

رویکردهای مربوط به انجماد در سلول‌های بنیادی و سلول‌های بنیادی سرطانی؛ تأثیر انجماد بر ویژگی‌های سطحی ماموسفیرها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی

لیلا عینی^{*۱}

چکیده

اهمیت انجماد و ذخیره زیستی سلول‌های بنیادی به دلیل کاربردهای آنها در حوزه‌های مختلف به طور قابل توجهی افزایش یافته است. سلول‌های بنیادی در حال حاضر در درمان برخی بیماری‌ها به کار می‌روند و پیش‌بینی می‌شود که نقش محوری در آینده پزشکی ایفا کنند. از سوی دیگر، سلول‌های بنیادی سرطانی (CSCs) به عنوان اهداف درمانی بالقوه ظهور کرده‌اند و الگوهای تحقیقات سرطان را به شدت تغییر داده‌اند. در نتیجه، انجماد طولانی‌مدت سلول‌های بنیادی سرطانی از اهمیت بالایی برخوردار است. با این حال، شواهد موجود نتایج متناقضی را در مورد اثرات انجماد و ذوب بر سلول‌های بنیادی نشان می‌دهد که شامل انواع مختلف استرس و آسیب سلولی می‌شود. علاوه بر این، مستندات از تغییرات در ویژگی‌های بیولوژیکی و یکپارچگی سلول‌های بنیادی پس از ذوب وجود دارد. ماموسفیرها مشتق شده از رده‌های سلولی T14، در محیط انجماد استاندارد (۹۰٪ DMSO + ۱۰٪ FBS) منجمد شدند و به مدت ۹ ماه در نیتروژن مایع نگهداری شدند. سپس، اثر انجماد بر حفظ یکپارچگی سلول‌های بنیادی سرطانی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مورد ارزیابی قرار گرفت داده‌های مرتبط با میکروگراف‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی، به وضوح نشان داد که ماموسفیرهای غنی از سلول‌های بنیادی سرطانی پس از ذوب یکپارچگی و مورفولوژی و ویژگی‌های سطح سلولی خود را حفظ می‌کنند. بنابر این، این روش کرایوپرزرویشن یک استراتژی مؤثر و قابل اعتماد جهت ذخیره سازی CSC ها برای پروژه های CSC آینده در اختیار محققان قرار می دهد.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی سرطانی، ماموسفیر، محیط انجماد

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۵/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۷/۲۳

مقدمه

اصطلاح «سلول بنیادی» اولین بار توسط ارنست هکل در

سال ۱۸۶۸ برای توصیف تکوین جنینی بیان شد (۱). در سال ۱۹۰۸، الکساندر ماکسیموف، بافت شناس روسی، مطرح کرد که سلول‌های خونی از سلول‌های بنیادی خونساز منشاء می‌گیرند و اصطلاح «سلول بنیادی» را برای گفتمان علمی ایجاد کرد. اکتشافات بعدی با اولین پیوند مغز استخوان در سال ۱۹۶۸ به اوج خود رسید و انواع مختلف سلول‌های بنیادی را شناسایی کرد که منجر به پیشرفت در علوم بالینی و کاربردهای درمانی گردید. تحقیقات علمی در این زمینه از ابتدا همواره با مسائل اخلاقی پیچیده و بحث برانگیز همراه بوده است اما با وجود چالش‌های فراوان، قریب به اتفاق رویکرها مثبت و امیدوار کننده است (۲). سلول‌های بنیادی، بر اساس منبع، به سه نوع طبقه‌بندی شده‌اند: (I) سلول‌های بنیادی جنینی (ESCs)، (II) سلول‌های بنیادی بالغ (ASCs) و (III) سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (iPSCs). سلول‌های بنیادی جنینی انسان (hESCs) که از بلاستوسیست‌های اولیه مشتق می‌شوند، دارای پتانسیل تمایز به هر نوع سلولی هستند. اصطلاح "سلول بنیادی جنینی" توسط مارتین (۱۹۸۱) ابداع شد که اهمیت آنها در درک مکانیسم بازسازی بافت و طب ترمیمی به دلیل خود نوسازی و انعطاف پذیری، این سلول‌ها را برجسته می‌کند (۳، ۴). سلول‌های بنیادی بالغ (ASCs)، که به عنوان سلول‌های بنیادی سوماتیک نیز شناخته می‌شوند، سلول‌های تمایز نیافته با ظرفیت خود نوسازی و تمایز

۱. گروه علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. leini@srbiau.ac.ir

