Archive of SID

پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۵، شماره ۱، بهار ۱۳۹۰، صفحات ۴۳ تا ۴۸

مقاله اصلی
(Original Article)

مقایسه سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان و سلول‌های مزوتلیومی مایع سروزی ازنظر میزان بیان مولکول‌های کمپلکس سازگاری نسجی اصلی (MHC)

طاهره فروتن[۱]، محمدامین عبدالهی‌فر[۲]، نریمان مصفا[۳]*

[۱] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت معلم
[۲] گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی
[۳] گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: *مزوتلیوم از سلول‌های مزوتلیال که بر روی یک غشاء پایه مستقرند و توسط بافت همبندی سروزی حمایت می‌گردند، تشکیل شده است می‌تواند ساختار مفیدی برای تکمیل پدیده‌هایی همچون هوموستازیس، ترمیم زخم، انتقال مایعات و التهاب باشد. معرفی مایع دیالیزصفاقی در پروسه‌های درمانی نارسایی کلیوی، زمینه قابل توجهی را برای شناخت بیولوژی سلول‌های مزوتلیال صفاقی وسلولهای بنیادی همراه ان فراهم می‌نماید.*

روش بررسی: *به منظور مطالعه ساختار و امکان بررسی نیروی بالقوه سلول‌های مزوتلیال ومزانشیمی اخذ شده از مایع دیالیز صفاقی بیمارانی که فاقد علامت تورم صفاق در طول درمان بودند، اقدام به شناسایی مارکرهای سطحی شامل MHC کلاس I وII با تکنیک فلوئوسیتومتری شد. هم‌زمان با کشت این سلول‌ها در ۴ پاساژ پی‌درپی، با یافته‌های مشابه از سلول‌های مزانشیمال مغز استخوان مقایسه شد.*

یافته‌ها: *هر دو گروه سلول‌های مزوتلیالی صفاقی و مزانشیمال مغز استخوان فاقد عرضه MHC کلاس II بودند. سلول‌های مزوتلیالی برخلاف مغز استخوان، عرضهٔ بسیار کمتری از کلاس I را نشان دادند.*

نتیجه‌گیری: *استفاده از سلول‌های صفاقی به عنوان انتخاب مناسبی در طب جایگزین و درمان ترمیمی می‌تواند زمینه‌ای برای تحقیقات آینده و کاربردی نمودن نتایج آن باشد.*

واژگان کلیدی: *دیالیز صفاقی، سلول‌های مزوتلیال، سلول بنیادی، عرضه مجموعه سازگاری نسجی.*

مقدمه

بهره‌گیری از سلول‌های بنیادی جنینی و بالغ به‌منظور ترمیم ضایعات بافتی و عضوی، روشی رایج و کارآمد تلقی می‌شود. تاکنون منابع سلولی مختلفی برای این منظور پیشنهاد گردیده است که یکی از متداول‌ترین آنها مغز استخوان است (۱). اخیرا مایع پریتونئال به عنوان منبع غنی از سلول‌های بنیادی مطرح گردیده است (۲). اخذ آنها از دیالیز صفاقی مبتلایان به نارسایی کلیوی به راحتی و فراوانی صورت می‌گیرد. لایه منفردی از سلول‌های مزوتلیالی بر غشاء پریتونئوم و لایه نازک پیوندی غنی از سلول‌های مزانشیمی با منشاء جنینی قرار دارند که پس از اندام‌زایی، هم‌چنان در محوطه صفاقی باقی می‌مانند و حتی وارد مایع صفاقی می‌گردند (۵-۳).

