مقاله تحقیقی

جداسازی و تعیین ماهیت سلول‌های پیش‌ساز مزانشیمی تمایز یافته از سلول‌های بنیادی پرتوان القایی

محسن مسلم .M.Sc*، مجتبی رضازاده ولوجردی .Ph.D*، حسین بهاروند .Ph.D**

* گروه علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

** گروه سلول‌های بنیادی و زیست شناسی تکوینی مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی پژوهشکده رویان ، تهران، ایران

تاریخ وصول: خرداد ماه ۸۹، تاریخ پذیرش: شهریور ماه ۸۹

چکیده

هدف: جداسازی سلول‌های پیش‌ساز مزانشیمی حاصل از سلول‌های بنیادی پرتوان القایی به‌عنوان یک منبع جدید از سلول‌های مزانشیمی که قادرند به انواع رده‌های سلولی از جمله سلول‌های چربی و استخوان تمایز یابند.

مواد و روش‌ها: بعد از ۷ روز کشت سلول‌های بنیادی پرتوان القایی در محیط کشت روی ماتریژل، سلول‌های دوکی شکل که در اطراف کلونی‌هاوجود داشتند، با Cell scraper جداشدند. سلول‌های جدا شده که مورفولوژی شبیه سلول‌های مزانشیمی داشتند بعد از ٤ تا ٦ پاساژ، برای تعیین ماهیت بررسی شدند. تعیین ماهیت سلول‌ها با مطالعه نشانگرهای سطحی مزانشیمی CD۳۱، CD۱۰۵، CD۲۹، CD٤٤، CD۹۰ وCD۷۳ نشانگرهای سطحی هماتوپویتیک CD۳٤ و CD٤٥ با استفاده از روش فلوسیتومتری و نیز تمایز به رده‌های استخوانی و چربی صورت گرفت.

یافته‌ها: نتایج به‌دست آمده از فلوسیتومتری نشان داد که سلول‌های پیش‌ساز مزانشیمی مشتق شده از سلول‌های بنیادی پرتوان القایی ۰/۱٤ ± ۹۸/۷۱٪ نشانگر CD٤٤، ۱/۰۲±۹۸/۵۱٪ نشانگر CD۲۹، ۳/٤۱±۸۷/۷٤٪ نشانگر CD۱۰۵، ۵/۷٦±٤٦/٦۵٪ نشانگر CD۷۳، ۰/۷۸±۹۸/۵۳٪ نشانگر CD۹۰ که نشانگرهای اختصاصی سلول‌های مزانشیمی است را بیان می‌کردند و همچنین نشانگرهای CD۳٤ و CD٤٥ که نشانگرهای اختصاصی سلول‌های هموتوپویتیک است را در سطح خود بیان نکردند. به علاوه با استفاده از محیط‌های تمایزی مخصوص رده استخوانی و چربی، سلول‌ها قادر بودند به‌این دو رده سلولی تمایز یابند.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی پرتوان القایی قادرند به سلول‌های پیش‌سازمزانشیمی تبدیل شوند و سلول‌های حاصل قادرند به عنوان منبع جایگزینی برای سلول‌های مزانشیمی مورد استفاده قرار گیرند.

کلیدواژه‌ها: سلول‌های بنیادی پرتوان القایی، سلول‌های پیش‌ساز مزانشیمی، تمایز

مقدمه

از بین انواع سلول‌های بنیادی که برای سلول درمانی در مدل‌های حیوانی و انسانی مورد استفاده قرار می‌گیرند، سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs Mesenchymal Stem Cells) در دسترس‌ترین سلول‌ها بوده و قابلیت تمایز به انواع رده‌های اکتودرمی،

آدرس مکاتبه: ۱- تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح، صندوق پستی ۱۱۱ - ۱٤۱۱۵ پست الکترونیک : mr_valojerdy@modares.ac.ir و

۲- تهران، پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی،گروه سلول‌های بنیادی و زیست شناسی تکوینی، صندوق پستی ٤٤٤-۱۹۳۹۵، پست الکترونیک: Baharvand@royaninstitute.org

Archive of SID

www.SID.ir

مزودرمی و اندورمی را دارند و به همین خاطر منبعی قابل اعتماد جهت کاربردهای بالینی هستند [۱]. ولی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با وجود داشتن توانایی تمایزی بالا برای تمایز به رده‌های مختلف سلولی از جمله غضروف، چربی و استخوان، بسیار تحت تأثیر سن هستند. بنابراین پیوند اتولوگ آنها در افراد پیر که نیازمندترین افراد برای سلول‌درمانی هستند، بسیار کم اثر خواهد بود. دلیل اصلی این تأثیر پایین را نیز می‌توان به پایین آمدن قابلیت خودنوزایی این سلول‌ها با افزایش سن مرتبط دانست. تحقیقات نشان داده‌اند که افزایش سن نه تنها برخود نوزایی سلول‌های بنیادی مغز استخوان تأثیر منفی می‌گذارد بلکه آثار زیان‌باری بر سایر ارگان‌ها و سلول‌های بدن دارد. با افزایش سن تعداد سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌طور قابل ملاحضه‌ای کاهش می‌یابد و قابلیت مهاجرت آن‌ها نیز تحلیل می‌رود. افزایش سن موجب تغییر میزان بیان پروتیین‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی و کاهش قدرت دفاعی این سلول‌ها در برابر رادیکال‌های آزاد اکسیژن و همچنین کاهش بازسازی اسکلت سلولی آن‌ها می‌شود [۲و۳].

