویکرد کلی کشت تک لایه (معمولا هم‌کشتی با رده سلولی OP9) و تولید اجسام شبه جنینی انجام شده است(33).

تمایز سلول‌های بنیادی پرتوان به سلول‌های خون‌ساز در شرایط آزمایشگاهی از این جهت که دسترسی به سلول‌های درون تنی برای شناخت مراحل تکوین و تمایز سلول‌های خونی آسان نیست بسیار حائز اهمیت است. سیستم هم‌کشتی سلول‌های بنیادی پرتوان با سلول‌های OP9 موشی نیز به منظور چنین هدفی پایه گذاری شده است(34،35). علاوه بر شناخت فرآیند خون‌سازی، با توجه به محدودیت‌های مربوط به منابع سلول‌های بنیادی خون‌ساز، تولید این سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی یک منبع با ارزش در سلول درمانی بسیاری از بیماری‌های خونی است و از این رو حائز اهمیت بسیار است(8،36). با این حال، سلول‌های تولید شده در حضور سلول‌های گرفته شده از موش، سلول OP9، به دلیل حضور ترکیبات حیوانی با محدودیت استفاده در پزشکی بازساختی روبرو هستند(37).

تولید سلول‌های هماتو-اندوتلیال از هم‌کشتی سلول بنیادی پرتوان با رده سلولی OP9 در مطالعات بسیاری نشان داده شده است(19،38،39). در این مطالعه نیز به منظور بررسی توانایی تولید سلول‌های پیش‌ساز خونی از سلول‌های بنیادی پرتوان در دسترس و تکرار کارهای انجام شده، ساختارهای شبه هماتو-اندوتلیال و سلول‌های پیش‌ساز خونی از هم‌کشتی سلول‌های بنیادی پرتوان با سلول‌های استرومایی OP9 حاصل شد. سلول‌های پیش‌ساز خونی قابلیت تمایز به انواع سلول‌های خونی را نشان دادند. با استفاده از سیتوکین FLT3L و GM-CSF که تمایز سلول‌های پیش‌ساز خونی را به سمت رده میلوئیدی پیش می‌برد(40،41) و با تولید سلول‌های دندریتیک بالغ، ویژگی تولید رده میلوئیدی آن‌ها تایید شد. مورفولوژی اختصاصی "نیم‌رو مانند" که معرف سلول‌های ماکروفاژ است(42-44) نیز در این مطالعه مشاهده شد. بنابراین، تولید سلول‌های پیش‌ساز خونی از سلول‌های بنیادی پرتوان استفاده شده در این مطالعه، با استفاده از روش مرسوم هم‌کشتی با سلول استرومایی OP9 قابل انجام بود.

به علت اینکه سلول‌های بنیادی پرتوان در حالت کشت سه بعدی به لحاظ فیزیولوژی و مورفولوژی به سلول‌های جنینی نزدیک‌تر هستند(45) مطالعات بسیاری از اجسام شبه جنینی برای تولید هماتو-اندوتلیال و سلول‌های خونی استفاده کرده‌اند(46-48). در این رویکرد، اجسام شبه جنینی را در حضور غلظت‌های متفاوت فاکتورهای رشد، سیتوکین‌ها و کوچک مولکول‌ها در زمان‌های متفاوت، کشت داده‌اند تا در نهایت به روشی با بازدهی مناسب برسند(49).

در مطالعه حاضر، در روش تمایز خود به خودی، اجسام شبه جنینی در حضور محیط حاوی سرم FBS و فاقد ITS تولید شده و برای تولید ساختارهای شبه هماتو-اندوتلیال و سلول‌های پیش‌ساز خونی استفاده شدند. با استفاده از این روش، در مدت زمان 12 روز ساختارهای شبه هماتو-اندوتلیال و سلول‌های پیش‌ساز خونی ایجاد شدند. مطالعات نشان داده است که کشت اجسام شبه جنینی به‌مدت 4 روز در حضور سرم (20 درصد)، بهترین نتیجه را برای تولید مزودرم جنینی اولیه(50) که پیش‌ساز سلول‌های هماتو-اندوتلیال است(51) می‌دهد. علت این امر می‌تواند مربوط به ترکیبات شبه BMP4 باشد که در سرم حضور دارند(52). به علاوه، مکمل ITS، برای حفظ رشد و تمایز سلول‌ها و هم‌چنین تنظیم تکثیر به محیط کشت سلول اضافه می‌شود(53). در مطالعه حاضر ITS از محیط کشت حذف شده بود. یکی