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه گروه ایمنولوژی، دکتر نریمان مصفا (**e-mail:** mosaffansar@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۹/۲
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۹/12/۱۱

www.SID.ir

Archive of SID

با وجود مطالعات وسیع در زمینه ایمنی‌زایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و اثبات بیان ضعیف آلوآنتی‌ژن‌ها در سطح آنها باز هم خطر رد پیوند در مقابل این منابع سلولی وجود دارد و مانع مهمی در کاربرد آنها به حساب می‌آید. به همین جهت توجه محققان به منابع دیگر این سلول‌ها سبب گردیده که تحقیقات جدیدی در زمینه امکان استفاده از آنها در سایر محوطه‌های بدن مطرح گردد. لازم است عوامل ایمنی‌زایی آنها نیز به طور دقیق مورد بررسی و مطالعه قرار گیرد. از آنجایی که اصلی‌ترین آلوآنتی‌ژن‌های دخیل در رد پیوند، فرآورده‌های ژن‌های گروه‌های خونی و کمپلکس سازگاری نسجی Major Histo compatibility complex (MHC) می‌باشند و فرآورده‌های کلاس یک و دو اهمیت ویژه‌ای در ایمنی‌زایی دارند، لازم است بیان این مولکول‌ها در تمامی رده‌های حاصل از سلول‌های بنیادی مورد بحث و بررسی قرار گیرد.

مطالعات بسیاری در زمینه آلوژنیسیته سلول‌های بنیادی مورد پیوند صورت گرفته و نتایج نشان دهنده خطر وقوع آلوژنیسیته در مقابل آنهاست. حال به منظور استفاده بهینه از این منابع سلولی و با توجه به جایگاه‌های استقرار بافتی آنها که می‌تواند متفاوت از یکدیگر باشند، لازم است تا میزان بیان این مجموعه‌های آنتی‌ژنیکی در ساختار سلولی آنها مورد ارزیابی قرار گیرد. در این مطالعه از منابع با ارزشی مانند مغز استخوان و محتویات سلولی مزوتلیال واقع در صفاق به عنوان سلولهای بنیادی استفاده گردیده تا به طریق آنالیز فلوسیتومتری پس از کشت مناسب در شرایط آزمایشگاه به شدت ایمنی‌زایی آنها از طریق سنجش آنتی‌ژنهای کلاس I و II پی برده و مورد مقایسه قرار گیرند. به عبارت دیگر این تحقیق با هدف ارزیابی و مقایسه بیان سطحی این مجموعه‌های دخیل در رد پیوند در دو منبع سلول بنیادی از مغز استخوان و مایع صفاقی طراحی گردید. سلول‌های اخذ شده از این دو منبع با ارزش به کمک آنالیز فلوسیتومتری مورد مقایسه قرار گرفتند. بدین ترتیب آلوآنتی‌ژنتیسیته این دو گروه سلول از حیث بیان مارکرهای کلاس یک و دو(DR,DQ) و در نتیجه قدرت ایمنی زایی آنها مشخص شد.

مواد و روشها

محتویات حاصل از مغز استخوان انسانی از بخش پیوند بیمارستان شریعتی تهیه گردید. اهداکنندگان از نظر بیماری‌های زمینه‌ای هماهنگ و بررسی گردیدند. مایع سروزی حاصل از دیالیز صفاقی بیماران مبتلا به نارسایی کلیوی نیز از بیمارستان طالقانی دریافت شد. نمونه‌ها در شرایط کاملا استریل به آزمایشگاه کشت سلولی منتقل شدند. به کمک گرادیان غلظتی وماده فایکول هپاک (۱۰۷۴شرکت بهارافشان) محتویات سلولی تک‌هسته‌ای با سانتریفوژ g۴۰۰ به مدت ۲۵ دقیقه در۲۰ درجه سانتی‌گراد تهیه گردید.