از طرفی برای استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، عمل جراحی و استفاده از روش‌های تهاجمی اجتناب‌ناپذیر است [٤]. با توجه به موارد مذکور، یافتن یک منبع سلولی بدون استفاده از روش‌های تهاجمی و قابلیت استفاده از آن‌ها در بیماری‌های وابسته به سن مثل استئوپروز که در آن نمی‌توان از روش‌های تهاجمی برای گرفتن سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان استفاده کرد، ضروری به نظر می‌رسد [٥]. با توجه به نیاز محققین برای دست‌یابی به یک منبع جدید از سلول‌های بنیادی، دانشمندان ژاپنی در سال ۲۰۰٦ توانستند برای نخستین بار از سلول فیبروبلاست، سلولی با توانایی خود نوزایی و تمایز به سایر رده‌های سلولی تولید کنند. به‌طوری که یاماناکا [Yamanaka] با همکارانش سلول‌های فیبروبلاستی را توسط القای فاکتورهای رونویسی Klf4، Sox2، Oct4 و C-Myc بازبرنامه‌ریزی کرده و درنهایت سلول‌های سوماتیک را در محیط کشت به سلول‌های بنیادی تبدیل نمودند. یاماناکا سلول‌های به‌دست آمده را سلول‌های بنیادی پرتوان القایی یا induced **P**luripotente **S**tem **C**ells (iPS) نامید [٦]. سلول‌های iPS از لحاظ مورفولوژی و عملکرد بسیار شبیه به سلول‌های بنیادی جنینی هستند. این سلول‌ها قادر به ایجاد مشتقات هر سه لایه جنینی (اکتودرم، مزودرم، اندودرم) بوده و دارای قابلیت تکثیری بسیار بالایی هستند. این سلول‌ها قادر به ایجاد تراتوم هستند و می‌توانند در ایجاد کایمرای زنده شرکت کنند [۷]. این سلول‌ها به دلیل اینکه از خود بیمار گرفته می‌شوند از لحاظ عدم رد پیوند و همین‌طور مسایل اخلاقی مطرح در سلول‌ها بنیادی جنینی مورد توجه بسیاری از دانشمندان قرار گرفته‌اند. جالب‌تر اینکه برای به‌دست آوردن این سلول‌ها نیازی به استفاده از روش‌های تهاجمی نیست و می‌توان از منابع در دسترس‌تر همچون فیبروبلاست‌های پوست بیمار برای این منظور استفاده کرد [۸]. از طرفی افزایش سن به‌طور محسوس روی این سلول‌ها تأثیر ندارد [٤]. همچنین با استفاده از روش HLA typing (Human Leukocyte Antigen typing) می‌توان از این سلول‌ها یک بانک سلولی برای کل جمعیت ایجاد نمود [۹]. با تبدیل این سلول‌ها به سلول‌های پیش‌ساز مزانشیمی می‌توان جایگزینی برای سلول‌های مزانشیمی معرفی کرد که مشکلات استفاده از آن‌ها را مرتفع کرده است.

سلول‌های پیش‌ساز مزانشیمی را می‌توان از سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های iPS با روش‌های مختلف ایجاد کرد. الیویر[Olivier] و همکارانش در سال ۲۰۰٦ توانستند سلول‌های بنیادی جنینی موشی را به رده مزانشیمی تبدیل کنند وروش جدیدی برای جدا کردن سلول‌های پیش‌ساز مزانشیمی از سلول‌های بنیادی جنینی ابداع کردند [۱۰]. این گروه از محققین در این روش بدون استفاده از لایه تغذیه کننده، سلول‌هایی با مورفولوژی MSC با توانایی

Archive of SID
www.SID.ir

۲۰-۲۵ تقسیم به‌دست آورند. تریودی [Trivedi] و همکارانش در سال۲۰۰۷، سلول‌های خون ساز +CD۳٤ و سلول‌های مزانشیمی +CDV۳ را از تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انسانی به‌دست آوردند. آن‌ها از هم‌کشتی سلول‌های بنیادی جنینی با سلول‌های OP9 استفاده نمودند [۱۱]. در سال ۲۰۰۹ کارسون [Karlsson] و همکاران موفق شدند چند رده از سلول‌های بنیادی جنینی را با استفاده از روش کشت روی ظروف پوشیده شده با ژلاتین به سلول‌هایی با مورفولوژی MSC متمایز کنند. این سلول‌ها +CD105 و +CD166 دارای قابلیت تمایز به استیوسیت و ادیپوسیت بودند [۱۲]. با توجه به روند مطالعات در زمینه استفاده از سلول‌های مزانشیمی در سلول درمانی طی سال‌های اخیر، نیاز به منبعی غیر از منابع مغز استخوان، بافت چربی و بند ناف و نیز سلول‌های بنیادی جنینی که هر کدام محدودیت مخصوص به خود را دارند، ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین در این تحقیق قابلیت تبدیل سلول‌های iPS انسانی به سلول‌های پیش‌ساز مزانشیمی از طریق روش جداسازی مکانیکی بررسی شده و به دنبال جداسازی سلول‌های به‌دست آمده، این سلول‌ها از نظر مورفولوژی، نشانگرهای سطحی و قابلیت تمایز به سایر رده‌های سلول‌های مزانشیمی ارزیابی شدند.