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]

از مواد این مکمل، انسولین است. اخیرا مشخص شده مسیر پیام‌رسانی انسولین در تولید سلول‌های پیش‌ساز خونی نقش دوگانه‌ای را بازی می‌کند. حذف این ماده سلول‌های بنیادی پرتوان را از پرتوانی خارج و وارد تمایز به سمت مزودرم عروقی می‌کند(54). با این حال، وجود انسولین برای ظهور سلول‌های پیش‌ساز خونی از سلول‌های هماتو-اندوتلیال ضروری است(54). بنابراین، این فرض بوجود می‌آید که در تمایز خود به خودی سلول‌های بنیادی پرتوان به پیش‌سازهای خونی، پس از شکل‌گیری ساختارهای شبه هماتو-اندوتلیال، اضافه کردن ITS به محیط کشت بتواند باعث تولید بیشتر سلول‌های پیش‌ساز خونی شود و بازدهی پایین تولید سلول‌های خونی را افزایش دهد. با این وجود، این روش به رغم آسانی، همانند روش هم‌کشتی با رده سلولی OP9 به دلیل حضور ترکیبات حیوانی شامل سرم جنینی گاو، قابلیت کاربرد در درمان را نخواهد داشت.

در این مطالعه از روش گوردن کلر(28) با کمی تغییر تمایز هدفمند سلول‌های بنیادی پرتوان به سلول‌های شبه هماتو-اندوتلیال و سلول‌های پیش‌ساز خونی پیش برده شد. این تغییرات شامل استفاده از غلظت دو برابر پروتئین VEGF نسبت به غلظت استفاده شده توسط گوردن کلر و استفاده از اندازه مشخص تجمعات سلولی بودند. در مطالعه حاضر، بازدهی تولید پیش‌سازهای خونی با استفاده از غلظت VEGF در مقاله گوردن کلر بسیار پایین بود، بنابراین با توجه به نقش VEGF در تولید سلول‌های هماتو-اندوتلیال(56،55) با تغییر غلظت آن، بازدهی تولید سلول‌های پیش‌ساز خونی افزایش یافت. به علاوه، در مطالعات نشان داده شده است که اندازه تجمعات سلول‌های بنیادی پرتوان و اجسام شبه جنینی تاثیر مستقیم بر تمایز به رده‌های سلولی مختلف اندودرم، مزودرم و اکتودرم دارد(57). در مطالعه حاضر، از تجمعات سلول‌های بنیادی پرتوان با اندازه مشخص 300-150 میکرومتر استفاده شد، چراکه برای تمایز به سلول‌های رده مزودرمی، از تجمعات سلول‌های بنیادی پرتوان با اندازه 300-150 میکرومتر استفاده شده است(57). در مطالعات انجام شده با روش گوردن کلر، پس از تیمار اجسام شبه جنینی با پروتئین‌های BMP4 و bFGF در روز 3 تمایز، آن‌ها را با آنزیم تریپسین به صورت تک سلولی درآوردند و سلول‌ها را برای شاخص سطحی KDR مورد بررسی قرار دادند(28). علت این بررسی این بود که سلول‌های هماتو-اندوتلیال از سلول‌های مزودرمی KDR^+ شکل می‌گیرند و پس از این بررسی وجود چنین سلول‌هایی با استفاده از روش گوردن کلر اثبات شد. از سلول‌های KDR^+ در نهایت پیش‌سازهای خونی با شاخص‌های سطحی $CD34^+CD43^+$ تمایز پیدا می‌کند(59،58). در مطالعه حاضر، با فرض تولید سلول‌های KDR^+ در روز 3 تمایز، کشت اجسام شبه جنینی تا روز 9 تمایز به صورت سه بعدی ادامه پیدا کرد. اجسام شبه جنینی بعد از گذشت 9 روز به ساختارهای سلولی توخالی و کیست مانند تبدیل شدند و پس از کشت بر بستر ماتریژل، نسبت به سایر روش‌ها، سلول‌های پیش‌ساز خونی بیش‌تری را تولید نمودند. در مجموع، در این روش نیز به ساختار شبه هماتو-اندوتلیال دست یافتیم. یکی از تفاوت‌های روش تمایز هدفمند با دو روش هم‌کشتی با سلول استرومال OP9 و تمایز خود به خودی این بود که در روش تمایز هدفمند از شرایط هیپوکسی (اکسیژن 5 درصد) برای تولید ساختارهای شبه هماتو-اندوتلیال استفاده شد. در مطالعات نشان داده شده است هیپوکسی از طریق فعال‌سازی مسیر پیام رسانی HIF1-α می‌تواند تاثیر بسزایی در فرآیند خون‌سازی در هر دو شرایط برون‌تنی و درون‌تنی داشته باشد(63-60). از این‌رو در مطالعاتی که تمایز هدفمند سلول‌های بنیادی پرتوان به سلول‌های پیش‌ساز خونی را انجام می‌دهند ایجاد شرایط هیپوکسی در کشت در نظر گرفته می‌شود(28). سلول‌های پیش‌ساز خونی تولید شده با استفاده از روش هدفمند، در شرایط نرموکسی (اکسیژن هوا) قابلیت تکثیر و تمایز به رده‌های مختلف سلول‌های خونی از جمله سلول‌های دندریتیک را داشتند. یکی از مشکلات