هر یک از دو گروه اخذ شده در بافر هنکس شستشو و سانتریفوژ گردیدند (۲۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد). ته نشین نهایی سلولی در فلاسک مخصوص (۲۵ سانتی‌متر مربع) حاوی محیط کشت کامل سلولی شامل DMEM (sigma)، ۱۰ FBS درصد (Gibco) و آنتی بیوتیک قرار گرفتند و در انکوباتور با جریان CO2 ۵ درصد و رطوبت ۹۶ درصد انکوباسیون شدند. در طول سپری شدن مراحل کشت، با مشاهده پیوستگی رشد سلول‌ها در بستر، پاساژ سلولی و کشت گسترده انجام شد. در پاساژ مرحله چهارم حذف تدریجی سایر سلول‌های موجود در محتویات شامل ماکروفاژ، فیبروبلاست و سایر رده‌های لکوسیتی صورت گرفت. در حداکثر رشد لگاریتمی، شمارش و تعیین viability به کمک تریپان بلو ۴ درصد انجام پذیرفت. در خاتمه، سلول‌های چسبنده به کمک اسکراپر مخصوص از بستر کشت، برداشت گردیدند.

برای ایمونوفنوتایپینگ از مواد زیر استفاده شد:

الف- آنتی‌بادی‌ها: معرف‌های نشانه شده بر اساس آنتی‌بادی‌های مونوکلونال تحت عنوان

Mouse anti human class I (FITC conjugated) (sigma), mouse anti human class II (a:DR b:DQ) PE conjugated(sigma)

که با رقت ۱ در ۱۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه در یخچال انکوبه گردیدند.

ب- فلوسیتومتری: با خاتمه انکوباسیون، سلول‌ها با بافر مخصوص شامل PBS: BSA,1/100 که به میزان ۴ درصد با پارافرمالدئید و ۱٪ سدیم ازاید مخلوط شده بود، فیکس گردیدند. به کمک دستگاه فلوسیتومتر PARTEC با version III، آنالیز مارکرهای بیان شده در روند خوانش دو رنگی، صورت پذیرفت. لازم به ذکر است که به منظور کاهش خطا و افزایش دقت کار، حداقل ۳ بار برای هر نمونه، مراحل مختلف شامل جداسازی، کشت و آنالیز فلوسیتومتری انجام پذیرفت.

واکنش غیر اختصاصی آنتی‌بادی‌ها به کمک پروسه Isotype matching مورد سنجش و هماهنگی قرار گرفت.

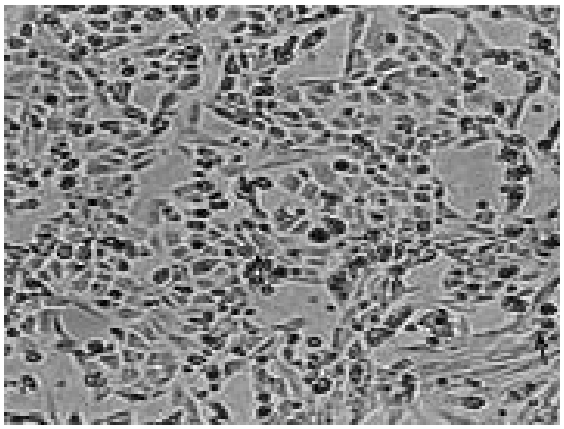
یافته‌ها

در کشت اولیه سلول‌های مغز استخوان، تک هسته‌ای‌های مزانشیمی همراه با سایر رده‌های سلولی به خلوص کامل و

