

# تأثیر مایع زجاجیه بر تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان به سلول‌های شبه فیبر عدسی در محیط کشت

## چکیده

**مقدمه و هدف:** عملکرد و شفافیت عدسی چشم در سنین پیری کاهش پیدا می‌کند. بنابراین مداخله خارجی برای ترمیم آن ضروری است. در این مطالعه، اثر تمایزی مایع زجاجیه بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های فیبر عدسی بررسی شد.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه تجربی طی سال‌های ۱۳۹۰-۱۳۸۹ در دانشگاه تربیت معلم تهران انجام شد. تعداد ۱۵ سر موش از نژاد NMRI انتخاب و به صورت تصادفی به سه گروه تجربی ۱، ۲ و کنترل تقسیم شدند. ابتدا مغز استخوان از استخوان‌های ران و درشت نی موش‌ها جدا و کشت داده شد. با استفاده از مارکر Oct4 و به روش ایمونوسیتو شیمی، بنیادی بودن این سلول‌ها بررسی شد. سپس، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به مدت ۱۴ و ۲۱ روز با رقت‌های ۱:۱ و ۱:۳ به ترتیب در گروه‌های تجربی ۱ و ۲ با مایع زجاجیه چشم گاو تیمار شدند. در موش‌های گروه کنترل کشت سلول‌ها بدون حضور مایع زجاجیه انجام شد. با میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس، مورفولوژی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های فیبر عدسی بررسی گردید.

**یافته‌ها:** در کشت اولیه، جمعیت سلولی هتروژن بود و در پاساژهای بعدی بیشتر سلول‌ها دوکی شکل بودند. مطالعات ایمونوسیتوشیمی بنیادی بودن سلول‌ها را تأیید کرد. بررسی‌های مورفولوژیکی نشان داد که اکثر سلول‌های گروه‌های تجربی نسبت به سلول‌های گروه کنترل کشیده‌تر و به موازات هم آرایش یافته بودند. در داخل هسته آنها تعداد هستک‌ها زیاد شده و تقریباً ساختاری مشابه سلول‌های فیبر عدسی پیدا کرده بودند. به علاوه، غلظت ۲۵ درصد مایع زجاجیه در قیاس با غلظت ۵۰ درصد اثرات تمایزی بهتری نشان داد.

**نتیجه‌گیری:** این مطالعه نشان داد، سلول‌های بنیادی مزانشیمی در اثر عمل القایی مایع زجاجیه می‌توانند در مسیر تمایز به فیبر عدسی قرار گیرند.

**واژه‌های کلیدی:** سلول‌های بنیادی، تمایز، مغز استخوان، زجاجیه، فیبر، عدسی

هما محسنی کوچصفهانی\*

محمد نبیونی\*\*

حمداله دلاویز\*\*\*

خدیجه بهره‌بر\*\*\*\*

پریسا غیبی\*\*\*\*

نسیم اسلامی\*\*\*\*

\*دکترای زیست‌شناسی تکوینی، دانشیار دانشگاه

تربیت معلم تهران، دانشکده علوم،

گروه زیست‌شناسی

\*\*دکترای زیست‌شناسی تکوینی، استادیار دانشگاه

تربیت معلم تهران، دانشکده علوم،

گروه زیست‌شناسی

\*\*\*دکترای آناتومی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی

یاسوج، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و

مولکولی

\*\*\*\*دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی تکوینی،

دانشگاه تربیت معلم تهران، دانشکده علوم، گروه

زیست‌شناسی

تاریخ وصول: ۱۳۹۰/۱/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۳/۸

مؤلف مسئول: خدیجه بهره‌بر

پست الکترونیک: bahrebar6224@yahoo.com

## مقدمه

سیستم بینایی برای دریافت و ارتباط با دنیای بیرون از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. عدسی یکی از اجزای چشم است که ساختاری شفاف و الاستیک دارد و عمل آن تطابق و متمرکز کردن نور بر روی شبکیه است (۱). تجدید و تکثیر سلول‌های عدسی و شبکیه چشم در پستانداران بسیار محدود است و فقط در برخی از دوزیستان وجود دارد (۲). در طی دو دهه گذشته، تلاش‌های گسترده‌ای انجام شده است تا با شناسایی ژن‌های کلیدی در عدسی، امکان ترمیم و تجدید را در این سلول‌ها امکان پذیر کنند (۳).