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]

استفاده از روش گوردن کلر، مرگ سلولی بر اثر تیمار با BMP4 است که در مطالعات دیگر نیز به آن اشاره شده است(65،64). تعداد زیادی سلول در اجسام شبه جنینی بعد از تیمار با BMP4 از دست می‌رفت و در بعضی اوقات اجسام شبه جنینی کاملا متلاشی می‌شدند که همین امر مانع از ادامه تمایز می‌شد. این نکته، تکرارپذیری روش را به خصوص زمان استفاده از رده‌های مختلف سلول‌های بنیادی پرتوان تحت تاثیر قرار می‌داد. با توجه به اینکه پروتئین BMP4 باعث راه‌اندازی مسیر پیام‌رسانی WNT می‌شود(66) و مطالعات نشان داده‌اند که فعال‌سازی مسیر WNT با استفاده از کوچک مولکول مهار کننده GSK-3β، (CHIR) CHIR99021، امکان‌پذیر است(67)، به نظر می‌رسد که می‌توان BMP4 را باکوچک مولکول CHIR که ارزان‌تر از BMP4 است، جایگزین کرد. این موضوعی است که باید در مطالعات بعدی مورد بررسی بیش‌تر قرار گیرد.

سپاسگزاری

این طرح با هزینه پژوهشگاه رویان و استفاده از گرنت شرکت فنآوری بن یاخته‌های رویان و گرنت پژوهشی مرکز تحقیقات سرطان (پژوهانه موسسه خیریه شمس به شماره طرح 97-01-202-37309) انجام شده است.