مواد و روش‌ها

کشت سلول‌های بنیادی پرتوان القایی انسانی

سلول‌های iPS انسانی مورد استفاده در این تحقیق از بانک سلولی پژوهشکده رویان دریافت شد. این سلول‌ها توسط توتونچی و همکاران [۱۳] از سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان و با استفاده از وکتورهای رترو ویروسی Klf4، Sox2، Oct4 و C-Myc تهیه شده و بین پاساژ ۵۰-۳۵ برای انجام این مطالعه تحویل گرفته شدند. سلول‌های دریافت شده به مدت ۷ روز روی ظروف کشت پوشیده شده با ماتریژل (شرکت سیگما) بدون لایه تغذیه کننده و در محیط کشت سلول‌های جنینی انسانی کشت داده شدند. محیط کشت مذکور حاوی Dulbecco′s Modified Eagle Medium/ F12 (DMEM/F12) به عنوان محیط کشت پایه بوده که به این محیط ۱۰درصد Knockout Serum Replacement، ۱۰ میلی‌مولار اسید آمینه غیرضروری، ۱ میلی‌مولار ال-گلوتامین، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۵۰ میلی‌مولار ۲- مرکاپتواتانول و ٤ نانوگرم در میلی‌لیتر basic Fibroblast Growth Factor (Gibco) (bFGF) اضافه شد.

جداسازی سلول‌های پیش‌ساز مزانشیمی حاصل از سلول‌های بنیادی پرتوان القایی انسانی

بعد از ۷ روز کشت سلول‌های iPS انسانی روی ماتریژل، سلول‌های رشد یافته اطراف کلونی‌ها که مورفولوژی شبیه سلول‌های مزانشیمی داشتند با روش مکانیکی و با استفاده از Cell scraper جدا شدند [٤]. سپس سلول‌های جدا شده در محیط کشت سلول‌های مزانشیمی کشت داده شدند تا به تراکم مناسب برسند. محیط کشت سلول‌های مزانشیمی حاوی DMEM/F12 به عنوان محیط کشت پایه بوده که به‌این محیط ۱۰ درصد سرم گاوی، ۱۰ میلی‌مولار اسید آمینه غیر ضروری، ۱ میلی‌مولار ال-گلوتامین، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین خریداری شده از شرکت Gibco اضافه شده بود. سلول‌ها در این محیط کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در غلظت ۵ درصد دی اکسید کربن کشت داده شدند. محیط کشت سلول‌ها روزانه تعویض شد سلول‌های مذکور به وسیله آنزیم تریپسین ۰/۲۵ درصد در EDTA ۰/٤ درصد (شرکت Sigma) پاساژ داده شدند و با انجام ٤ پاساژ سلولی، سلول‌ها تخلیص و تکثیر شدند و برای تعیین ماهیت استفاده شدند.

Archive of SID
www.SID.ir

بررسی بیان آنتی‌ژن‌های سطحی سلول‌های پیش‌ساز مزانشیمی حاصل از سلول‌های iPS توسط فلوسیتومتری

برای بررسی نشانگرهای سطح سلول‌های پیش‌ساز مزانشیمی مشتق شده از سلول‌های iPS، تعداد200000 سلول را در لوله‌های فالکون ریخته و به هر کدام از لوله‌ها ۱۰۰ میکرولیتر سرم رت ۳ درصد اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳ الی ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس سلول‌ها با ۵۰۰ میکرولیتر بافر شستشو حاوی یک میلی‌لیتر سرم گاوی در صد میلی لیتر Phosphate Buffer Solution (PBS) شسته شدند بعد از این مرحله سلول‌ها با دور ٤۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ و در یخچال با آنتی‌بادی‌های CD105، CD-29،CD-44، CD-73،CD-45 (bioscience) متصل شده با فیکواریترین (PE) و آنتی‌بادی‌های CD90,، CD-34 (bioscience) متصل شده با فلورسانس ایزوتیوسیانات (FITC) قرار داده شدند. برای کنترل منفی، سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های FITC-IgG1، PE-IgG1 وIgG2 انکوبه شدند. در مرحله بعد سلول‌ها پس از شستشو به مدت ۱۰ دقیقه با دور ٤۰۰g سانتریفوژ شدند. سپس به سلول‌ها بافر تثبیت کننده پارافرمالدهید ۱ درصد و سرم گاوی ۱درصد در Phosphate Buffer Solution (PBS) اضافه شد و در دستگاه فلوسیتومتری (Becton Dickenson) و با استفاده از نرم‌افزار WinMDI 2.9 بررسی شدند. میانگین و انحراف معیار حاصل از سه تکرار برای هر یک از نشانگرهای سطحی با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱٦ تحلیل شد و معنی‌داری در سطح $P\leq0.05$ در نظر گرفته شد.