مطالعه‌های انجام شده نشان داده‌اند که سلول‌های پستی عدسی توانایی ترمیم و تکثیر را دارند در حالی که بافت پوششی که در سطح شکمی عدسی قرار دارد، فاقد این توانایی است (۴). با افزایش سن، مشکلات و بیماری‌های چشمی، به ویژه پیرچشمی و آب مروارید در جوامع مختلف رو به افزایش است. بنابراین امروزه استفاده از سلول‌های بنیادی به عنوان یک راهکار برای ترمیم و یا جایگزینی سلول‌های عدسی و شبکیه ضروری به نظر می‌رسد. سلول‌های بنیادی، سلول‌های تمایز نیافته‌ای هستند که توانایی تبدیل و تمایز به انواع مختلف سلول‌ها را دارند (۵). در این میان، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل دارا بودن خاصیت خودتجدیدی و توان تمایز به سایر سلول‌های دیگر به عنوان یک منبع مناسب و یک استراتژی برای جایگزینی ضایعات سلولی و ژن درمانی محسوب می‌شوند (۶). مغز استخوان منبع

اصلی دو نوع از سلول‌های بنیادی به نام سلول‌های بنیادی خون‌ساز و سلول‌های بنیادی مزانشیمی است. به علاوه، سلول‌های پیش‌ساز بالغ چند توان را در کشت سلول‌های بنیادی مغز استخوان نیز نشان داده‌اند (۷).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی را از منابع دیگر مثل بافت چربی، پولپ دندان، غضروف مفصلی، بند ناف، خون محیطی، بافت پریوست و ماهیچه اسکلتی جدا کرده‌اند (۸). مهم‌ترین منبع سلول‌های بنیادی مزانشیمی در سال‌های اخیر مغز استخوان بوده است. بررسی‌های انجام شده نشان دادند که فاکتورهای رشد، اثر مهمی در روند تمایزی سلول‌های بنیادی به سایر سلول‌های دیگر، مانند؛ عصبی، غضروفی و ماهیچه‌ای دارند (۹ و ۱۰). تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های عدسی یا شبکیه کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد مایع زجاجیه حاوی فاکتورهای رشد فراوانی است که در نگهداری عدسی و شبکیه چشم نقش ویژه دارد (۱۱).

در زجاجیه کندروایتین سولفات، هیپاران سولفات و اسیدهای لورونیک وجود دارند. عدسی علی‌رغم این که یک ماده شفاف و بی‌رنگ است، ولی از سلول‌های زنده‌ای تشکیل شده است (۱۲). مهم‌ترین فاکتورهای موجود در مایع زجاجیه فاکتورهای رشد فیبروبلاستی<sup>(۱)</sup> یک و دو هستند (۱۳). مطالعه‌های

1-Fibroblast Growth Factor (FGF)

تقسیم شدند. حیوانات با روش جا به جای مهره‌های گردنی<sup>(۱)</sup> کشته شدند. در شرایط کاملاً استریل استخوان‌های ران و درشت نی جدا گردید و عضلات و بافت نرم اطراف استخوان‌ها پاک شد و داخل محیط DMEM<sup>(۲)</sup> قرار داده شد. لوله محتوی استخوان‌های ران و درشت نی بر روی یخ قرار داده شد و به زیر هود منتقل گردید. دو سر استخوان با یک قیچی کاملاً استریل بریده و مغز استخوان از داخل کانال استخوان با عمل آسپیراسیون خارج گردید. برای این منظور، سرسوزن شماره ۲۲ متصل به سرنگ حاوی محیط DMEM از سر استخوان وارد کانال استخوانی شد و مغز استخوان از کانال استخوانی خارج گردید. مغز استخوان در فالكون ۱۵ میلی لیتری ریخته شد و به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰ سانتی‌رفیوژ شد تا پلت سلولی تشکیل شود. سپس محیط رویی تخلیه شد و سلول‌ها در ۲ میلی لیتر محیط تازه معلق شدند. محیط مورد استفاده DMEM حاوی ۱۵ درصد FBS<sup>(۳)</sup> و ۱۰۰ واحد بین المللی پنی‌سیلین و ۱۰۰ واحد بین المللی استرپتومایسین بود. سلول‌های حاصل در فلاسک ۲۵ سانتی‌متری کشت داده شدند. سپس فلاسک به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن منتقل گردید. بعد از ۲ روز محیط رویی خارج گردید و محیط DMEM تازه اضافه گردید. محیط سلول‌ها هر ۳ روز یکبار به مدت دو هفته تعویض شد.

1-Cervical Dislocation  
2-Dubleco,s Mmodified Eagles Medium (DMEM)  
3-Fetal Bovine Serum(FBS)

تجربی نشان داده است که این فاکتور ها در محیط کشت باعث القاء و تمایز عدسی و بیان ژن‌های کریستالین، طویل شدن و تخصص یابی ساختاری در سلول‌های فیبری شوند(۱۴). شواهد نشان می‌دهد که سلول‌های بافت پوششی عدسی تحت القاء فاکتور رشد فیبروبلاستی در محیط کشت تمایز پیدا کرده و ساختار مولکولی و مورفولوژی فیبرهای عدسی را کسب کرده‌اند(۱۵). از طرفی استفاده از دوزهای زیاد فاکتور رشد فیبروپلاستی همراه با تکثیر سلول‌های پوششی عدسی بوده که منجر به آب مروارید زودرس شده است(۱۶). مایع زجاجیه چشم حاوی فاکتورهای رشد فوق است که برای نگهداری لنز و دیگر اجزای چشم مؤثر است(۱۷).