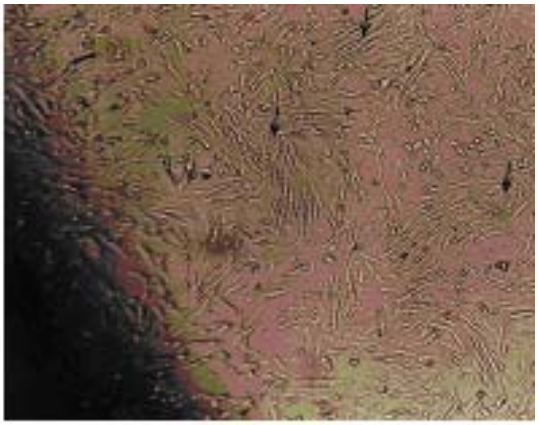
www.SID.ir

Archive of SID

تکثیر پرداختند (شکل۱). پس از چهارمین پاساژ، رشد و خلوص سلول‌های مزانشیمی فیبروبلاستوئیدی مشاهده شد، به طوری که سایر رده‌ها در طول این مدت حذف گردیدند (شکل ۲). کشت اولیه سلول‌های مزوتلیالی با مورفولوژی متفاوت حاصل از مایع پریتونئوم به خوبی انجام گرفت (شکل ۳). در این رده نیز پس از ۴ پاساژ متوالی، سلول‌های مزانشیمی پدیدار گردیده و مورفولوژی قابل ملاحظه‌ای را نشان دادند (شکل ۴).

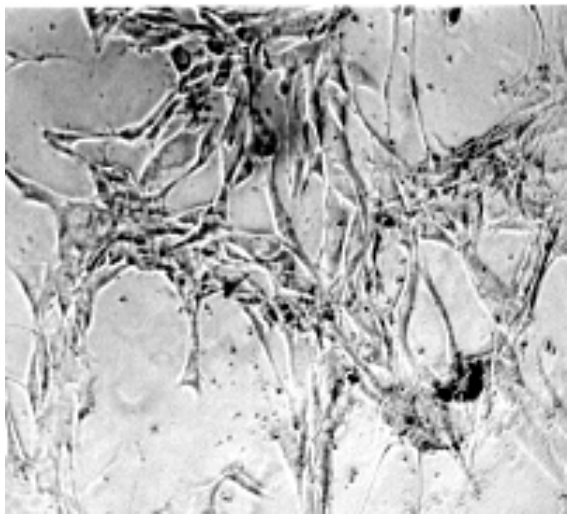


شکل ۱- کشت اولیه سلول‌های مغز استخوان انسان. بزرگنمایی ۱۰۰



شکل ۲- سلول‌های پاساژ ۳ مغز استخوان انسان (پیکان). بزرگنمایی ۱۰۰

شکل ۳- کشت اولیه سلول‌های مزوتلیالی مایع پریتونئال انسان. بزرگنمایی ۱۰۰

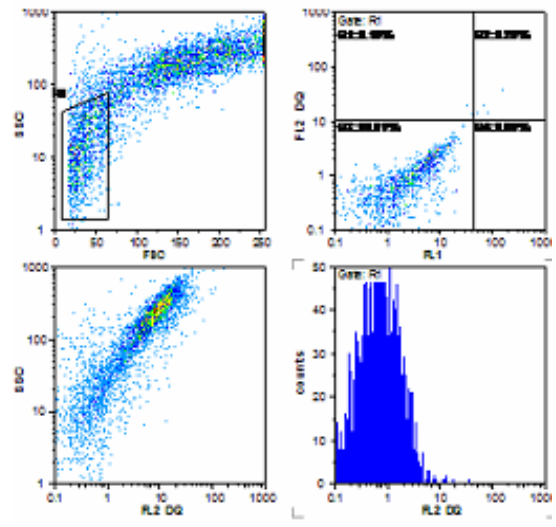


شکل ۴- سلول‌های پاساژ ۳ حاصل از مایع پریتونئال انسان. بزرگنمایی ۲۰۰

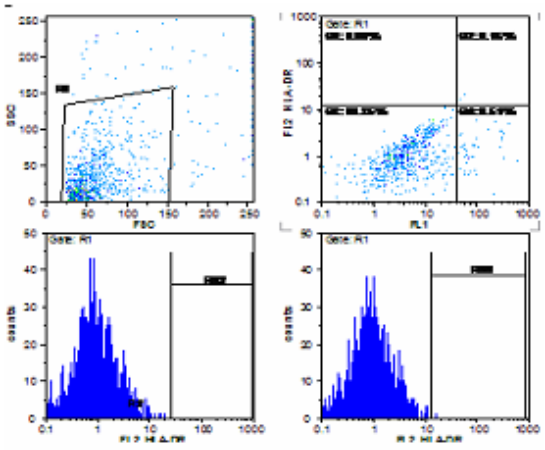
نتایج فلوسیتومتری سلول‌های مزانشیمی مایع سروزی، میزان بیان مولکول MHC I را ۳۳ درصد نشان داد، ولی عدم بیان MHC II ملاحظه گردید. بیان مولکول‌های MHC DR ,DQ از دسته ۲ آنتی‌ژن‌های MHC در سلول‌های فوق مشاهده نگردید. در مورد سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان تقریبا همین الگو تبعیت شدف با این تفاوت که میزان بیان مولکول‌های MHC I در سلول‌های حاصل از مغز ستخوان بیشتر از سلول‌های حاصل از سروز بود.