را بیان نمی کردند) پس از انتقال به موش قادر به ایجاد تومور نبودند (۱۴). این خصوصیات CSC ها و نقش کلیدی آنها در توسعه تومور و مقاومت در برابر درمان های ضد سرطان، بر اهمیت توسعه استراتژی های درمانی برای هدف قرار دادن اختصاصی و موثر جمعیت سلول های بنیادی سرطان به منظور تقویت اثربخشی درمان، کاهش عود مجدد و متاستاز تاکید می کند. از سوی دیگر با وجود پیشرفت هایی که در روش های جداسازی، خصوصیات و کشت CSC صورت گرفته است، اما حفظ و نگهداری این جمعیت کم سلولی هنوز یک چالش بزرگ در زمینه مطالعات CSC است. از این رو، نیاز فزاینده ای به پروتکل های ذخیره سازی/انجماد قابل تکرار این سلول ها وجود دارد. به نظر می رسد که مطالعه در زمینه CSC ها یک هدف چالش برانگیز اما امیدوارکننده برای از بین بردن کامل سرطان است. در نظر گرفتن ارتباط بالینی سلول های بنیادی سرطانی که در زمینه انکولوژی در حال افزایش است، به اهمیت کرایوپرزرویشن و نگهداری آنها در این زمینه در حال ظهور می افزاید (۱۵).

انجماد یک عامل ذاتی در نظر گرفته می شود که می تواند به پایداری سلول های بنیادی کمک کند. در همین راستا، یکی از گام های حیاتی در فرآیندهای زیستی سلول درمانی، بهینه سازی تکنیک های انجماد سلولی است که تغییرات در عملکرد بیولوژیکی، تمایز خود به خود و آسیب های برگشتناپذیر به سلول ها پس از انجماد و ذوب را به حداقل برساند. پروتکل های کنونی برای انجماد و نگهداری سلول های بنیادی خون ساز و مزانشیمی، کم و بیش از نظر بالینی مؤثر و ایمن هستند، در حالی که هنوز اختلاف نظر و تناقضات قابل توجهی در مورد پروتکل ها و متدولوژی مورد استفاده در ذخیره سازی و ایمنی hESCs و iPSCs وجود دارد (۱۶، ۱۷).

هستند. عملکرد آنها در درجه اول حفظ و ترمیم بافتی است که در آن قرار دارند و به طور بالقوه، می توانند نقش مهمی در پزشکی بازساختی و درمان مبتنی بر پیوند در آینده ایفا کنند (۵-۷). سلول های بنیادی پرتوان القایی که در دهه های اخیر در آزمایشگاه توسعه یافته اند و امکان تولید سلول های بنیادی از انواع سلول های مختلف را فراهم می کنند؛ تیم یاماناکا این قابلیت برنامه نویسی مجدد را در سال ۲۰۰۶ با استفاده از چهار فاکتور رونویسی نشان داد (۸). در سال ۲۰۰۷، همان محققان موفق شدند iPSC های انسانی را به عنوان جایگزینی برای ESC های انسانی معرفی کنند، آنها شبیه سلول های بنیادی جنینی هستند و می توانند به عنوان یک مدل خوب برای مطالعه پرتوانی، سرنوشت سلولی و مدل سازی بیماری مورد استفاده قرار گیرند (۹).

سلول های بنیادی سرطان (CSCs ها) جمعیت نادری از سلول های تومور با خواص سلول های بنیادی هستند که به عنوان محرک اصلی رشد بدخیمی، مقاومت در برابر درمان، به عنوان سلول های آغازگر تومور (TIC)، مسئول عود مجدد و متاستاز در نظر گرفته می شوند، CSC های تمایز نیافته، هم در تومورهای جامد و هم در تومورهای غیر جامد، از جمله سرطان خون، ریه، مغز، سر و گردن، سینه و سرطان روده بزرگ و پانکراس شناسایی شده اند (۱۰-۱۲). در اواخر دهه ۱۹۹۰، Dick و Bonnet جداسازی یک زیرجمعیت از سلول های CD34+/CD38- را در لوسمی حاد میلوئیدی (AML) گزارش کردند که قادر به خودنوسازی، توانایی ایجاد بدخیمی و شروع AML انسانی در موش های NOD/SCID بودند (۱۳). این مفهوم در تومورهای مربوط به سرطان پستان به وسیله Al Hajj و همکارانش نشان داده شد، آنها در سال ۲۰۰۳، تومورزایی در موش های NOD-SCID را با استفاده از میزان ۲۰۰ سلول با فنوتیپ (CD24⁻ و CD44⁺) نشان دادند و این در حال است که مقادیر بسیار بیشتر از سلولها (۲۰۰۰۰ سلول که این مارکرها

