

## القای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی به سلول‌های فیبری عدسی چشم

هما محسنی کوچصفهانی<sup>۱</sup>، محمد نبیونی<sup>۲</sup>، پریسا غیبی<sup>۳</sup>، نسیم اسلامی<sup>۳</sup>، خدیجه بهره بر<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانشیار، دکتری زیست‌شناسی تکوینی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم تهران  
<sup>۲</sup> استادیار، دکتری زیست‌شناسی تکوینی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم تهران  
<sup>۳</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی تکوینی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم تهران

### چکیده

سابقه و هدف: احتمال می‌رود که سلول‌های بنیادی بافت چربی تحت القا فاکتورهای موجود در مایع زجاجیه به سمت ایجاد فیبرهای عدسی پیش‌روی کنند. یکی از بیماری‌های چشمی آب مروارید (Cataract) می‌باشد که در درمان این بیماری از عدسی جایگزین استفاده می‌شود. هدف از این تحقیق یافتن جایگزین‌های طبیعی‌تری به جای عدسی‌های مصنوعی است.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، سلول‌های بنیادی از چربی ناحیه کشاله ران موش NMRI جدا شده و برای شناسایی بنیادی بودن سلول‌ها، از مارکر OCT4 با روش ایمونوسیتوشیمی استفاده گردید. سپس سلول‌ها تحت القا زجاجیه چشم گاو به مدت ۱۴ روز با درصد‌های مختلف قرار گرفتند. بیان مارکرهای سلول‌های فیبری عدسی چشم (کریستالین آلفا) به صورت کیفی در نمونه‌های تجربی و کنترل با روش ایمونوسیتوشیمی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: سلول‌های بنیادی چربی موش نسبت به مارکر OCT4 پاسخ مثبت نشان دادند. بررسی‌های مورفولوژیکی پس از تیمار نشان داد که سلول‌هایی که با دوز ۴۰٪ از مایع زجاجیه نسبت به محیط کشت تیمار شدند از لحاظ شکل ظاهری نسبت به سلول‌های گروه کنترل کشیده‌تر و به صورت موضعی به موازات هم آرایش یافتند (ویژگی تمایز به فیبرهای عدسی)، به علاوه در داخل هسته آنها تعداد هستک‌ها افزایش یافت که بیانگر افزایش پروتئین سازی در آنهاست. بیان مثبت مارکر کریستالین در دوز ۴۰٪ در نمونه‌های تجربی با توجه به آزمون آماری ANOVA اثباتی بر تمایز این سلول‌ها به سمت سلول‌های شبه فیبری عدسی در این دوز بود.

نتیجه‌گیری: این تحقیق نشان داد که بر اساس مورفولوژی و پاسخ مثبت سلول‌های گروه تجربی به مارکر اختصاصی سلول‌های فیبری عدسی، سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت چربی در اثر تیمار با زجاجیه به سلول‌های فیبری عدسی متمایز می‌شوند.

واژگان کلیدی: کاتاراکت، سلول‌های بنیادی، مایع زجاجیه.

### مقدمه

نیافته‌ای هستند که قادرند تحت شرایط خاص به یکی از انواع سلول‌های بالغ یا کاملاً تمایز یافته تبدیل شوند (۱). از ویژگی‌های آنها می‌توان به توانایی خود تجدیدی، تقسیم میتوزی بالا، خاصیت کلونی‌زایی و همچنین تمایز به انواع سلول‌های تخصص یافته (۲) و ایجاد یک جمعیت سلولی ترمیمی اشاره کرد (۳،۴). سلول‌های بنیادی از لحاظ منشاء به دو دسته عمده سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی بالغ تقسیم می‌شوند. از مهم‌ترین سلول‌های بنیادی بالغ که امروزه توجه

در بدن موجودات زنده پرسلول، برخی از سلول‌ها ضامن بقای موجود می‌باشند که از آن جمله می‌توان به سلول‌های بنیادی اشاره کرد. سلول‌های بنیادی، سلول‌های سوماتیکی تمایز

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه تربیت معلم، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، دکتر هما

محسنی کوچصفهانی (email: kouchehfehani@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۹۰/۱۱/۲۰

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۱/۶/۱۹

## مواد و روشها

### نحوه گرفتن مایع زجاجیه

چشم های گاو گرفته شده از کشتارگاه کرج در PBS به آزمایشگاه منتقل شد و با آنتی بیوتیک پنی سیلین و استرپتومایسین همراه با PBS استریل گردید. با فروکردن سر سرنگ 16g از ناحیه پشتی چشم، مایع زجاجیه بیرون کشیده شد و در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۴۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفت. مایع رویی فیلتر گردید و در فریزر ۴۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