www.SID.ir

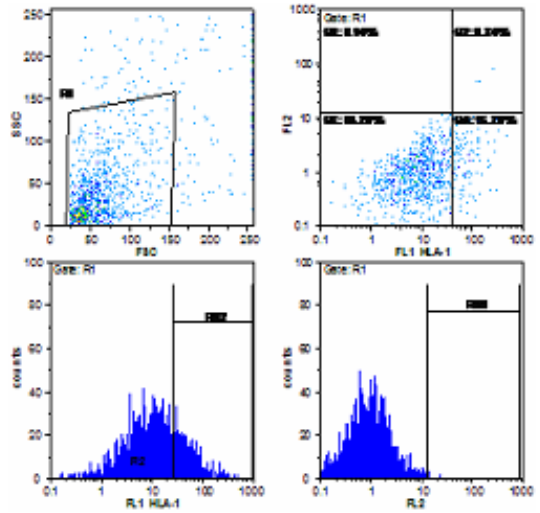
Archive of SID



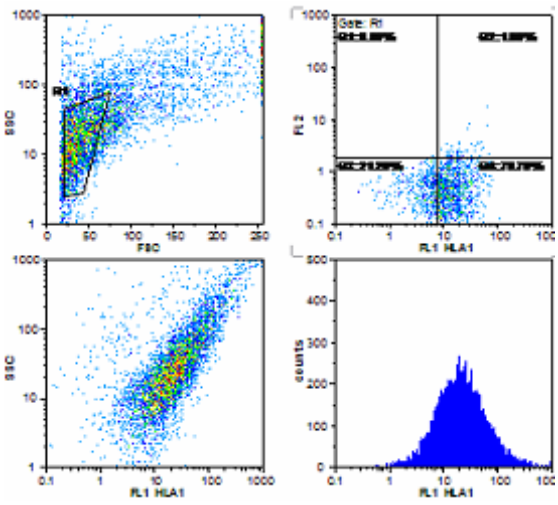
الف



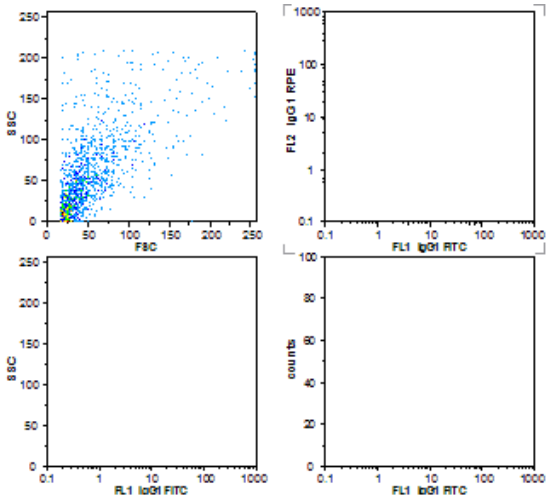
ب



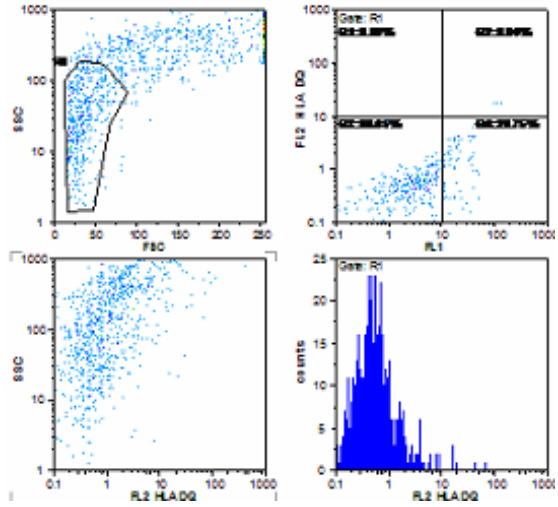
ج



د



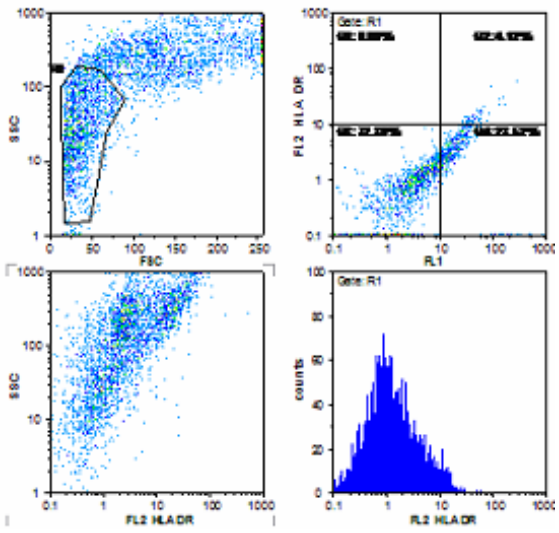
ه



و

www.SID.ir

Archive of SID



ز

شکل ۵- نتایج آنالیز فلوسیتومتری در نمونه‌های مورد مطالعه.
الف: MHC II, DQ از سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان در پاساژ ۳
ب: MHC II,DR از سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان در پاساژ ۳
ج: MHC I از سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان در پاساژ ۳
د: MHC II, DQ از سلول‌های مزانشیمی مایع پریتونئال در پاساژ ۳
ه: MHC II ,DR از سلول‌های مزانشیمی مایع پریتونئال در پاساژ ۳
و: MHC I از سلول‌های مزانشیمی مایع پریتونئال در پاساژ ۳
ز: گروه کنترل

بحث

پزشکی ترمیمی به کمک تجویز و کاربرد سلول‌های بنیادی روزبه روز در حال گسترش و توسعه می‌باشد و لازمه فراوانی کاربرد آن، دست یابی به منابع جدید علاوه بر مغز استخوان می‌باشد. علی‌رغم تحقیقات بسیار در این زمینه، هنوز ابهامات چندی پیرامون نحوه عملکرد این سلول‌ها وجود دارد. دسترسی به سایر منابع سلولی آن هم