حفظ زیستی برای نمونه‌های پستانداران، به طور گسترده‌ای به عنوان یک فناوری توانمند برای انواع کاربردهای زیست پزشکی مانند سلول درمانی، درمان با سلول‌های بنیادی (۱۸)، پزشکی بازساختی (۱۹)، مهندسی بافت (۲۰)، پیوند اعضا و پزشکی بیوماکرومولکول‌ها (مانند پروتئین‌ها و mRNA) (۲۱) استفاده می‌شود. از آنجایی که نمونه‌های زیستی می‌توانند فعالیت متابولیک آزمایشگاهی و زمان تخریب خود را در دماهای پایین کاهش دهند، معمولاً در شرایط دمای پایین ذخیره می‌شوند تا دوره نگهداری آنها طولانی شود، با این حال، نمونه‌ها در دمای پایین، از شرایط فیزیولوژیکی طبیعی خود دور هستند، که به ناچار تغییرات بیوفیزیکی و بیوشیمیایی و آسیب به سلول‌های حفظ شده را القا می‌کند. این صدمات نه تنها به دلیل انتقال فاز (به عنوان مثال، تشکیل یخ در داخل و خارج سلول‌ها) در دماهای زیر صفر در طول فرآیندهای انجماد و بازیابی (۲۱)، بلکه به دلیل تغییرات اساسی، فعالیت‌ها و عملکردها در سلول‌ها ایجاد می‌شوند. در این راستا بازیابی، حفظ یکپارچگی و به دنبال آن تکثیر سلول‌ها مهمترین هدف، پس از ذوب نمونه‌های منجمد است (۲۲). مرور نتایج مطالعات این زمینه، به واکنش متفاوت انواع سلول‌های مختلف به استرس سرما اشاره دارد؛ به عنوان مثال، سلول‌های بنیادی جنینی در مورد تمایز در شرایط استرس سرما، شکننده‌تر و آسیب‌پذیرتر هستند، که می‌تواند منجر به کاهش بازیابی و بقای آنها در هنگام ذوب شود (۲۳). اما دانش ما در مورد تأثیر سرما بر سلول‌های بنیادی سرطانی محدودتر است و به دلیل موضوعات تکنیکی و عدم وجود روش‌ها و تکنیک‌های استاندارد، نگهداری و ذخیره‌سازی این سلول‌ها می‌تواند منجر به تغییرات در بسیاری از عملکردهای بیولوژیکی سلول، از جمله ترکیب لیپیدی غشاهای، نشانگرهای زیستی و همچنین سرکوب سرعت سنتز پروتئین و تکثیر سلولی شود (۲۴).

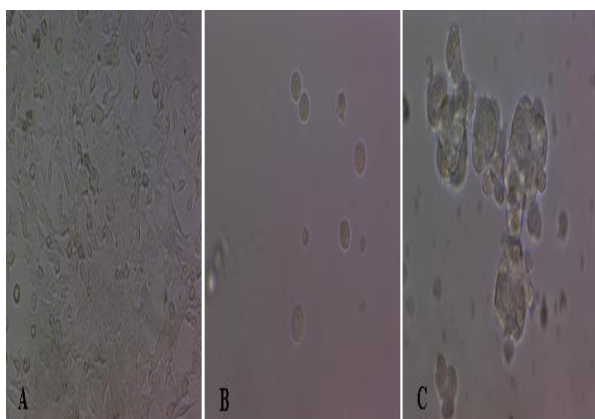
۲۵). ایجاد شرایط خاص برای ذخیره سازی سلول‌های بنیادی سرطانی برای جلوگیری یا کاهش این معایب مهم خواهد بود. لذا در این مطالعه تأثیر انجماد را بر بقا و ویژگی‌های سطحی ماموسفیرهای حاوی سلول‌های بنیادی سرطانی مشتق شده از رده سلولی سرطان پستان موشی (4T1)، مورد بررسی قرار گرفت و حفظ یکپارچگی ساختاری CSC ها در مقایسه با هم‌تایان غیر منجمد شده مقایسه شد.

مواد و روش کار

رده سلولی سرطان پستان موشی (4T1)، از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (IBRC) خریداری و در محیط کشت RPMI-1640 (invitrogen, 12633-012) همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Gibco, 10270), 2 mM L- glutamine (Gibco, 35050-061), 1% non-essential amino acid (Gibco, 11140-050) کشت شد.

زمانیکه تراکم سلول‌های 4T1 در فلاسک به میزان ۸۰ تا ۹۰ درصد رسید، محیط کشت آسپیره شد و با PBS از قبل گرم شده و استریل شسته شد. سپس سلول‌ها توسط تریپسین/EDTA جدا شدند و سلول‌های منفرد در ظروف پوشش داده‌شده با پلی‌هما ۱/۲ درصد (Sigma, P3932) با تراکم حدود 0.8×10^5 سلول در میلی‌لیتر در محیط DMEM/F12 بدون سرم (Gibco, 31331-028) کاشته شدند. جهت کشت ماموسفیرها به محیط کشت ترکیبات غنی کننده شامل ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر فاکتور رشد پایه فیبروبلاست (PeproTech, bFGF, 450-33-50UG)، ۲۰ نانوگرم در میلی لیتر فاکتور رشد اپیدرمی (PeproTech, EGF, 315-09-100UG)، ۲٪ B27 (Gibco, 12587-010)، هپارین ۲٪ (cell technology, 07980)، ۲ میلی مولار آل-گلوتامین، ۱٪ اسید آمینه غیر ضروری و ۱٪ پنی سیلین-استرپتومایسین اضافه گردید.