هدف این مطالعه بررسی اثر القایی مایع زجاجیه چشم گاو بر سلول‌های مزانشیمی موش و تمایز ساختاری آن به فیبرهای عدسی در محیط کشت بود.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی طی سال‌های ۱۳۸۹-۱۳۹۰ در دانشگاه تربیت معلم تهران انجام شد. پروتکل این تحقیق بر اساس قوانین بین‌المللی در مورد حیوانات آزمایشگاهی انجام گردید و در کمیته اخلاق دانشگاه تربیت معلم به تصویب رسید.

در این مطالعه تعداد ۱۵ سر موش از نژاد NMRI با سن تقریبی ۴-۶ هفته انتخاب و به صورت تصادفی به سه گروه مساوی تجربی ۱ و ۲ و کنترل

در بافر ۲/۰ درصد، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق اضافه شد. در نهایت به سلول‌ها رنگ هوخست<sup>(۳)</sup> به میزان ۱۰۶ میلی‌لیتر بر میکروگرم اضافه شد تا هسته‌ها رنگ بگیرند. از میکروسکوپ معکوس فلورسانس جهت ارزیابی سلول‌ها استفاده شد.

چشم‌های گاو در ظرف حاوی یخ از کشتارگاه به آزمایشگاه منتقل شدند و مایع زجاجیه که حالت ژله ای دارد با سر سرنگ از چشم خارج شد و به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۴ هزار سانتریفوژ گردید تا یکتواخت شود و در دمای ۴۰- درجه سانتی‌گراد فریزر ذخیره شد.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل از پاساژ سوم در دو گروه تجربی ۲و۱ با حجم‌های ۱:۱ و ۱:۳ مایع زجاجیه و DMEM همراه با مکمل‌ها به مدت ۱۴ و ۲۱ روز کشت داده شدند. محیط کشت هر دو روز یکبار تعویض شد. در گروه کنترل، کشت سلول‌های مزانشیمی بدون حضور زجاجیه و در شرایط یکسان با دو گروه تجربی انجام شد.

#### یافته‌ها

در کشت اولیه، سلول‌های گرفته شده از مغز استخوان موش‌ها به شکل گروه‌های سلولی ناهمگن و هتروژن دیده شدند. در این مرحله، سلول‌ها با

سلول‌های مزانشیمی بر اساس خاصیت چسبندگی خود به کف فلاسک می‌چسبند، اما سلول‌های خون‌ساز با تعویض محیط کشت حذف می‌شدند. بعد از یک هفته پاساژ اول انجام شد، به این ترتیب که سلول‌ها با استفاده از ۲ میلی‌لیتر Trypsin-EDTA ۲۵ درصد ساخت شرکت گیکوی آلمان از کف فلاسک جدا و پس از سانتریفیوژ با لام نئوبار شمارش شدند و درصد سلول‌های زنده به وسیله رنگ‌آمیزی تریپان بلو تعیین شد. ضمن انجام پاساژهای دوم و سوم سلول‌های پاساژ سوم در مرحله بعدی تحقیق استفاده شد. بنیادی بودن این سلول‌ها با استفاده از مارکر (ساخت شرکت آبکام انگلستان) و به روش ایمونوسیتو شیمی مورد بررسی قرار گرفت.

به منظور انجام ارزیابی ایمونوسیتوشیمی، سلول‌های مزانشیمی به مدت ۱۵ دقیقه با پارافرمالدهید ۴ درصد در دمای اتاق تثبیت شدند. سپس با بافر PBS<sup>(۱)</sup> شستشو داده شده و از بافر بلاک کننده حاوی TritonX-۱۰۰، جهت نفوذپذیری سلول‌ها برای ورود آنتی‌بادی استفاده شد. سپس سرم بز اضافه شد و پس از خارج کردن این سرم، آنتی‌بادی اولیه anti-oct4 رقیق شده در بافر ۲/۰ درصد اضافه شده و سلول‌ها در این محلول به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. نمونه‌ها ۲ بار با PBS-Tween ۰/۱ درصد شستشو داده شدند. آنتی‌بادی ثانویه از کلاس IgG نشاندار شده با فلورسنس ایزوتیوسیانات<sup>(۲)</sup> رقیق شده

1-Phosphate Buffer Saline(PBS)  
2-Anti-IgG conjugated to fluorescein isothiocyanate (Anti-IgG-FITC)  
3-Hoechst(Sigma, USA)

نتایج نشان داد که غلظت‌های کمتر مایع زجاجیه (۲۵ درصد) در مقایسه با غلظت ۵۰ درصد اثرات القایی بیشتری بر روی تمایز سلول‌های مزانشیمی برای تمایز به ساختار فیبرهای عدسی دارد (تصویر ۴).