بافتهایی غیر از مغز استخوان شامل بافت چربی، پوست، قرنیه و خون محیطی می‌تواند بسیاری از مشکلات و محدویت‌های اخلاقی را در کاربرد سلول‌های بنیادی جنینی برطرف سازد. سلول‌های بنیادی واقع در بافت‌های بالغ مدت‌ها به حالت تمایز نیافته در لابلای سلول‌های بالغ حضور دارند و در شرایط جداسازی و کشت آزمایشگاهی همچنان قادر به تجدید و خود تکثیری می‌باشند. هرچند که دغدغه امکان ایمنی‌زایی آنها در بدن افراد گیرنده متعاقب پیوند هنوز مطرح می‌باشد. در این موارد نیز یکی از مشکلات موجود، پاسخ‌های ایمنی‌زایی در برابر تزریق آنهاست. وقوع آلوایمیونیسیته در مقابل آنها یکی از خطرات غیر قابل اجتناب می‌باشد. انتخاب منبعی که بتواند سلول‌های با ایمونوژنیسیته کم در اختیار قرار دهد، اهمیت بسیار ویژه‌ای دارد. منابع باارزشی همچون مغز استخوان از این نظر، بارها مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته‌اند. بیان MHC I و عدم عرضه MHC II بارها مورد تاکید قرار گرفته است. منبع سهل الوصول و قابل دسترسی همچون سلول‌های محوطه پریتونئال، اخیرا مورد توجه قرار گرفته است. مطالعه حاضر با هدف مقایسه عرضه و بیان مارکرهای سازگاری نسجی در دو منبع حاصل از مغز استخوان و مایع صفاقی، سعی در معرفی سلول‌هایی با خطر ایمنی‌زایی کمتر نموده است.