چهارم به حداکثر اندازه ۷۰ میکرومتر با شکل کروی پایدار و ساختار فشرده رسیدند (نگاره ۱، B و C).



نگاره ۱- سلولهای رده 4T1 و ماموسفیرهای درحال تشکیل. نگاره A مربوط به سلول های رده 4T1 آدنوکارسینومای پستانی موشی در کشت دو بعدی. نگاره های B و C مربوط به اسفیر های درحال تشکیل در محیط حاوی فاکتورهای رشد مورد استفاده و در فلاسک های پوشانده شده با پلی هما. نگاره C مربوط به اسفیر های روز چهارم تشکیل شده است و مشاهده می شود که اسفیر ها ساختارهایی کروی با حاشیه منظم دارند.

ماموسفیرها در روز چهارم برای اندازه بهینه و زنده مانی برداشت شدند. ارزیابی مورفولوژی و زنده مانی کره ها پس از انجماد نشان داد که انجماد، ساختارهای اولیه اسفیر را با مرگ سلولی کمی در مقایسه با نمونه های تازه حفظ می کند. مورفولوژی سلولی نشان داد که پیرامون ماموسفیرهای منجمد علائم مشخصی از فرآیند تجزیه در طول زمان در مقایسه با هم تایان غیرمنجمد مشاهده نمی شود (نگاره ۲، c و f). برای بررسی بیشتر اثرات بالقوه انجماد بر روی اسفیرها، مورفولوژی سه بعدی ماموسفیرهای تازه و منجمد شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مقایسه شد. نمونه های غیر منجمد ساختار کروی با سازماندهی فشرده داشتند و برجستگیهای سطحی منظمی را نشان داد (نگاره ۲، a و b)،

پروسه انجماد و ذوب

برای انجماد، ماموسفیرها در روز چهارم کشت برداشت شدند و دو بار با PBS شسته شد. این اسفیرها در کرایومدیا حاوی ۹۰٪ FBS و ۱۰٪ DMSO (Sigma, D2660) به کرایویال های ۱.۸ میلی لیتری منتقل شدند. سپس نمونه ها در -۸۰ درجه سانتیگراد و در ظرف انجماد (Mr. Frosty با سرعت سرد شدن ۱ درجه سانتیگراد در دقیقه منجمد شدند (Mr. Frosty; Nalgene Nunc International, Rochester,) (NY, <http://www.nalgenelabware.com>). کرایویال ها به مدت ۹ ماه در مخزن نیتروژن مایع نگهداری شدند. برای ذوب، کرایویال ها از نیتروژن مایع خارج شده و به سرعت در حمام آب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. محتویات کرایویال ها قبل از کشت با محیط DMEM/F12 شسته شد.

میکروسکوپ الکترونی روبشی

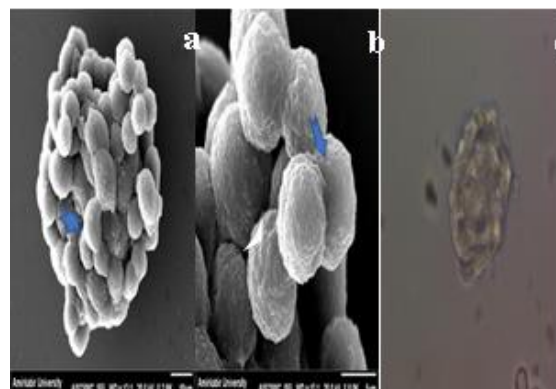
هر دو گروه از اسفیر ها (اسفروئیدهای تازه و اسفروئیدهای ذوب شده) با PBS شسته شده و در ۲.۵٪ گلو تارآلدئید و ۴٪ پارافرمالدئید فیکس شدند، سپس با یک سری غلظت افزایشی اتانول آبگیری شدند. نمونه ها بر روی لام شیشه ای استریل با استفاده از پی پت قرار گرفتند و سپس با طلا-پالادیوم پوشانده شدند. نمونه های کوت شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM, Seron Technology, AIS-2100, Korea) مورد بررسی قرار گرفتند و تصویر برداری از آنها انجام شد.

نتایج

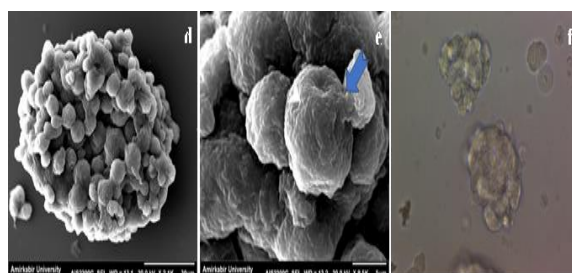
رده سلولی 4T1 برای تشکیل اسفروئید استفاده شد (نگاره ۱، A). ماموسفیرهای مشتق شده از 4T1 با روش بدون سرم و با استفاده از پلیت های پوشش داده شده با پلی هما، تشکیل شدند. اسفروئیدها از روز اول رشد کردند و در روز