### بحث و نتیجه‌گیری

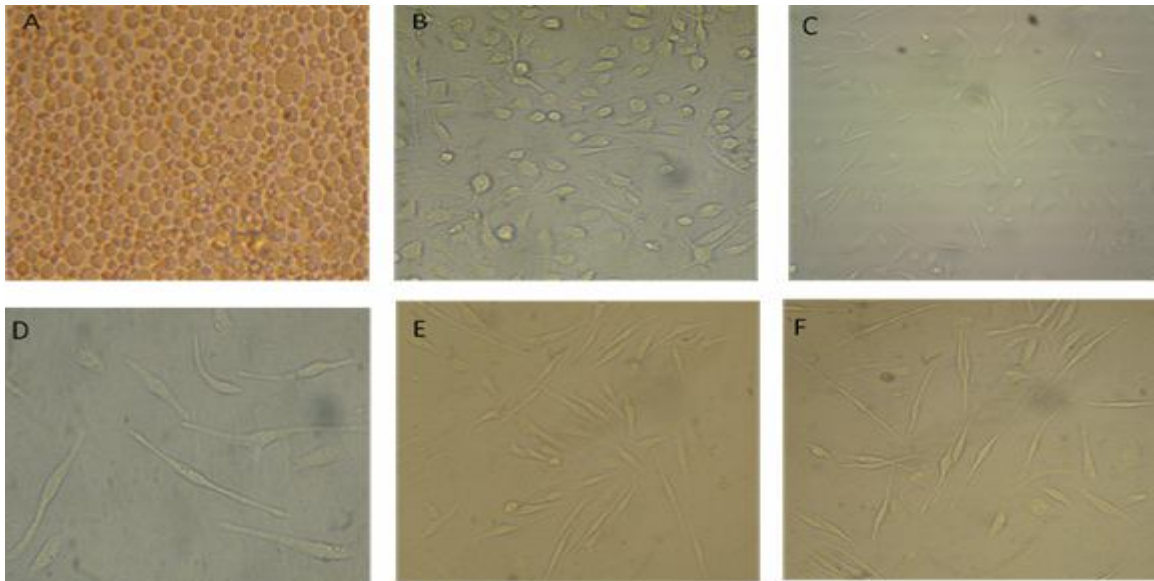
با افزایش سن حالت ارتجاعی عدسی چشم کمتر می‌شود و میزان تطابق آن کاهش پیدا می‌کند و باعث کاهش توانایی افراد در دید نزدیک می‌شود (۴). بنابراین جایگزینی و یا ترمیم عملکرد عدسی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. لذا هدف این مطالعه بررسی اثر القایی مایع زجاجیه چشم گاو، بر سلول‌های مزانشیمی موش و تمایز ساختاری آن به فیبرهای عدسی در محیط کشت بود.

در این مطالعه، یافته‌های ایمونوسیتوشیمی سلول‌های جدا شده از مغز استخوان را به عنوان سلول‌های بنیادی تأیید کرد. نتایج نشان داد، فاکتورهای رشد موجود در مایع زجاجیه اثر القایی بر سلول‌های بنیادی مغز استخوان دارد. شکل این سلول‌ها دوکی و طویل بود و تقریباً مورفولوژی فیبرهای عدسی را کسب کرده بودند. فاکتورهای رشد موجود در مایع زجاجیه و زلالیه اثر القایی بر تکثیر و تمایز سلول‌های پوششی عدسی چشم دارند (۱۸).

مورفولوژی متفاوت نظیر؛ پهن، دوکی و چند وجهی مشاهده شدند. در پاساژهای بعدی تعداد سلول‌های دوکی شکل بیشتر شد، به طوری که در پاساژ سوم اکثریت سلول‌ها دوکی شکل بودند. در ادامه پاساژهای بعدی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به صورت خالص در آمدند و سلول‌های مزانشیمی از لحاظ مورفولوژیکی بیشتر شبیه به سلول‌های فیبروبلاست (دوکی شکل) شدند (تصویر ۱).

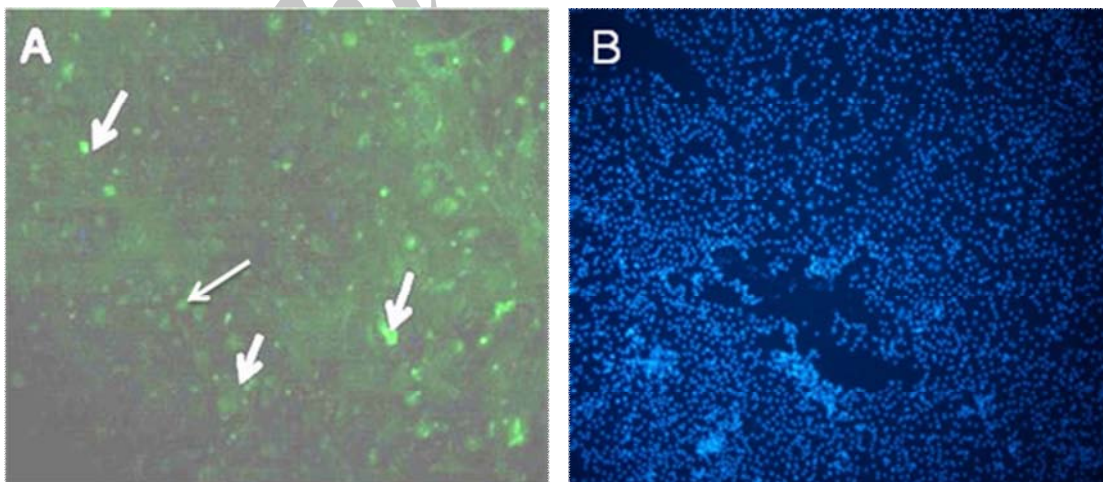
بنیادی بودن سلول‌های کشت شده با استفاده از آنتی بادی Oct4 و به روش ایمونوسیتوشیمی سنجش شد. سلول‌های مزانشیمی کشت شده از مجاورت با آنتی بادی Oct4 ایمونوپوزیتو بودند که بیانگر بنیادی و چند توان بودن این سلول‌ها است (تصویر ۲).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی در گروه‌های تجربی که با مایع زجاجیه تیمار شده بودند، از نظر شکل ظاهری نسبت به سلول‌های گروه کنترل (بدون مایع زجاجیه) کشیده‌تر و به صورت موضعی به موازات هم آرایش یافته بودند. به علاوه، تعداد هستک‌ها در داخل هسته زیاد شده بود که نشان دهنده فعالیت پروتئین‌سازی در این سلول‌ها بود. در روز چهاردهم، مورفولوژی سلول‌های گروه تجربی دوکی‌تر و ساختاری مشابه رشته‌های فیبری کسب کرده بودند که با مورفولوژی سلول‌های پوششی فیبر عدسی مشابه بودند (تصویر ۳).