تعیین خصوصیت مزانشیمی سلول‌های جداشده از کلونی‌ها با تمایز به رده استخوانی و چربی

به منظور اثبات ماهیت مزانشیمی سلول‌های مورد بررسی در این مطالعه از آزمون تمایز به استخوان و چربی استفاده شد. برای این منظور حدود ۵۰۰۰۰ سلول پیش‌ساز مزانشیمی جدا شده از کلونی‌ها در ظروف کشت شش خانه‌ای در محیط کشت حاوی DMEM با ۱۰ درصد سرم گاوی و آنتی‌بیوتیک کشت داده شد. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم مناسب، محیط کشت سلول‌ها با محیط کشت تمایزی استخوان و چربی جایگزین شد. محیط کشت تمایز به استخوان حاوی DMEM به عنوان محیط کشت پایه بود که در آن به میزان ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسکوربیک اسید دو فسفات،۱۰ نانومولار دگزامتازون و ۱۰ میلی‌مولار بتا-گلیسرول فسفات خریداری شده از شرکت سیگما افزوده شده بود و محیط کشت تمایز به چربی از DMEM به عنوان محیط کشت پایه و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسکوربیک‌اسید دو فسفات، ۱۰۰ نانومولار دگزامتازون، ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ایندومتاسین خریداری شده از شرکت سیگما، تهیه شد. این محیط‌ها هر ۳ الی ٤ روز یک بار تعویض شد.

بعد از گذشت ۲۱ روز برای بررسی محتوای مواد معدنی در محیط کشت، سلول‌های تمایز یافته به استخوان با رنگ آلیزارین رد طبق پروتکل سیگما رنگ‌آمیزی شد. به‌این ترتیب تک لایه سلولی با PBS شسته و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با متانول(Merck; Germany) تثبیت شد. سپس با محلول رنگی آلیزارین رد یک درصد در آب آمونیاکی ۲۵ درصد (شرکت سیگما) به مدت ۲ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. در ادامه سلول‌ها با آب مقطر شسته و پس از خشک شدن با میکروسکوپ نوری اینورت مشاهده شد. به علاوه برای بررسی تمایز سلول‌ها به چربی، سلول‌ها با رنگ اویل رد طبق پروتکل سیگما، رنگ‌آمیزی شد. در این رنگ‌آمیزی سلول‌ها پس از شستشو با PBS به مدت یک ساعت در دمای اتاق با فرمالین ٤ درصد تثبیت شد. سپس با الکل ۷۰ درصد شسته و سپس به مدت ۱۰ تا ۱۵دقیقه با محلول ۰/۵ درصد اویل رد (شرکت سیگما) به مدت ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. در انتها محلول رنگی خارج و سه بار با الکل ۷۰ درصد شستشو و با میکروسکوپ نوری معکوس مشاهده شد [۱٤].

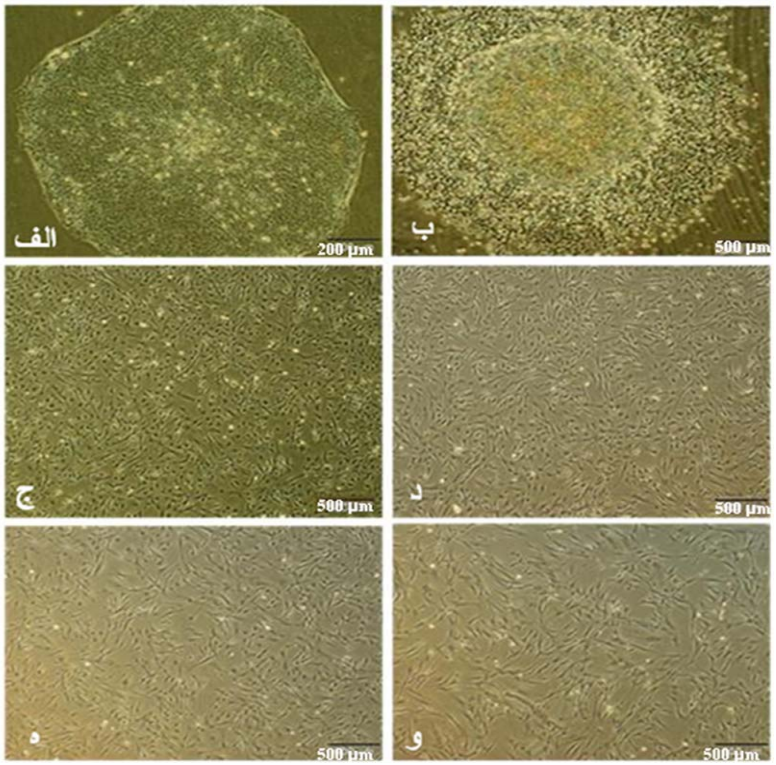
Archive of SID
www.SID.ir

یافته‌ها

سلول‌هایiPS انسانی پس از کشت روی ماتریژل با تبدیل خود به خودی در مرکز و لبه‌ها، شکل کلونی‌های واضحی را به‌دست آوردند (شکل A۱). بعد از ۷ روز کشت روی ماتریژل، کلونی‌های ایجاد شده برای جداسازی سلول‌های پیش‌سازمزانشیمی استفاده شدند (شکل B–۱). سلول‌های دوکی شکل لبه کلونی‌ها پس از جداسازی توسط Cell scraper (جدا کننده مکانیکی سلول)، به ظروف جداگانه انتقال داده شدند. این سلول‌ها از لحاظ مورفولوژی سلول‌های کوچکی بوده و نسبت هسته به سیتوپلاسم بالایی داشتند ولی طی گذشت پاساژ۱، ۳ و ۵ این سلول‌ها به شکل دوکی شکل در آمده (شکل C, D, E–۱) و بسیار شبیه به سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان انسانی (شکل F –۱) شدند.