درمطالعه حاضر، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در پاساژ ۳ و سلول‌های مزوتلیالی بدست آمده از مایع دیالیزی در پاساژ ۳ برای انجام تست فلوسیتومتری انتخاب شد. نتایج فلوسیتومتری سلول‌های بنیادی مغز استخوان میزان بیان مولکول MHC I را بیش از سلول‌های پریتونئال نشان داد. این در حالی بود که آنتی‌ژن‌های سطحی MHC II (DR-DQ) بیان نشدند. این یافته‌ها با نتایج دیگر محققین در این زمینه مطابقت داشت (۱۴،۱۳). چنانچه می‌دانیم MHC I در کلیه سلول‌های هسته دار ظاهر می‌گردد، اما MHC II اعم از DR، DQ و DP فقط در گروه کوچکی از سلول‌ها به نام سلول‌های ارائه کننده آنتی ژن(APC یا antigen presenting cell) بیان می‌گردد، بنابراین طبیعی است که انتظار عدم بیان آنها را در هر دو گروه داشته باشیم. عده‌ای از محققین در سال ۲۰۰۷ تفاوت خواص ایمونولوژیک سلولهای مغز استخوان و بافت چربی را قبل از تمایز و بعد از آن بررسی نمودند (۱۳). نتایج آنها نشان داد که الگوی بیان آنتی ژن سطحی در مغز استخوان و سلول چربی شبیه هم بودند. در مطالعه ما نتایج فلوسیتومتری سلول‌های مزانشیمی مایع سروزی میزان بیان مولکول MHC I را ۳۳ درصد نشان داد. در اینجا نیز عدم بیان MHC II ملاحظه گردید. بیان مولکولهای MHC DR, DQ از دسته ۲ آنتی‌ژن‌های MHC در سلول‌های فوق مشاهده نگردید. در مورد سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان تقریبا همین الگو تبعیت شد، با این تفاوت که میزان بیان مولکول-های MHC I در سلول‌های حاصل از مغز استخوان بیشتر از سلول‌های حاصل از سروز بود. نحوه بیان مولکول‌های MHC I توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی بسیار مهم است، زیرا بیان این مولکول‌ها در سلول‌های بنیادی مزانشیمی، این سلول‌ها را در مقابل سلول‌های کشنده طبیعی محافظت می‌کند و عدم بیان مولکول‌های MHC II این امکان را به وجود می‌آورد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی از تحت شناسایی قرار گرفتن توسط سلول‌های TCD4 فرار کنند. درتاییداین یافته نیز در

www.SID.ir

Archive of SID

سال ۲۰۰۲ مشخص شد کـه سـلول‌هـای بنیـادی مزانـشیمی انسان می‌توانند تکثیر سلول‌های مختلط لنفوسیتی و تحریـک شده با فعال کننده پلی کلونال را مهار کنند (۱۵).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که بـا وجـود عـدم بیـان MHC II در هردو منبع سلولی، شـاهد حـضور پـایین‌تـری از عرضه MHC I در سلول‌های با منشاء سروزی بودیم. می‌تـوان نتیجه گرفت که امکان وقوع رد پیوند سـلولی در کـاربرد ایـن نوع سلول بنیادی در مقایسه با مغز استخوان، خطر ایمنی‌زایی کمتری داشـته و وقـوع واکـنش‌هـای سیتوتوکـسیتی توسـط لنفوسیت‌های T فرد گیرنده را به حداقل میزان کـاهش مـی-دهد.