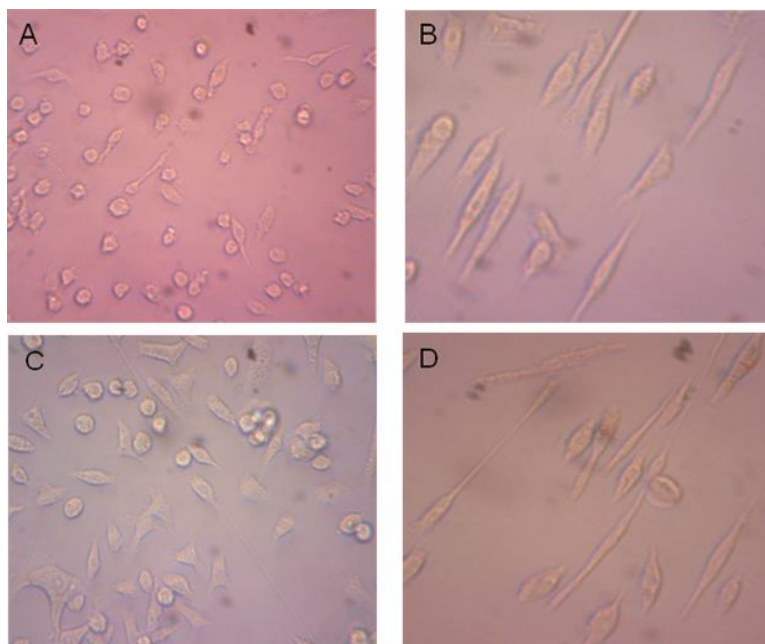


تصویر ۱: مقایسه مرفولوژی سلول‌های بنیادی مغز استخوان کشت داده شده طی زمان‌های مختلف (میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس، بزرگ‌نمایی ۴۰)

A: سلول‌های مزانشیم و غیر مزانشیمی ناهمگن، B: سلول‌های دوکی شکل منفرد در روز ۴، در روز اول کشت C: تعدا بیشتر سلول‌های دوکی شکل در روز ۷، D: ۷۰ درصد سلول‌های دوکی شکل در روز ۱۴، E: کلونی سلول‌های شبیه فیبروبلاستی در روز ۲۱، F: کلونی سلول‌های خالص مزانشیمی در روز ۲۸.