ویژگی‌های مشابه سلول‌های بنیادی تأثیر می‌گذارد؛ اما کار با اسفروئید های تازه با محدودیت هایی مانند در دسترس بودن مقادیر کمی از نمونه بالینی و تغییرات فنوتیپی بین نمونه های بیماران مانند درجه تهاجمی و مشخصات ژنومی مختلف، همراه است. علاوه بر این، پیاده‌سازی و پیوند آنها در مقیاس بزرگ که نیاز به تکثیر و کشت در زمان محدود دارند، برنامه‌ریزی برای آزمایش‌های تکرارپذیر و کنترل‌شده را دشوار می‌کند. همچنین، تولید و تایید اسفروئید های غنی شده با CSC ها نیاز به مدل های حیوانی با سن مناسب برای کاشت تومور و مطالعات تومورزایی در داخل بدن دارد. از این رو، می‌توان نتیجه گرفت که روش انجماد موفق اسفروئید ها، استفاده از حیوانات و هزینه های مربوطه را به شدت کاهش می‌دهد و چالش دسترسی به آنها را حل می‌کند (۲۶). از سوی دیگر، نادر بودن CSC ها در تومور، دستیابی به تعداد مناسب از چنین سلول‌هایی را برای انجام پروژه‌های تحقیقاتی دشوار می‌کند. از این رو، انجماد اسفروئید ها می‌تواند دسترسی به مقدار مناسبی از این سلول ها را فراهم کند (۲۶، ۲۷). همچنین، روش انجماد آنها، امکان استفاده گسترده تر را با شرایط و منبع مشابه توموری فراهم خواهد کرد. و طراحی مطالعات تجربی بعدی را در مقاطع زمانی مناسب تسهیل می‌کند.

با وجود پیشرفت‌هایی که در روش‌های جداسازی و کشت CSC ها صورت گرفته است، نگهداری CSC هنوز یک چالش بزرگ در زمینه مطالعات CSC است. از این رو، نیاز فزاینده ای به پروتکل های ذخیره سازی و انجماد مناسب و قابل تکرار این سلول ها وجود دارد. در این مطالعه، ضمن مرور استراتژی های مرتبط با فریز سلول‌های بنیادی و سلول‌های بنیادی سرطانی، به تأثیر انجماد بر روی



نگاره ۲- تصاویر مقایسه بین شکل، اتصال سلول و ویژگی های سطح در نمونه های انجماد شده (ردیف های پایین) و کنترل (ردیف های بالایی) توسط تصاویر SEM. از نظر مورفولوژیکی، تشکیل ساختار اسفروئیدی پس از ذوب در مقایسه با نمونه‌های تازه، پایدار است (d در مقابل a). e نشان می‌دهد که اتصالات بین سلولی پس از انجماد در مقایسه با (b) (فلش های آبی) حفظ می‌شوند، همچنین برجستگیهای سطحی کوتاه در سطح سلولها (سر پیکان سفید) در هردو وجود دارد. c و f نشان‌دهنده تصاویر ماموسفیر های غیر منجمد و منجمد با میکروسکوپ نوری است. منطقه قشری ماموسفیر های منجمد علائمی از تمایز را نشان نمی‌دهد و یکپارچگی ساختاری و شکل کروی نمونه های منجمد حفظ شده است.



همچنین ارتباط بین سلولی بین سلول های مجاور، بصورت ساختارهای شبه پدیکل که از بدنه سلولی منشا می‌گیرد و ساختارهای چسبندگی بین سلولی را ایجاد می‌کند، نشان داد (نگاره ۲، a و b، فلش های آبی). اسفیرهای پس از ذوب مورفولوژی شبیه به اسفیرهای تازه را نشان دادند. ماموسفیرهای منجمد به خوبی ساختار و ویژگی های سطح سلولی خود را بدون تغییر شکل مشخص حفظ کردند (نگاره ۲، d و e).

بحث

یکی از مدل‌های غالب کشت سه بعدی سرطان، اسفروئید تومور است که بر تولید زیرجمعیت سلول‌های سرطانی با

ماموسفیرها، به عنوان مخزن غنی از سلول‌های بنیادی سرطانی پستان مشتق از سلول‌های 4T1 پرداختیم.