دست‌یابی به این یافته شرایط ویژه حاضر در فضای صـفاقی را که مرتبط با اصول تحمل گوارشی است را حمایت مـی‌نمایـد. این واقعیت که به دلیل تماس دایم این فضا با انواع ترکیبات و فراورده‌های حاصـل از بلـع گوارشـی و ورود مـواد مختلـف بـا پایین‌ترین سطح پاسخ‌های ازدیـاد حـساسیتی و واکـنش‌هـای دفاعی روبرو هستیم، این توجیـه رابـه دنبـال دارد کـه دلیـل عرضه پایین آنتی‌ژن‌های سازگاری نسجی در سطح سلول‌هـای مشتق از مزوتلیوم همین شرایط منحصر بفرد محوطه صـفاقی می‌باشد.

به منظورانجام هرچه دقیق‌تر پژوهش‌های بعدی بهتر اسـت بـا اسـتفاده ازروش‌هـای سـلولی و مولکـولی بـا تاییـد حـضور مارکرهای اصلی مربوط به سلول‌های بنیادی و مشخص نمودن خلوص سلول‌های جداسازی شـده اقـدام بـه کـشت هدفمنـد سلولهای مایع سروزی نموده و با انجام بررسی‌هـای بـالینی در نمونه های حیوانی نتایج حاصل از پیوند این منـابع سـلولی را ارزیابی نماییم.

REFERENCES

1. Jahangiri L, Moallem A, ForoutanT, Hosseini A. Characterization and transdiffetreation of human mesothelial progenitor/stem cell of peritoneal cavity. J Biol Sci 2007; 7: 1179-86.
2. Gotilouib L, Gotilouib LC, Khrizman V. The use of peritoneal mesothelium as a potential source of adult stem cells. Int J Artif Organs 2007; 30: 501-12.
3. Minguel JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cell. Exp Biol Med 2001; 226: 507-21.
4. Song L, Tuan R. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cell derived from bone marrow. Faseb 2004; 18: 980-82.
5. Sanchez-Ramos J, Song S,Cardozo- Pleasez F, Stedeford T. Adult bone marrow stromal cells differentiate to neural cells in vitro. Exp neurol 2000; 164: 247-56.
6. Khodadadi L, Baharvand H. Immunogenicity of stem cells. Yakhteh Medical Journal 2007; 32: 276-303.
7. Lee KD, Kuo TK, Whang- Peng J, Chung YF, Lin CT,. Chou SH, et al. In vitro hepatic differentiate of human mesenchymal stem cell. Hepatology 2004; 40: 1275-84.
8. Herriek SE, Mutsars SE. The potential of mesothelial cells in tissue engineering and regenerative medicine application. Int J Artif Organs 2007; 30: 527-40.
9. Turksen K. Embryonic stem cells. Totowa, New Jersey: Human Press; 2002.
10. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. PNAS 2003; 100: 5807-12.
11. Gay I, Chen S, Macdougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. Orthod Craniofac Res 2007; 10: 149-60.
12. Niemeyer P, Kornacker M, Mehlhorn M, Seckinger A. Comparison of immunological properties of bone marrow stomal cells and adipose tissue – derived stem cells before and after osteogenic differentiation in vito. Tissue Exp 2007; 13: 111-21.
13. Hanynewsworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human bone marraow derived mesenhymal stem cell are detected by monoclonal antibody. Bone 1992; 13: 69-80.
14. Chiefetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massagué J,. Endoglin is a component of the transforming growth facto –beta receptor system in human epithelial cell. J Biol Chem 1992; 267: 19027-30.
15. Dinicola M, Carlo-stella C, Magni M. Human bone marrow stromal cells supress T-lymphocte proliferation induced by cellular or non-specific mitogenic stimuli. Blood 2002; 99: 3838-43.

www.SID.ir