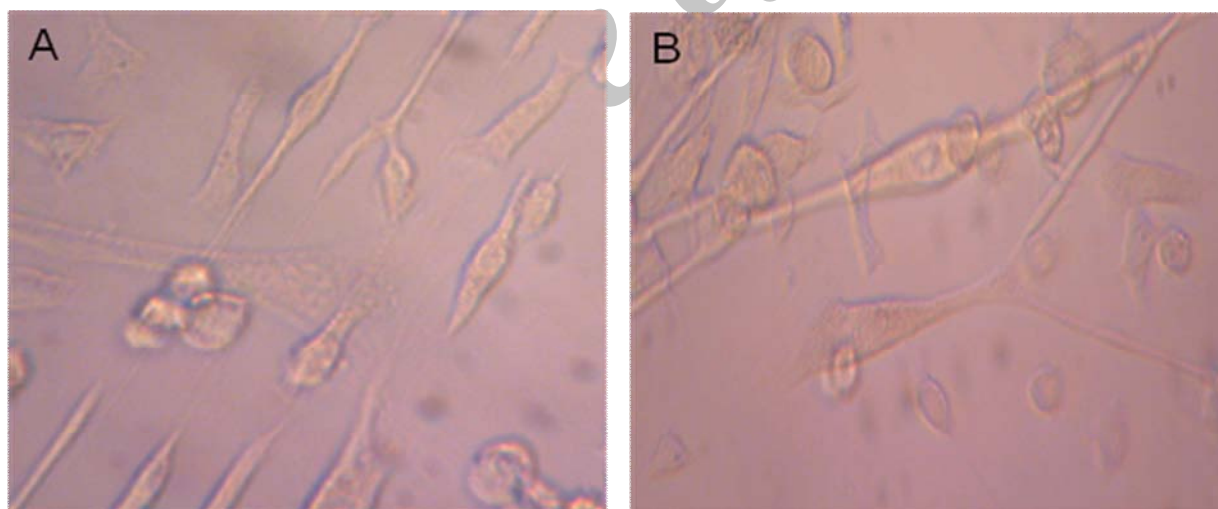


تصویر ۲: A- سنجش بنیادی بودن سلول‌های مزانشیمی با استفاده از آنتی‌بادی Oct4 و روش ایمونوسیتوشیمی، B- رنگ آمیزی هوخست برای تشخیص هسته سلول‌های مزانشیمی (میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس، با بزرگ‌نمایی ۲۰).



تصویر ۳: مقایسه مرفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در گروه‌های کنترل و تجربی طی زمان‌های مختلف (میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس، بزرگ‌نمایی ۴۰)

A: گروه کنترل در روز ۱۴، B: گروه تجربی در روز ۱۴، C: گروه کنترل در روز ۲۱، D: گروه تجربی در روز ۲۱



تصویر ۴: مقایسه مرفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در معرض القاء با غلظت‌های متفاوت مایع زجاجیه (میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس، بزرگ‌نمایی ۴۰)

A: در معرض غلظت ۵۰ درصد، B: در معرض غلظت ۲۵ درصد

برای تکامل طبیعی لنز لازم است (۱۹)، به گونه‌ای که حذف سه گانه ژن‌های فاکتور رشد فیروبلاستی ۱، ۲ و ۳ در طی روند شکل‌گیری پلاکود لنزی منجر به عدم

فاکتور رشد فیروبلاست یکی از فاکتورهای مهمی است که در مایع زجاجیه وجود دارد. مطالعه‌های انجام شده نشان می‌دهد که این فاکتور

تشکیل حباب بینایی می‌شود (۱۹)، در حالی که بیان بیش از اندازه خانواده فاکتور رشد فیبروبلاستی منجر به شکل‌گیری زودرس عدسی می‌شود (۱۶). بنابراین وجود فاکتورهای فاکتور رشد فیبروبلاستی و سایر مولکول‌های رشد در مایع زجاجیه برای تکامل و رشد عدسی ضروری است. این بررسی نشان داد که با القاء و بیان ژن‌های خاص روند تمایز در سلول‌های بنیادی تغییر می‌کند و آنها به سلول‌های مورد نظر تغییر ساختار و عملکرد می‌دهند.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی در انسان به راحتی قابل دسترس می‌باشند. این سلول‌ها قادرند که در شرایط آزمایشگاهی به انواع دودمان‌های مختلف مزانشیمی مانند؛ سلول‌های چربی، غضروفی، ماهیچه‌ای و غیرمزانشیمی مانند سلول‌های نورونی تمایز یابند (۲۰). به همین دلیل سلول‌های بنیادی مزانشیمی به عنوان یک منبع ایده‌آل برای سلول درمانی و ژن درمانی محسوب می‌گردند. یک بررسی انجام شده نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف می‌توانند تحت القای مایع زجاجیه برخی از پروتئین مربوط به ساختار لنز را بیان کنند (۲۱). نتیجه مطالعه اخیر همانند مطالعه ملکی و همکاران (۲۰۱۰) نشان داد که، تحت القاء فاکتورهای رشد موجود در مایع زجاجیه چشم، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بند ناف می‌توانند به ساختاری مشابه به فیبر عدسی تمایز یابند (۲۱).

در این تحقیق سلول‌های مزانشیمی از مغز استخوان موش، ۲۱ روز پس از تیمار با مایع زجاجیه

چشم گاو ساختاری دوکی شکل پیدا کردند و در مقایسه با گروه کنترل سلول‌ها کشیده‌تر بودند. لازم به ذکر است که تعداد سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مغز موش در مقایسه با دیگر پستانداران کمتر است و همراه با رشد دیگر سلول‌ها است که جداسازی و تخلیص سلول‌های مزانشیمی موش در روند کار اهمیت فراوانی دارد (۲۲). در این مطالعه اثر مایع زجاجیه در تغییر سلول‌های بنیادی به سلول‌های دوکی بهتر از تحقیقاتی بوده است که به تنهایی از فاکتور رشد فیبروبلاستی در محیط کشت استفاده شد (۱۸). این تفاوت به دلیل است که مایع زجاجیه نه تنها دارای فاکتور رشد فیبروبلاستی بلکه حاوی فاکتورهای رشد دیگری است که برای تمایز و تکامل طبیعی عدسی مهم است (۱۷). این یافته می‌تواند مکمل تحقیقاتی باشد که نشان می‌دهند هر چند که مایع زجاجیه یک ترکیب ژله‌ای فاقد سلول است، ولی حاوی فاکتورهای رشد فراوانی مانند، فاکتور رشد شبه انسولینی، فاکتور رشد مشتق از پلاکت و فاکتور رشد اپیدرمی است (۱۸ و ۱۳).