یک مرحله حیاتی در انجماد نه تنها بقا و تکثیر سلولی است، بلکه حفظ یکپارچگی سلولی و نشانگرهای زیستی بالقوه است، به ویژه اگر کاربرد بالینی مورد نظر باشد. در این راستا، تنها تعداد محدودی از مطالعات به این موضوع پرداخته‌اند (۲۶). کاهش بیان معنی دار در آنالیز بیان ژن در مقایسه سلول‌های بنیادی سرطان ریه و سرطان پستان تازه در مقابل نمونه‌های پس از ذوب آنها گزارش شده است (۲۴). در این مطالعه مقایسه تغییرات بیان ژن بین سلول‌های بنیادی سرطان ریه و پستان انجام شد و شباهتی بین دو جمعیت ژن‌های با بیان متفاوت از نظر عملکردهای بیولوژیکی، توزیع و مسیرهای متعارف، از جمله ژن‌های دخیل در اختلالات ژنتیکی، مرگ سلولی، رشد و تکثیر سلولی وجود داشت. همچنین آنها در آنالیز فلوسایتومتری برخی از بیومارکرهای اصلی سطح سلول‌های بنیادی سرطان ریه (لانگوسفیر) الگویی از کاهش مارکرها را به دنبال انجماد نشان دادند که نشان دهنده حساسیت غشای سلول بنیادی به انجماد است (۲۴). از سوی دیگر نتایج Chong, Y-K و همکاران به حفظ ویژگیهای نورو سفیرهای حاصل از گلیوبلاستوما مولتی فرم در شرایط پس از انجماد اشاره دارد (۲۶). در مطالعه پیشین ما، داده‌های Real PCR time و آنالیز فلوسایتومتری ژن‌های بنیادی و بیان نشانگرهای سطح CSC نشان داد که کولونوسفرها، ویژگی سلول‌های بنیادی را حفظ می‌کنند و تفاوت شدیدی را بین دو نوع اسفیر تازه و کرایوپرزرو شده مشاهده نکردیم. که کارایی این روش را در نگهداری از ویژگی‌های CSC ها تایید می‌کند (۲۷). میکروگراف‌های SEM نشان داد که کروی‌های منجمد یکپارچگی ساختار و ویژگی‌های

سطحی خود را حفظ می‌کنند و تفاوت واضحی در شکل کولونوسفرها پس از ذوب در مقایسه با نمونه‌های تازه دیده نشد. از آنجایی که رنگ‌آمیزی DAPI یک روش عملی برای تصویربرداری عمق اسفیرها است، در مطالعه پیشین از این روش برای ارزیابی یکپارچگی لایه‌های داخلی در ساختار اسفیر استفاده کردیم. نتایج به یکپارچگی مورفولوژیکی و ساختاری اسفیرهای پس از ذوب را تایید کرد و تفاوت معنی داری بین گروه کنترل و انجماد مشاهده نشد (۲۷).

در مطالعه حاضر نیز میکروگراف‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی به وضوح نشان داد که ماموسفیرهای پس از ذوب، مورفولوژی و ویژگی‌های ساختاری سطح خود را حفظ می‌کنند. علاوه بر این، هیچ نشانه‌ای از وزیکول‌های استرس و پارگی غشای سلولی که ممکن است با علائم آپوپتوز مرتبط باشد، مشاهده نشد که این یافته‌ها اشاره به زنده ماندن آنها پس از انجماد دارد. برای این منظور اسفروئیدها که غنی از سلول‌های بنیادی سرطانی هستند، از لاین سلولی 4T1 مربوط به رده سلولی سرطان پستان موشی تهیه شد و سپس اسفروئیدهای تازه و ذوب شده با PBS شسته شده و در گلو تار آلدئید ۲.۵٪ و پارافرمالددئید ۴٪ ثابت شدند، در مرحله بعد آبیگری با استفاده از غلظتهای صعودی اتانول انجام شد. نمونه‌ها با طلا-پالادیوم پوشانده شدند و با استفاده از یک میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM، Seron Technology، AIS-2100، کره) مورد بررسی قرار گرفتند.

تفکیک اسفروئیدهای کشت شده به سلول‌های منفرد به منظور انجماد معمولاً نیازمند روش‌های آنزیمی و یا مکانیکی خشن است که مستقیماً بر ظاهر مورفولوژیکی تأثیر می‌گذارد، به غشای سلولی آسیب می‌رساند و بر

حیات سلولی نیز تأثیر دارد و اغلب منجر به از دست دادن عملکرد سلولی می‌گردد (۲۸, ۲۹). انجماد ماموسفیرهای دست‌نخورده ویژگی‌های آنرا با کوچک‌ترین تغییرات نسبت به انجماد تک سلولی حفظ می‌کند، بنابراین، ذخیره CSCها در شرایط سه بعدی برای جلوگیری از این معایب بسیار مهم خواهد بود. داده‌های ما نشان داد که انجماد ماموسفیرها ممکن است راهی کارآمد برای حفظ CSCها باشد. این موضوع را می‌توان تا حدی به وجود یک لایه میانی نسبت داد که شامل سلول‌های ساکن ساندویچ بین هسته نکروزه و لایه محیطی سلول‌های در حال تکثیر است. لذا می‌تواند در مقایسه با این لایه خارجی آسیب کمتری داشته باشد و در اسرع وقت پس از ذوب شدن فعال گردد. در مجموع، چنین داده‌هایی استفاده از این روش انجماد اسفیرهای کامل را برای مطالعات آینده توسط تحقیقات علاقه‌مند تشویق می‌کند.