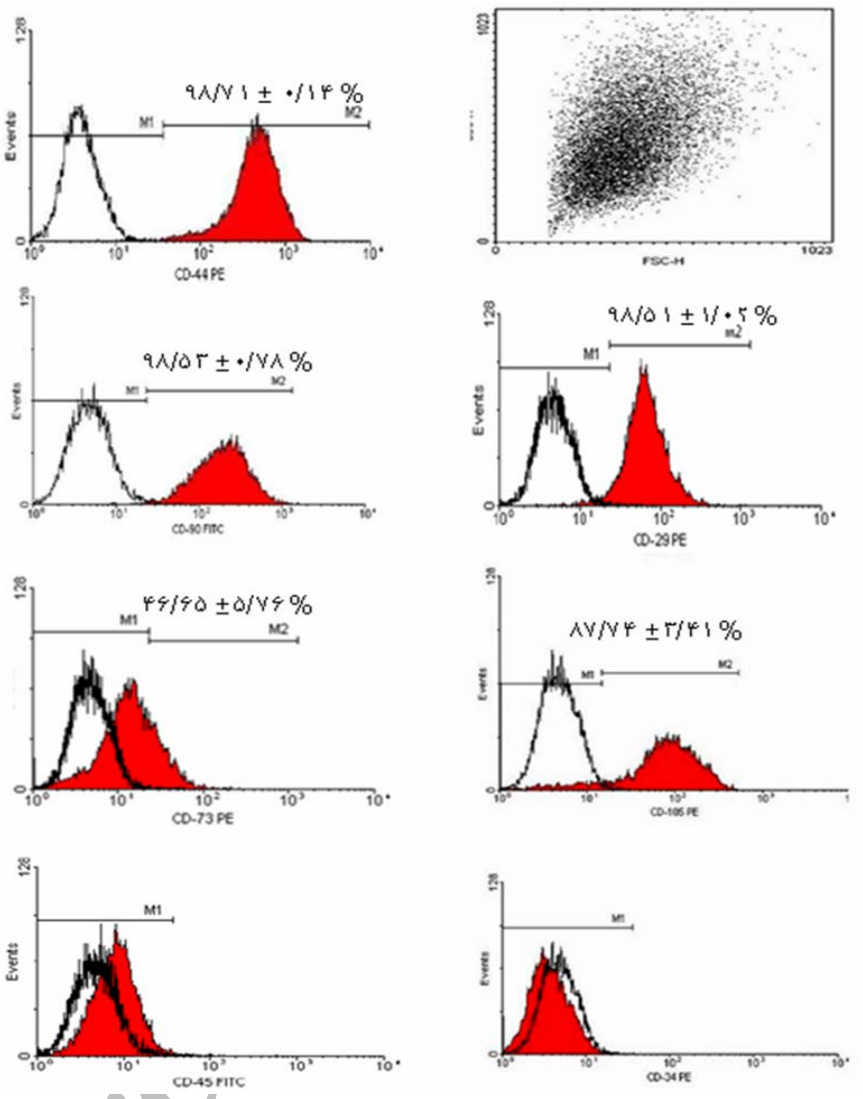
در بررسی نشانگرهای سطحی خاص سلول‌های مزانشیمی مشخص شد که سلول‌های پیش‌ساز مزانشیمی حاصل از سلول‌های iPS بسیار شبیه به سلول‌های بنیادی مزانشیمی بودند. بنابراین طبق نتایج ارایه شده در شکل ۲ نشانگرهای سطح سلول‌های پیش‌سازمزانشیمی به‌دست آمد.

تمایز سلول‌های پیش‌ساز حاصل از سلول‌های iPS انسانی به رده چربی به وسیله محیط ادیپوژنیک (Adipogenic medium) به مدت ۲۱ روز نشان داد که این سلول‌ها همانند سلول‌های مزانشیمی قابلیت ذخیره واکویل‌های چربی را در خود دارند و با رنگ آمیزی Oil Red-O رنگ قرمز را به خود گرفتند (شکلA,B–۳). از طرفی این سلول‌ها پس از ۲۱ روز تیمار با محیط استیوژنیک (Osteogenic medium) همانند سلول‌های مزانشیمی قابلیت رسوب ذرات کلسیم را داشته و با رنگ آمیزی Alizarin red-S ذرات کلسیم را به رنگ قرمز نشان دادند (شکلC,D–۳).



شکل ۱. نمای فازکانتراست سلول‌های پیش‌سازمزانشیمی مشتق شده از سلول‌های بنیادی پرتوان القایی .**الف**: کلونی سلول‌های بنیادی پرتوان القایی کشت داده شده بر روی ماتریژل پس از ٤ روز کشت، **ب**: کلونی سلول‌های بنیادی پرتوان القایی به همراه سلول‌های پیش‌سازمزانشیمی در اطراف آن پس از ۷ روز کشت، ج: سلول‌های پیش‌سازمزانشیمی جدا شده از کلونی‌ها در پاساژ اول، **د**: سلول‌های پیش‌سازمزانشیمی جدا شده از کلونی‌ها در پاساژ سوم، **ه**: سلول‌های پیش‌سازمزانشیمی جدا شده از کلونی‌ها در پاساژ پنجم، **و**: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسانی در پاساژ سوم

www.SID.ir



شکل ۲. نمودارهای فلوسیتومتری سلول‌های پیش ساز مزانشیمی مشتق شده از سلول‌های القایی پرتوان که نشانگرهای سطح سلولی سلول‌های مزانشیمی را بیان نموده اما نشانگرهای هماتوپویتیک را بیان نمی‌کنند (سلول‌های پاساژ ٤ تا ٦).