در مطالعه وانگ و همکاران<sup>(۱)</sup> (۲۰۱۰) بر روی جوجه نشان داده شد که فاکتور رشد اپیدرمی نه تنها در تکامل لنز بلکه در بیان بسیاری از ژن‌های لنز در زمان بعد از تولد مهم است و فاکتور رشد فیبروبلاستی به تنهایی مسئول روند تمایزی فیبرهای عدسی نمی‌باشد (۱۸). همچنین فاکتور رشد شبه انسولینی منجر به تمایز پروتئین‌های آلفا و بتا کریستالین در سلول‌های اپی تلیال موش صحرایی



مناسب آنها زمینه لازم برای استفاده بالینی فراهم شود.

#### تقدیر و تشکر

از همکاران مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه تربیت معلم تهران و دانشگاه علوم پزشکی یاسوج جهت فراهم آوردن امکانات این طرح تقدیر و تشکر می‌شود.

می‌شود (۲۳). نتایج مطالعه حاضر در راستای بررسی‌های دیگر نشان می‌دهد که فاکتورهای رشد مایع زجاجیه بیشتر بر پروتئین‌های ساختاری سلول‌های مزانشیمی موش مؤثر بوده است. ساختار اصلی سلول‌های عدسی چشم، کریستالین‌ها هستند که به طور یکنواخت در عدسی توزیع می‌شوند و باعث ایجاد خاصیت شفاف و انکساری عدسی می‌گردند (۲۴). در حالی که در سنین پیری انعطاف‌پذیری عدسی کاهش می‌یابد و تمرکز تصویر به خوبی اتفاق نمی‌افتد. بررسی‌های انجام شده در این زمینه نشان می‌دهند که بافت پوششی جدا شده از عدسی چشم در محیط کشت زجاجیه تکثیر پیدا کرده و قادر به متمرکز کردن نور می‌شود (۲۵). در مطالعه حاضر نشان داده شد که غلظت‌های کمتری از مایع زجاجیه (۲۵ درصد) اثر القایی بیشتری بر سلول‌های مزانشیمی نسبت به غلظت‌های بیشتر آن (۵۰ درصد) دارد.

در مجموع یافته‌های این مطالعه نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان موش می‌توانند تحت القای مایع زجاجیه به سلول‌های شبه فیبر عدسی تمایز یابند. بنابر این برای رسیدن به نتایج بهتر پیشنهاد می‌شود، تحقیقات بیشتری بر روی فاکتورهای رشد مختلف مایع زجاجیه و بر روی تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های فیبر عدسی چشم انجام شود، تا با مشخص شدن فاکتورهای تأثیرگذار و دوز

# The effects of Vitreous Humor on Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow to Lens Fiber Like Cells

Mohseni Kouchesfahani H<sup>\*</sup>,  
Nabiuni M<sup>\*\*</sup>,  
Delaviz H<sup>\*\*\*</sup>,  
Bahrebar KH<sup>\*\*\*\*</sup>,  
Gheibi P<sup>\*\*\*\*</sup>,  
Eslami N<sup>\*\*\*\*</sup>.

<sup>\*</sup> Associate Professor of Developmental Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Tarbiat Moallem University, Tehran, Iran

<sup>\*\*</sup> Assistant Professor of Developmental Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Tarbiat Moallem University, Tehran, Iran

<sup>\*\*\*</sup> Assistant Professor of Anatomy, Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

<sup>\*\*\*\*</sup> MSc in Developmental Biology, Department of Biology, Tarbiat Moallem University, Tehran, Iran

Received: 16/04/2011

Accepted: 29/05/2011

**Corresponding Author: Bahrebar KH**  
**Email: bahrebar6224@yahoo.com**

## ABSTRACT:

**Introduction & Objective:** The function and transparency of the lens actually diminishes with aging; as a result, external intervention is necessary to amend it. The aim of the present study was to investigate the effects of vitreous humor on the mesenchymal stem cells (MSCs) to lens fiber like cells.

**Materials & Methods:** The present experimental study was conducted at Tarbiat Moallem University in 2010. Bone marrow was collected from tibias in NMRI mice and then cultured. Immunocytochemistry was done to confirm the mesenchymal stem cells using Oct4 antibody. Subsequently, MSCs were treated with bovine vitreous body for 7 and 21 days. The morphology of the MSCs to the lens fibers were studied using Phase Contrast Microscope.

**Results:** During the primary culture, the cell population was heterogeneous and in the subsequent passages, the number of the spindle-shaped cells increased. Immunocytochemistry study confirmed the MSCs. Morphological studies showed that most cells in the experimental group were locally longer and more aligned in parallel compared to control group cells. Moreover, lens fiber like with large nuclei and multiple nucleoli was observed. Furthermore, the concentration of 25% of vitreous body had more induction effect on MSCs in comparison with the 50% concentration.