References

1. Mann Z, Sengar M, Kumar Verma Y, Rajalingam R, Raghav PK. Hematopoietic stem cell factors: their functional role in self-renewal and clinical aspects. Front Cell Dev Biol 2022; 10: 664261.
2. Clapes T, Robin C. Embryonic development of hematopoietic stem cells: implications for clinical use. Regen Med 2012; 7(3): 349-368.
3. Cieri N, Maurer K, Wu CJ. 60 Years Young: The Evolving Role of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Cancer Immunotherapy. Cancer Res 2021; 81(17): 4373-4384.
4. Li J, Wang X, Ding J, Zhu Y, Min W, Kuang W, et al. Development and clinical advancement of small molecules for ex vivo expansion of hematopoietic stem cell. Acta Pharm Sin B 2021; 12(6): 2808-2831.
5. Lange L, Morgan M, Schambach A. The hemogenic endothelium: a critical source for the generation of PSC-derived hematopoietic stem and progenitor cells. Cell Mol Life Sci 2021; 78(9): 4143-4160.
6. Pendse S, Vaidya A, Kale V. Clinical applications of pluripotent stem cells and their derivatives: current status and future perspectives. Regen Med 2022; 17(9): 677-690.
7. Hoang DM, Pham PT, Bach TQ, Ngo AT, Nguyen QT, Phan TT, et al. Stem cell-based therapy for human diseases. Signal Transduct Target Ther 2022; 7(1): 272.
8. Demirci S, Leonard A, Tisdale JF. Hematopoietic stem cells from pluripotent stem cells: Clinical potential, challenges, and future perspectives. Stem Cells Transl Med 2020; 9(12): 1549-1557.
9. Lange L, Hoffmann D, Schwarzer A, Ha T-C, Philipp F, Lenz D, et al. Inducible forward programming of human pluripotent stem cells to hemato-endothelial progenitor cells with hematopoietic progenitor potential. Stem Cell Reports 2020; 14(1): 122-137.
10. Canu G, Ruhrberg C. First blood: The endothelial origins of hematopoietic progenitors. Angiogenesis 2021; 24(2): 199-211.
11. Sagaradze GD, Basalova NA, Efimenko AY, Tkachuk VA. Mesenchymal stromal cells as critical contributors to tissue regeneration. Front Cell Dev Biol 2020; 8: 576176.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]

12. Gomes RN, Manuel F, Nascimento DS. The bright side of fibroblasts: molecular signature and regenerative cues in major organs. NPJ Regen Med 2021; 6(1): 43.
13. Mamidi MK, Pal R, Mori NAB, Arumugam G, Thrichelvam ST, Noor PJ, et al. Co-culture of mesenchymal-like stromal cells derived from human foreskin permits long term propagation and differentiation of human embryonic stem cells. J Cell Biochem 2011; 112(5): 1353-1363.
14. Tian X, Woll PS, Morris JK, Linehan JL, Kaufman DS. Hematopoietic engraftment of human embryonic stem cell-derived cells is regulated by recipient innate immunity. Stem Cells 2006; 24(5): 1370-1380.
15. Suzuki A, Nakano T. Development of hematopoietic cells from embryonic stem cells. Int J Hematol 2001; 73(1): 1-5.
16. Trivedi P, Hematti P. Simultaneous generation of CD34+ primitive hematopoietic cells and CD73+ mesenchymal stem cells from human embryonic stem cells cocultured with murine OP9 stromal cells. Exp Hematol 2007; 35(1): 146-154.
17. Figueiredo LM, Costa EB, Orellana MD, Picanço-Castro V, Covas DT. OP9 stromal cells proteins involved in hematoendothelial differentiation from human embryonic stem cells. Cell Reprogram 2015; 17(5): 338-346.
18. Vodyanik MA, Slukvin II. Hematoendothelial differentiation of human embryonic stem cells. Curr Protoc Cell Biol 2007; Chapter 23: Unit 23.6.
19. Vodyanik MA, Bork JA, Thomson JA, Slukvin II. Human embryonic stem cell–derived CD34+ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. Blood 2005; 105(2): 617-626.
20. Choi K-D, Vodyanik MA, Slukvin II. Generation of mature human myelomonocytic cells through expansion and differentiation of pluripotent stem cell–derived lin–CD34+ CD43+ CD45+ progenitors. J Clin Invest 2009; 119(9): 2818-2829.
21. Netsrithong R, Suwanpitak S, Boonkaew B, Trakarnsanga K, Chang L-J, Tipgomut C, et al. Multilineage differentiation potential of hematoendothelial progenitors derived from human induced pluripotent stem cells. Stem Cell Res Ther 2020; 11(1): 481.
22. Angelos MG, Abrahante JE, Blum RH, Kaufman DS. Single cell resolution of human hematoendothelial cells defines transcriptional signatures of hemogenic endothelium. Stem Cells 2018; 36(2): 206-217.
23. Guerra-Crespo M, Collazo-Navarrete O, Ramos-Acevedo R, Morato-Torres CA, Schüle B. Embryoid Body Formation from Mouse and Human Pluripotent Stem Cells for Transplantation to Study Brain Microenvironment and Cellular Differentiation. Methods Mol Biol 2022; 2520: 215-232.
24. Zeevaert K, Elsafi Mabrouk MH, Wagner W, Goetzke R. Cell mechanics in embryoid bodies. Cells 2020; 9(10): 2270.
25. Juran CM, Zvirblyte J, Almeida EA. Differential Single Cell Responses of Embryonic Stem Cells Versus Embryoid Bodies to Gravity Mechanostimulation. Stem Cells Dev 2022; 31(13-14): 346-356.
26. Rhodes K, Barr KA, Popp JM, Strober BJ, Battle A, Gilad Y. Human embryoid bodies as a novel system for genomic studies of functionally diverse cell types. Elife 2022; 11: e71361.
27. Isaja L, Ferriol-Laffouillere SL, Mucci S, Rodríguez-Varela MS, Romorini L. Embryoid Bodies–Based Multilineage Differentiation