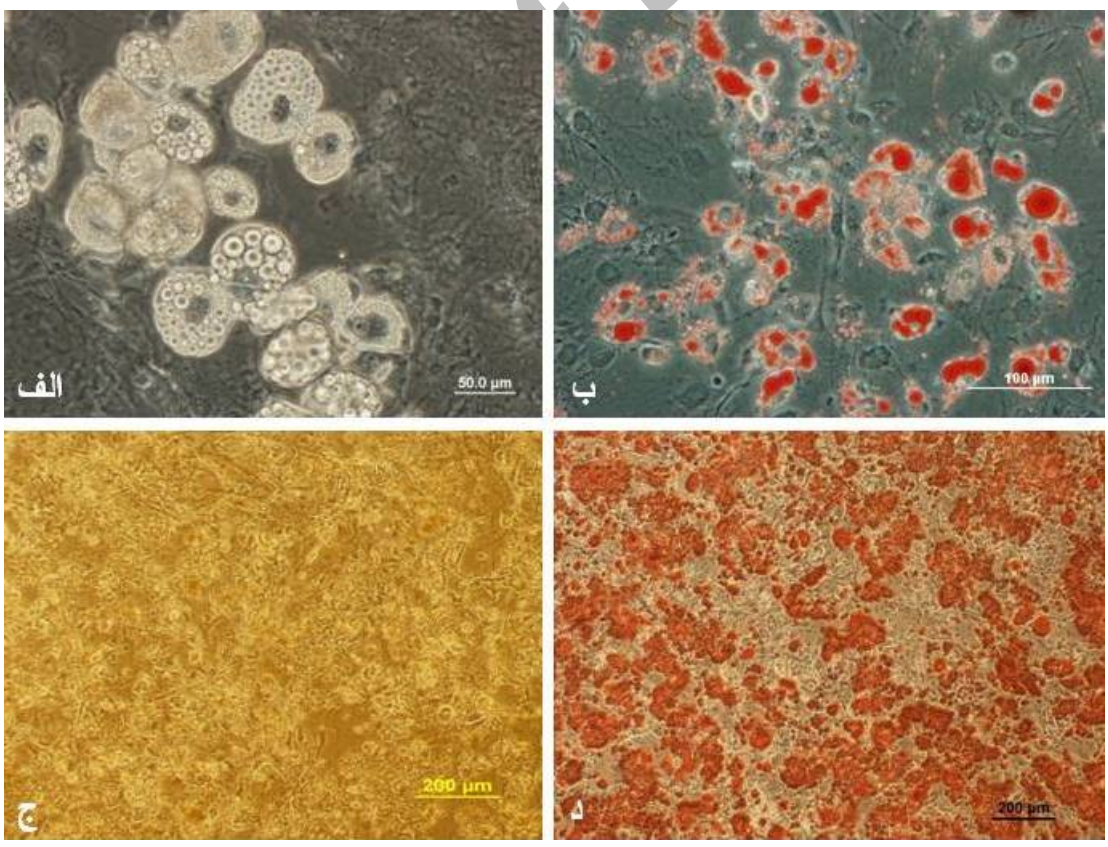
بحث

با توجه به مطالب ذکر شده، نیاز به منبع سلولی با توانایی خود نوزایی بالا که کمتر تحت تأثیر افزایش سن بوده و بیمار را با کمترین اظطراب در دستیابی به سلول مواجه سازد در مطالعات ضروری به نظر می‌رسید. در پیگیری روند مطالعات این امر بدیهی به نظر می‌رسد که وجود سلولی با داشتن نشانگرهای سطحی، مورفولوژی و قابلیت خود نوزایی بالا شبیه به سلول‌های مزانشیمی برای سلول درمانی ضروری است؛ بنابراین در مطالعه حاضر، استفاده از سلول‌های iPS به عنوان این منبع جایگزین معرفی شده است. این سلول‌ها چنانچه طی روند مطالعه نشان داده شده دارای نشانگرهای اختصاصی سطح سلول‌های مزانشیمی بوده و قابلیت تمایز به رده چربی و استخوانی را شبیه سلول‌های مزانشیمی از خود

www.SID.ir

نشان می‌دهند. در نتایج به‌دست آمده از این مطالعه مشخص شد که سلول‌های پیش‌ساز مزانشیمی مشتق شده از سلول‌های iPS حدود ۹۸/۷۱±۰/۱٤٪ نشانگر CD44 ۹۸/۵۱±۱/۰۲٪، نشانگر CD29 به میزان ۸۷/۷٤±۳/٤۱٪، نشانگرCD105، ٤٦/٦٥±٥/۷٦٪ نشانگر CD73، ۹۸/۵۳±۰/۷۸٪ نشانگر CD90 که نشانگرهای اختصاصی سلول‌های مزانشیمی هستند، بیان داشتند و نشانگرهای CD34 و CD45 که نشانگرهای اختصاصی سلول‌های هموتوپویتیک هستند، را در سطح خود بیان نکردند.