در مطالعات قبلی، اسفیرها با استفاده از محیط‌های انجماد پیچیده مانند لیفورل، ترهالوز، اتیلن گلیکول و نشاسته منجمد شده‌اند و یا از روش‌های انجماد شیشه‌ای استفاده کردند که دارای محدودیت‌هایی از جمله سمیت انجماد با غلظت بالا و آلودگی میکروبی است (۳۰, ۳۱). در حالی که، در اینجا، ما انجماد را با استفاده از یک محیط ساده (۱۰٪ DMSO و ۹۰٪ FBS) و روش انجماد آهسته مرسوم انجام دادیم. علاوه بر این، مطالعات قبلی اغلب اثر دوره‌های انجماد نسبتاً کوتاه را بر روی اسفیرها ارزیابی کرده‌اند (۳۰)، در حالی که ما آن را برای انجماد طولانی مدت مطالعه کردیم. نتایج ما اثربخشی این روش ساده و کرایومدیا را برای ذخیره سازی ماموسفیرها تایید کرد.

ماموسفیرها با اندازه مناسب (۷۰-۸۰ میکرومتر) و فاقد هسته نکروزه در روز چهارم به عنوان زمان بهینه برای دستیابی به زنده ماندن سلولی منجمد شدند. تغییرات جزئی در مورفولوژی آنها مشاهده شد و ماموسفیرها در طول خنک شدن، انجماد، ذخیره سازی و ذوب شدن تحت فرآیند تجزیه قرار نگرفتند. میکروگراف‌های SEM نشان داد که اسفیرهای منجمد، یکپارچگی ساختار و ویژگی‌های سطحی خود را حفظ می‌کنند. ما تفاوت واضحی در شکل ماموسفیرها پس از ذوب در مقایسه با نمونه‌های تازه تشخیص ندادیم. علاوه بر این، هیچ نشانه‌ای از وزیکول‌ها و پارگی غشای سلولی که ممکن است با علائم آپوپتوز مرتبط باشد، مشاهده نشد. احتمالاً این یافته‌ها ممکن است با زنده ماندن بالا (۳۰) مرتبط باشد، و بنابراین، انجماد می‌تواند یک پلت فرم مفید برای نگهداری ماموسفیرها با حداقل آسیب باشد.

سلول‌های منجمد پس از ذخیره‌سازی طولانی مدت نیز می‌توانند مکانیسم‌های ترمیم اولیه خود را حفظ کرده و به طور طبیعی رشد و تکثیر کنند. با این حال، چندین مطالعه وجود دارد که تغییرات در برخی ویژگی‌های بیولوژیکی و ژنتیکی در سطح مولکولی در جمعیت‌های سلولی پس از ذوب را نشان می‌دهد که این موضوع می‌تواند بدلیل پاسخ متفاوت قابل توجه انواع مختلف سلول به استرس سرما و فرآیندهای انجماد-ذوب باشد. CSCها یک زیرجمعیت بسیار نادر در تومور را نشان می‌دهند و به عنوان اهداف امیدوارکننده جدیدی در درمان سرطان در نظر گرفته شده‌اند، اما دسترسی دائمی به چنین سلول‌هایی وجود ندارد. در این زمینه، جداسازی، شناسایی، تکثیر و تایید CSCها نیازمند سلول‌هایی با منبع و شرایط یکسان، حیوانات برای پیوند و زمان زیادی است. با استفاده از یک استراتژی موثر

- American journal of the medical sciences. 2021;361(6):765-75.
8. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *cell*. 2006;126(4):663-76.
 9. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *cell*. 2007;131(5):861-72.
 10. Aguilar-Gallardo C, Simón C, editors. Cells, stem cells, and cancer stem cells. *Seminars in reproductive medicine*; 2013: Thieme Medical Publishers.
 11. De Francesco EM, Sotgia F, Lisanti MP. Cancer stem cells (CSCs): metabolic strategies for their identification and eradication. *Biochemical Journal*. 2018;475(9):1611-34.
 12. Lonardo E, Hermann PC, Heeschen C. Pancreatic cancer stem cells—update and future perspectives. *Molecular Oncology*. 2010;4(5):431-42.
 13. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine*. 1997;3(7):730-7.
 14. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(7):3983-8.
 15. Karimi-Busheri F, Rasouli-Nia A. Integration, networking, and global biobanking in the age of new biology. *Biobanking in the 21st Century*. 2015:1-9.
 16. Sullivan S, Fairchild PJ, Marsh SGE, Müller CR, Turner ML, Song J, et al. Haplobanking induced pluripotent stem cells for clinical use. *Stem cell research*. 2020;49:102035.
 17. Ji TT, Niu SS, Fang MH, Xu LX, Wang X, Zou J, et al. Genome editing HLA alleles for a pilot immunocompatible hESC line in a Chinese hESC bank for cell therapies. *Cell proliferation*. 2023;56(5):e13471.