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]

of Human Embryonic Stem Cells Grown on Feeder-Free Conditions. Methods Mol Biol 2022; 2520: 189-198.

28. Sturgeon CM, Ditadi A, Awong G, Kennedy M, Keller G. Wnt signaling controls the specification of definitive and primitive hematopoiesis from human pluripotent stem cells. Nat Biotechnol 2014; 32(6): 554-561.
29. Bruveris FF, Ng ES, Stanley EG, Elefanty AG. VEGF, FGF_2, and BMP_4 regulate transitions of mesoderm to endothelium and blood cells in a human model of yolk sac hematopoiesis. Exp Hematol 2021; 103: 30-39.e2
30. Palpant NJ, Pabon L, Roberts M, Hadland B, Jones D, Jones C, et al. Inhibition of β-catenin signaling respecifies anterior-like endothelium into beating human cardiomyocytes. Development 2015; 142(18): 3198-3209.
31. Chanda B, Ditadi A, Iscove NN, Keller G. Retinoic acid signaling is essential for embryonic hematopoietic stem cell development. Cell 2013; 155(1): 215-227.
32. Luff SA, Creamer JP, Valsoni S, Dege C, Scarfò R, Dacunto A, et al. Identification of a retinoic acid-dependent haemogenic endothelial progenitor from human pluripotent stem cells. Nat Cell Biol 2022; 24(5): 616-624.
33. Tursky ML, Loi TH, Artuz CM, Alateeq S, Wolvetang EJ, Tao H, et al. Direct comparison of four hematopoietic differentiation methods from human induced pluripotent stem cells. Stem Cell Rep 2020; 15(3): 735-748.
34. Lynch MR, Gasson JC, Paz H. Modified ES/OP9 co-culture protocol provides enhanced characterization of hematopoietic progeny. J Vis Exp 2011(52): e2559.
35. Shan W, Yu Q, Long Y, Luo Q, Li H, Han Y, et al. Enhanced HSC-like cell generation from mouse pluripotent stem cells in a 3D induction system cocultured with stromal cells. Stem Cell Res Ther 2021; 12(1): 353.
36. Slukvin II. Hematopoietic specification from human pluripotent stem cells: current advances and challenges toward de novo generation of hematopoietic stem cells. Blood 2013; 122(25): 4035-4046.
37. McKee C, Chaudhry GR. Advances and challenges in stem cell culture. Colloids Surf B Biointerfaces 2017; 159: 62-77.
38. Choi K-D, Yu J, Smuga-Otto K, Salvagiotto G, Rehrauer W, Vodyanik M, et al. Hematopoietic and endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells. Stem Cells 2009; 27(3): 559-567.
39. Roh J, Kim S, Cheong J-W, Jeon S-H, Kim H-K, Kim MJ, et al. Erythroid Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells Co-cultured with OP9 Cells for Diagnostic Purposes. Ann Lab Med 2022; 42(4): 457-466.
40. Oh S, Choi EY. The Differential Role of GM-CSF and Flt3L on Myelopoiesis of Lineage Negative Bone Marrow Cells. Am Assoc Immnol 2018; 103-130.
41. Iwabuchi R, Ikeno S, Kobayashi-Ishihara M, Takeyama H, Ato M, Tsunetsugu-Yokota Y, et al. Introduction of human Flt3-L and GM-CSF into humanized mice enhances the reconstitution and maturation of myeloid dendritic cells and the development of Foxp3+ CD4+ T cells. Front Immunol 2018; 9: 1042.
42. Raggi F, Pelassa S, Pierobon D, Penco F, Gattorno M, Novelli F, et al. Regulation of human macrophage M1–M2 polarization balance by hypoxia and the triggering receptor expressed on myeloid cells-1. Front Immunol 2017; 8: 1097.
43. Abumaree MH, Al Harthy S, Al Subayyil AM, Alshabibi MA, Abomaray FM, Khatlani T, et al. Decidua basalis mesenchymal stem