به این ترتیب همانند گزارش‌هایی که در زمینه تعیین ماهیت سلول‌های مزانشیمی از سایر منابع سلولی نظیر سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان، بافت چربی و بند ناف در مورد بررسی نشانگرهای سطحی سلول‌ها انجام شده بود، سلول‌های پیش‌ساز مزانشیمی بررسی حاضر نیز ماهیت مزانشیمی خود را نشان دادند. راه حل دسترسی به سلول‌های مزانشیمی از منبعی غیر از مغز استخوان از مباحثی بود که در سال ۲۰۰٦ لین [Lian] و همکارانش را بر آن داشت تا با کشت سلول‌های بنیادی جنینی مشکلات موجود در استفاده از سلول‌های مغز استخوان را برطرف سازند [۱۵]. در این روش جایگزین، این محققین با کشت سلول‌های بنیادی جنینی در محیط کشت مخصوص سلول‌های بنیادی مزانشیمی به جمعیتی از سلول‌های یک شکل دست یافتند که از لحاظ نشانگرهای سطحی +CD105 و -CD24 بودند. آن‌ها با استفاده از دستگاه Fluorescent Activated (FACS) Cell Sorter، سلول‌هایی که دارای این نشانگرها بودند را جدا کرده و نشان دادند که بسیاری از خصوصیات سلول‌های بنیادی



شکل ۳. تمایز سلول‌های پیش سازمزانشیمی مشتق شده از سلول‌های بنیادی پرتوان القا یی به سلول‌های چربی (الف و ب) و سلول‌های استخوان (ج و د) پس از ۲۱ روز کشت: الف: نمای فازکانتراست سلول‌های چربی تمایز یافته، ب: رنگ آمیزی Oil Red-O سلول‌های چربی تمایز یافته، ج: نمای فازکانتراست سلول‌های استخوانی تمایز یافته، د: رنگ آمیزی Alizarine Red-S سلول‌های استخوانی تمایز یافته.

www.SID.ir

مزانشیمی در آن‌ها وجود دارد. با این حال این گروه نیز شاید در برطرف کردن موانع قبلی موفق شده بودند ولی محدودیت در دستیابی به این منبع سلولی و نیز مشکلات اخلاقی در استفاده از این سلول‌ها را نیز نمی‌توان نادیده گرفت. جداسازی سلول‌های مزانشیمی از منبع سلول‌های بنیادی جنینی در سال ۲۰۰۸ توسط تیم تحقیقاتی تریودی [Trivedi] و همکارانش با یک شیوه متفاوتی نسبت به گروه قبلی ادامه پیدا کرد. در این مطالعه هم‌کشتی سلول‌های بنیادی جنینی با سلول‌های OP9 که رده‌ای از سلول‌های مغز استخوان موشی هستند منجر به تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های +CD73 شد؛ به‌طوری که خصوصیاتی شبیه به سلول‌های مزانشیمی را از خود بروز دادند [۱۶]. سلول‌های پیش‌سازمزانشیمی حاصل از بررسی حاضر نیز شبیه به مطالعه تریودی با مطالعات مورفولوژیکی که روی آن‌ها انجام شد، نشان دادند که بعد از تمایز از سلول‌های iPS همانند سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان به شکل دوکی درآمده و نسبت هسته به سیتوپلاسم‌شان که در ابتدای تمایز زیاد بوده به تدریج کاهش یافت. به‌این ترتیب با استفاده از تمایز سلول‌های iPS به سلول‌های شبه مزانشیمی، نه تنها به منابع وسیعی از سلول‌ها دست خواهیم یافت بلکه از مشکلات اخلاقی گریبانگیر سلول‌های بنیادی جنینی به دور خواهیم بود. از آنجایی که پیوند سلول یا بافت، بدن فرد را با واکنش ایمنی مواجه خواهد ساخت، بنابراین یکی دیگر از موانع موجود در استفاده از سلول‌های مزانشیمی تمایز یافته از سلول‌های بنیادی جنینی، خطر رد پیوند و بنابراین نیاز به سرکوب سیستم ایمنی فرد بیمار است [۱۷]. مشکل سرکوب سیستم ایمنی نیز با استفاده از سلول‌های iPS که از بازبرنامه‌ریزی سلول‌های بالغ خود بیمار به‌دست آمده‌اند، مرتفع می‌شود. به این ترتیب استفاده از این سلول‌ها می‌تواند برای سلول درمانی موفقیت بزرگی به حساب آید، زیرا علاوه بر اینکه نیازی به سرکوب ایمنی ندارد بلکه برای بسیاری از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های استخوانی، کبدی و غیره قابل استفاده خواهد بود. با بازبرنامه‌ریزی سلول‌های بالغ، قابلیت تکثیر و تمایز سلول بسیار بالا رفته و می‌تواند در درمان بیماری کمک کننده باشد ولی ایرادی که همچنان بر این سلول‌ها وارد است قابلیت سرطان زایی این سلول‌ها است. در مطالعه‌ای که کارسون [Karlsson] و همکارانش در سال ۲۰۰۹ روی سلول‌های بنیادی جنینی انسانی انجام دادند، نشان داده شد که تمایز این سلول‌ها به سلول‌ها شبه مزانشیمی موجب کاسته شدن محسوس قابلیت سرطان زایی آن‌ها خواهد شد و با پیوند آن‌ها زیر کپسول کلیه ساختارهای توموری که حاوی رده‌های اکتودرمی، مزودرمی و اندودرمی هستند دیده نمی‌شوند [۱۲]. به این ترتیب در مطالعه حاضر نیز سلول‌های پیش‌سازمزانشیمی قابلیت تمایز به رده مزانشیمی و رده‌های متمایزتر مزانشیمی یعنی تمایز به سلول‌های استخوانی و چربی را از خود نشان دادند. بنابراین به نظر می‌رسد با تمایز سلول‌های بنیادی پرتوان القایی به سلول‌های شبه مزانشیمی از لحاظ سرطان زایی، نتایجی شبیه به نتایج مطالعه کارسون به‌دست خواهد آمد زیرا این سلول‌ها از لحاظ رفتاری بسیار شبیه به سلول‌های بنیادی جنینی هستند. از طرفی چنانچه سلول‌های شبه مزانشیمی حاصل از سلول‌های iPS به میزان بالایی تولید شود، می‌توان با انجام HLA-typing یک بانک سلولی مزانشیمی برای کل جمعیت ایجاد کرد که منبعی نامحدود و بدون نیاز به روش‌های تهاجمی و قابل استفاده برای افراد مسن خواهد بود. بنابراین پیشنهاد می‌شود که در مطالعه بعدی روی سلول‌های iPS، قابلیت سرطان زا بودن این سلول‌ها بعد از تمایز به رده مزانشیمی، در بدن موجود زنده مورد مطالعه قرار گرفته تا بتواند به عنوان منبع قابل اعتمادی برای سایر محققین مورد استفاده قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