انجماد، می توانیم بر محدودیت های ذکر شده غلبه کنیم. در واقع، بانکداری زیستی CSC ها با هدف حفظ ویژگی های بیولوژیکی آنها، منبع ارزشمندی برای مطالعات تجربی بعدی در اختیار ما قرار می دهد. یافته های ما همچنین نشان می دهد که انجماد اجازه ذخیره سازی طولانی مدت ماموسفرها را می دهد که می تواند مطالعه آینده را تسهیل کند.

فهرست منابع

1. Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the origin of the term “stem cell”. *Cell stem cell*. 2007;1(1):35-8.
2. Loya K. Chapter 11 - Stem Cells. In: Padmanabhan S, editor. *Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine*. San Diego: Academic Press; 2014. p. 207-31.
3. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292(5819):154-6.
4. Khan FA, Almohazey D, Alomari M, Almofty SA. Isolation, culture, and functional characterization of human embryonic stem cells: current trends and challenges. *Stem cells international*. 2018;2018.
5. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell*. 2004;116(5):639-48.
6. Eini L, Naghash N, Larijani B, Ai J, Majidzadeh K, Sadroddiny E, et al. Expression of indoleamine 2 3-dioxygenase in endometrial mesenchymal stem cells treated with gamma interferon. *Iranian Journal of Diabetes and Lipid Disorders*. 2014;13(2):153-62.
7. Esmaeili R, Darbandi-Azar A, Sadeghpour A, Majidzadeh AK, Eini L, Jafarbeik-Iravani N, et al. Mesenchymal Stem Cells Pretreatment With Stromal-Derived Factor-1 Alpha Augments Cardiac Function and Angiogenesis in Infarcted Myocardium. *The*

18. Nevi L, Cardinale V, Carpino G, Costantini D, Di Matteo S, Cantafora A, et al. Cryopreservation protocol for human biliary tree stem/progenitors, hepatic and pancreatic precursors. *Scientific Reports*. 2017;7(1):6080.
19. Rodrigues PM, Banales JM. Applications of organoids in regenerative medicine: A proof-of-concept for biliary injury. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2021;18(6):371-2.
20. Wu K, Shardt N, Laouar L, Elliott JA, Jomha NM. Vitrification of particulated articular cartilage via calculated protocols. *NPJ Regenerative medicine*. 2021;6(1):15.
21. Grau S, Martín-García E, Ferrández O, Martín R, Tejedor-Vaquero S, Gimeno R, et al. Covid-19 mrna vaccines preserve immunogenicity after re-freezing. *Vaccines*. 2022;10(4):594.
22. Fu Y, Dang W, He X, Xu F, Huang H. Biomolecular Pathways of Cryoinjuries in Low-Temperature Storage for Mammalian Specimens. *Bioengineering*. 2022;9(10):545.
23. Ware CB, Nelson AM, Anthony Blau C. Controlled-rate freezing of human ES cells. *Biotechniques*. 2005;38(6):879-83.
24. Karimi-Busheri F, Zadorozhny V, Carrier E, Fakhrai H. Molecular integrity and global gene expression of breast and lung cancer stem cells under long-term storage and recovery. *Cell and tissue banking*. 2013;14:175-86.
25. Karimi-Busheri F, Zadorozhny V, Shawler DL, Fakhrai H. The stability of breast cancer progenitor cells during cryopreservation: maintenance of proliferation, self-renewal, and senescence characteristics. *Cryobiology*. 2010;60(3):308-14.
26. Chong Y-K, Toh T-B, Zaiden N, Poonepalli A, Leong SH, Ong CEL, et al. Cryopreservation of neurospheres derived from human glioblastoma multiforme. *Stem cells*. 2009;27(1):29-39.
27. Eini L, Naseri M, Karimi-Busheri F, Bozorgmehr M, Ghods R, Madjd Z. Primary colonospheres maintain stem cell-like key features after cryopreservation. *Journal of Cellular Physiology*. 2020;235(3):2452-63.
28. Canavan HE, Cheng X, Graham DJ, Ratner BD, Castner DG. Cell sheet detachment affects the extracellular matrix: a surface science study comparing thermal liftoff, enzymatic, and mechanical methods. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 2005;75(1):1-13.
29. Tsuji K, Ojima M, Otake K, Horie M, Koga H, Sekiya I, et al. Effects of different cell-detaching methods on the viability and cell surface antigen expression of synovial mesenchymal stem cells. *Cell transplantation*. 2017;26(6):1089-102.
30. Ehrhart F, Schulz J, Katsen-Globa A, Shirley S, Reuter D, Bach F, et al. A comparative study of freezing single cells and spheroids: towards a new model system for optimizing freezing protocols for cryobanking of human tumours. *Cryobiology*. 2009;58(2):119-27.
31. Raju G, Krishna KM, Prakash G, Madan K. Vitrification: an emerging technique for cryopreservation in assisted reproduction programmes. *Embryo Talk*. 2006;1(4):210-27.