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]

cells favor inflammatory M1 macrophage differentiation in vitro. Cells 2019; 8(2): 173.

44. Peng L, van den Biggelaar RH, Jansen CA, Haagsman HP, Veldhuizen EJ. A method to differentiate chicken monocytes into macrophages with proinflammatory properties. Immunobiology 2020; 225(6): 152004.
45. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. Assay Drug Dev Technol 2014; 12(4): 207-218.
46. Hansen M, Varga E, Aarts C, Wust T, Kuijpers T, von Lindern M, et al. Efficient production of erythroid, megakaryocytic and myeloid cells, using single cell-derived iPSC colony differentiation. Stem Cell Res 2018; 29: 232-244
47. Leung A, Zulick E, Skvir N, Vanuytsel K, Morrison TA, Naing ZH, et al. Notch and aryl hydrocarbon receptor signaling impact definitive hematopoiesis from human pluripotent stem cells. Stem Cells 2018; 36(7): 1004-1019.
48. Garcia-Alegria E, Menegatti S, Fadlullah MZ, Menendez P, Lacaud G, Kouskoff V. Early human hemogenic endothelium generates primitive and definitive hematopoiesis in vitro. Stem Cell Reports 2018; 11(5): 1061-1074.
49. Georgomanoli M, Papapetrou EP. Modeling blood diseases with human induced pluripotent stem cells. Dis Model Mech 2019; 12(6): dmm039321.
50. Takei S, Ichikawa H, Johkura K, Mogi A, No H, Yoshie S, et al. Bone morphogenetic protein-4 promotes induction of cardiomyocytes from human embryonic stem cells in serum-based embryoid body development. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2009; 296(6): H1793-H803.
51. Chandrakanthan V, Rorimpandey P, Zanini F, Chacon D, Olivier J, Joshi S, et al. Mesoderm-derived PDGFRA+ cells regulate the emergence of hematopoietic stem cells in the dorsal aorta. Nat Cell Biol 2022; 24(8): 1211-1225.
52. Kodaira K, Imada M, Goto M, Tomoyasu A, Fukuda T, Kamijo R, et al. Purification and identification of a BMP-like factor from bovine serum. Biochem Biophys Res Commun 2006; 345(3): 1224-1231.
53. Liu X, Zhang T, Wang R, Shi P, Pan B, Pang X. Insulin-transferrin-selenium as a novel serum-free media supplement for the culture of human amnion mesenchymal stem cells. Ann Clin Lab Sci 2019; 49(1): 63-71.
54. Duan F, Huang R, Zhang F, Zhu Y, Wang L, Chen X, et al. Biphasic modulation of insulin signaling enables highly efficient hematopoietic differentiation from human pluripotent stem cells. Stem Cell Res Ther 2018; 9(1): 205.
55. Nourse MB, Halpin DE, Scatena M, Mortisen DJ, Tulloch NL, Hauch KD, et al. VEGF induces differentiation of functional endothelium from human embryonic stem cells: implications for tissue engineering. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2010; 30(1): 80-89.
56. Schiavo RK, Tamplin OJ. Vascular endothelial growth factor c regulates hematopoietic stem cell fate in the dorsal aorta. Development 2022; 149(2): dev199498.
57. Farzaneh Z, Najarasl M, Abbasalizadeh S, Vosough M, Baharvand H. Developing a cost-effective and scalable production of human hepatic competent endoderm from size-controlled pluripotent stem cell aggregates. Stem Cells Dev 2018; 27(4): 262-774.
58. Gutierrez-Agüera F, Rodriguez-Cortez V,