کلیه هزینه‌های مصرفی این پروژه بر مبنای قرارداد شماره ۸۹/٤٦۳۰۹ پ ر مورخ ۱۳۸۹/۲/۱۸ ازبودجه تحقیقاتی پژوهشگاه رویان تأمین شده است.

Archive of SID
www.SID.ir

References

1. **Zhang ZhX, Guan LX, Zhang K, Wang Zh, Cao PCh, Wang YH, et al.** Cytogenetic analysis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells passaged in vitro. Cell Biol Int 2007; 31: 645-8.
2. **Kasper G, Mao L, Geissler S, Draycheva A, Trippens J, Kühnisch J, et al.** Insights into Mesenchymal Stem Cell Aging: Involvement of Antioxidant Defense and Actin Cytoskeleton. Stem Cells 2009; 27(6): 1288-97.
3. **Roobrouck VD, Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM.** Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. Exp Cell Res 2008; 314(9): 1937-44.
4. **Hwang NS, Varghese S, Lee HJ, Zhang Z, Ye Z, Bae J, et al**. In vivo commitment and functional tissue regeneration using human embryonic stem cell-derived mesenchymal cells. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105(52): 20641-6.
5. **Bellantuono I, Aldahmash A, Kassem M.** Aging of marrow stromal (skeletal) stem cells and their contribution to age-related bone loss. Biochim Biophys Acta 2009;1792(4):364-70.
6. **Takahashi K, Yamanaka S.** Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 2006; 126: 663-76.
7. **Meissner A, Wernig M, Jaenisch R.** Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. Nat Biotechnol 2007;25(10):1177-81.
8. **Jung KW.** Perspectives on human stem cell research. J Cell Physiol 2009; 220(3):535-7.
9. **Nakatsuji N, Nakajima F, Tokunaga K.** HLA-haplotype banking and iPSC cells. Nat Biotechnol 2008; 26(7):739-40.
10. **Olivier EN, Rybicki AC, Bouhassira EE.** Differentiation of human embryonic stem cells into bipotent mesenchymal stem cells. Stem Cells 2006;24(8):1914-22.
11. **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): 146-54.
12. **Karlsson C, Emanuelsson K, W essberg F, Kajic K, Axell MZ, Eriksson PS, et al.** Human embryonic stem cell-derived mesenchymal progenitors-Potential in regenerative medicine. Stem Cell Res 2009; 3: 39–50
13. **Totonchi M , Taei A, Seifinejad A, Tabebordbar M, Rassouli H, Farrokhi A, et al.** Feeder- and serum-free establishment and expansion of human induced pluripotent stem cells**.** Int J Dev Biol 2010;54(5):877-86.
14. **Eslaminejad MB, Nikmahzar A, Taghiyar L, Nadri S, Massumi M.** Murine mesenchymal stem cells isolated by low density primary culture system. Dev Growth Differ 2006; 48(6): 361-70.
15. **Lian Q, Lye E, Suan Yeo K, Khia Way Tan E, Salto-Tellez M, Liu TM, et al.** Derivation of clinically compliant MSCs from CD105+, CD24-differentiated human ESCs. Stem Cells. 2007;25(2):425-36.
16. **Trivedi P, Hematti P**. Derivation and immunological characterization of mesenchymal stromal cells from human embryonic stem cells. Exp Hematol 2008; 36(3): 350-9.
17. **Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R.** Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPSC cells generated from autologous skin. Science 2007; 318: 1920-3.

Archive of SID
www.SID.ir