**Conclusion:** The MSCs derived from mouse bone marrow could differentiate into lens fiber like cells by treating them with vitreous humor.

**Key words:** Bone Marrow, Lens, Fiber, Stem Cells, Vitreous

## REFERENCES:

- 1.Tholozan F, Quinlan RA. Lens cells: More than meets the eye. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007; 39:1754–9.
- 2.Tsonis PA, Rio-Tsonis KD. Lens and retina regeneration: transdifferentiation, stem cells and clinical applications. *Experimental Eye Research* 2004; 78:161–72.
- 3.Bosco L, Venturini G, Willems D. In vitro lens transdifferentiation of *Xenopus laevis* outer cornea induced by fibroblast growth factor (FGF). *Development* 1997; 124: 421–8.
- 4.Imokawa Y, Brockes JP. Thrombin is a critical determinant of vertebrate lens regeneration. *Curr Biol* 2003; 13: 877–81.
- 5.Behfar A, Yamada S, Crespo-Diaz R, Nesbitt JJ, Rowe LA, Perez-Terzic C, Gausin V, et al. Guided Cardiopoiesis Enhances Therapeutic Benefit of Bone Marrow Human Mesenchymal Stem Cells in Chronic Myocardial Infarction. *Am Coll Cardiol* 2010; 56: 721-34.
- 6.Pitchford SC, Hahnel MJ, Jones CP, Rankin SM. Troubleshooting: Quantification of mobilization of progenitor cell subsets from bone marrow in vivo. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 2010; 61:113–21.
- 7.Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284:143-7.
- 8.Baghaban Eslaminejad MR, Taghiya L. Mesenchymal stem cell purification from the articular cartilage cell culture. *Basic Medical Sciences* 2007; 10:146-53.
- 9.Kränkel N, Spinetti G, Amadesi S, Madeddu P. Targeting stem cell niches and trafficking for cardiovascular therapy. *Pharmacology & Therapeutics* 2011; 129: 62–81.
- 10.Park S, Koh SE, Maeng S, Lee WD, Lim J, Lee YJ. Neural progenitors generated from the mesenchymal stem cells of first-trimester human placenta matured in the hypoxic-ischemic rat brain and mediated restoration of locomotor activity. *Placenta* 2011; 32: 269-76.
- 11.Hyuga M, Kodama R, Eguchi G. Basic fibroblast growth factor as one of the essential factors regulating lens transdifferentiation of pigmented epithelial cells. *Int J Dev Biol* 1993; 37: 319–26.
- 12.Mascarelli F, Rauais D, Counis MF, Courtois Y. Characterization of acidic and basic fibroblast growth factors in brain, retina and vitreous chick embryo. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 146: 478–86.
- 13.Majima K. Presence of growth factor in human vitreous. *Ophthalmologica* 1997; 211: 226–8.
- 14.McAvoy JW. Beta- and gamma-crystallin synthesis in rat lens epithelium explanted with neural retina. *Differentiation* 1980; 17: 85–91.
- 15.Zhao H, Rossant J, Ornitz DM, Beebe DC, Robinson ML. Different FGFR genes play an essential but redundant role in postinduction lens development. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 2003; 44: 954-63.
- 16.Richardson NA, Chamberlain CG, McAvoy JW. IGF-1 enhancement of FGF induced lens fiber differentiation in rats of different ages. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34: 3303–12.
- 17.Beebe DC, Latker CH, Jebens HA, Johnson MC, Feagans DE, Feinberg RN. Transport and steady-state concentration of plasma proteins in the vitreous humor of the chicken embryo: implications for the mechanism of eye growth during early development. *Dev Biol* 1986; 114: 361–8.
- 18.Wang Q, John W, McAvoy JW, Lovicu FJ. Growth factor signaling in vitreous humor-induced lens fiber differentiation. *IOVS July* 2010; 51: 3599-611.
- 19.Lyu J, Joo CK. Wnt signaling enhances FGF2-triggered lens fiber cell differentiation. *Development* 2004; 131:1813–24.
- 20.Deng J, Petersen BE, Steindler DA, Jorgensen ML, Laywell ED. Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture and are neurogenic after transplantation. *Stem Cells* 2006; 24(4):1054-64.

21. Maleki M, Parivar K, Nabiyouni M, Yaghmaei P, Naji M. Induction of Alpha-Crystallins Expression in Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells. *Iranian Journal of Ophthalmology* 2010; 22(2): 67-71.
22. Soleimani M, Nadri S, Izadpanah R. Isolation of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow: frequent medium change method. *Tehran University Medical Journal* 2008; 66 (4): 229-36.
23. Beebe DC, Silver MH, Belcher KS, VanWyk JJ, Svoboda ME, Zelenka PS. Lentropin, a protein that controls lens fiber formation, is related functionally and immunologically to the insulin-like growth factors. *Proc Natl Acad Sci* 1987; 84: 2327-30.
24. Horwitz JA. Crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 10449-53.
25. Oconnor MD, McAvoy JW. In vitro generation of function lens-like structures with relevance to age-related nuclear cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 1245-52.

Archive of SID