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]

Petazzi P, Bueno C, Menendez P. A Benchmark Side-by-Side Comparison of Two Well-Established Protocols for in vitro Hematopoietic Differentiation From Human Pluripotent Stem Cells. Front Cell Dev Biol 2021; 9: 636704.

59. Mora-Roldan GA, Ramirez-Ramirez D, Pelayo R, Gazarian K. Assessment of the hematopoietic differentiation potential of human pluripotent stem cells in 2D and 3D culture systems. Cells 2021; 10(11): 2858.
60. Wang N, Chen C, Cheng Y, Fu Y, Zhong Z, Yang Y, et al. Hypoxia drives hematopoiesis with the enhancement of T lineage through eliciting arterial specification of hematopoietic endothelial progenitors from hESC. Stem Cell Res Ther 2022; 13(1): 282.
61. Alvarez-Martins I, Remédio L, Matias I, Diogo LN, Monteiro EC, Dias S. The impact of chronic intermittent hypoxia on hematopoiesis and the bone marrow microenvironment. Pflügers Arch 2016; 468(5): 919-932.
62. Podkalicka P, Stępniewski J, Mucha O, Kachamakova-Trojanowska N, Dulak J, Łoboda A. Hypoxia as a driving force of pluripotent stem cell reprogramming and differentiation to endothelial cells. Biomolecules 2020; 10(12): 1614.
63. Imanirad P, Kartalaei PS, Crisan M, Vink C, Yamada-Inagawa T, de Pater E, et al. HIF1α is a regulator of hematopoietic progenitor and stem cell development in hypoxic sites of the mouse embryo. Stem Cell Res 2014; 12(1): 24-35.
64. Sontag S, Förster M, Seré K, Leishman AJ, Davies TJ, Fairchild PJ. Directed differentiation of human induced pluripotent stem cells into dendritic cells displaying tolerogenic properties and resembling the CD141+ subset. Front Immunol 2018; 8: 1935.
65. Sachamitr P, Leishman AJ, Davies TJ, Fairchild PJ. Directed differentiation of human induced pluripotent stem cells into dendritic cells displaying tolerogenic properties and resembling the CD141+ subset. Front Immunol 2018; 8: 1935.
66. Kurek D, Neagu A, Tastemel M, Tüysüz N, Lehmann J, van de Werken HJ, et al. Endogenous WNT signals mediate BMP-induced and spontaneous differentiation of epiblast stem cells and human embryonic stem cells. Stem Cell Reports 2015; 4(1): 114-128.
67. Massey J, Liu Y, Alvarenga O, Saez T, Schmerer M, Warmflash A. Synergy with TGFβ ligands switches WNT pathway dynamics from transient to sustained during human pluripotent cell differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A 2019; 116(11): 4989-4998.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]