### جداسازی بافت چربی و سلول های بنیادی

در این تحقیق تجربی، از موش های NMRI نگهداری شده در شرایط آزمایشگاهی استاندارد از نظر نور و غذا و دما استفاده شد. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی درون قفس های مخصوص با درب فلزی نگهداری می شدند. بافت چربی از ناحیه پشت کتاله ران شش موش NMRI که بین ۴ تا ۶ هفته سن داشتند، جدا شده و در محلول استریل phosphate-buffered saline (PBS) تحت شستشو قرار گرفت. سپس قطعات چربی به صورت مکانیکی با قیچی از هم جدا شدند و به قطعات دو میلیمتری درآمدند. تمامی مراحل بالا بر روی یخ انجام گرفت. سپس تمامی PBS محیط کشیده شد و تکه های چربی تحت تاثیر ۰/۰۷۵ کلاناز نوع I (Merck, Germany) در PBS به مدت چهار و پنج دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ Co<sub>2</sub> قرار گرفتند، با این توصیف که هر پنج دقیقه یک بار مواد داخل فالكون پیپتاژ شد. سپس کلاناز با PBS خنثی گردید و فالكون داخل سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور 1200g قرار گرفت (۱۲). پس از اتمام سانتریفیوژ، مایع رویی که حاوی تکه های چربی بود دور ریخته شد و Pellet با PBS شستشو داده شد و دوباره در سانتریفیوژ با دور 1500rpm به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت و پس از اینکه دوباره مایع رویی حذف شد، محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco USA) به همراه FBS ۱۵٪ (Sigma USA) و آنتی بیوتیک های پنی سیلین و استرپتومایسین به نسبت ۱ به ۱۰۰ به Pellet اضافه شد و در فلاسک ۲۵ cm<sup>2</sup> بدون پوشش با درب فیلتردار کشت داده شد و هر ۲ روز یک بار تعویض محیط صورت گرفت. اولین پاساژ پس از شش روز انجام شد و سلول ها برای رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی ابتدا شمارش شده معادل ۳×۱۰<sup>۴</sup>، در پلیت ۹۶ خانه ای قرار داده شدند. پس از

اکثر محققین را به خود جلب کرده است، می توان به سلول های بنیادی مزانشیمی اشاره کرد (۵).

این سلول ها به طور مشخص چند توان بوده و سلول های حاصل از تقسیم آنها اگر تحت القانات اختصاصی قرار بگیرند به انواع مختلف دودمانی سلول های دیگر تبدیل می شوند. اخیراً از میان سلول های بنیادی بالغ، سلول های بافت چربی گزینه ای مناسب در جهت تحقیقات به حساب می آید، زیرا برداشت بافت چربی در مقایسه با سایر بافت های بالغ از جمله مغز استخوان آسان تر بوده و در این برداشت تعداد سلول بنیادی بیشتری به دست می آید. اولین بار تخلیص مجموعه سلول های بنیادی از بافت چربی در سال ۱۹۶۴ توسط Rodbell توضیح داده شد (۶).

مایع زجاجیه به عنوان عامل القایی این تحقیق حاوی فاکتورهای رشد فیبروبلاستی (FGF) از جمله FGF-1 و FGF-2 است که باعث القا و تمایز سلول ها بنیادی به سلول های فیبری عدسی می شود و این روند به جهت بیان ژن های کریستالین آلفا که عمده ترین پروتئین محلول در سلول های عدسی هستند صورت می گیرد (۷). از عمده ترین رویدادهای مورفولوژیکی در سلول های فیبری عدسی پس از بیان کریستالین ها می توان به از دست دادن هسته و سایر اندامک ها و طویل شدن و تخصص یابی ساختاری در سلول های فیبری و در نهایت شفافیت آنها اشاره کرد (۸).

تحقیقات نشان می دهد که آلفا کریستالین ها در عدسی چشم پستانداران بر دو نوع  $\alpha A$  و  $\alpha B$  - کریستالین می باشند و رونویسی از ژن های آنها در مراحل ابتدایی رشد و نمو انجام می گیرد، به طوری که در پلاک عدسی موش در مرحله E9.5،  $\alpha B$ -crystallin و در مرحله E10.5 تا E10.5 در جام عدسی،  $\alpha A$ -crystallin قابل تشخیص است (۹).

تا به امروز تحقیقات نشان داده اند که سلول های بنیادی گرفته شده از بافت چربی با نام اختصاری (ASC) ها قادر به تمایز به سلول هایی از جمله سلول های غضروفی، عصبی، استخوانی، چربی و شبه آندوتلیالی تشکیل دهنده آئورت هستند (۱۰). در صورت تمایز این سلول ها به سلول های فیبری عدسی چشم، سلول های چربی منبعی آسان و در دسترس جهت تمایز به عدسی چشم خواهد بود. در چند دهه اخیر استفاده از سلول های بنیادی در درمان بیماری ها بسیار مورد توجه بوده است. یکی از بیماری های شایع چشمی آب مروارید (Cataract) می باشد که در درمان نوع حاد این بیماری از عدسی مصنوعی با نام intraocular lens (IOL) به عنوان جایگزین عدسی استفاده می شود (۱۱).

۱۲ ساعت که از زمان کشت سلول گذشت سلول‌ها همان‌طور که در ذیل آمده رنگ‌آمیزی شدند.

### ایمونوسیتوشیمی

خانه‌های پلیت با PBS شست و شو داده شدند، سپس با فرمالین ۴٪ سرد برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد و سپس ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند و بعد از آن خانه‌ها دو بار با PBS شست و شو داده شدند. سلول‌ها به مدت ۱۵ دقیقه تحت تاثیر تریتون X100 با غلظت ۰/۴٪ در دمای اتاق قرار گرفتند و سپس با PBS شسته شدند. سرم بز ۵٪ به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق به آن اضافه گردید و پس از مدت معین بدون شست و شو برداشته شد و آنتی بادی اولیه Anti-OCT4 (ab 18976) را که در BSA/PBS ۰/۲٪ حل شده به سلول‌ها اضافه گردید و ۱۲ ساعت بدین صورت در دمای ۴ درجه قرار گرفت. خانه‌های پلیت سه بار با PBS-Tween ۰/۱٪، هر بار به مدت ۵ دقیقه شسته شدند سپس در BSA/PBS ۰/۱٪ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد و بدون شست و شو برداشته شد و در تاریکی به خانه‌ها آنتی بادی ثانویه IgG-flTC (anti-rabbit- AF8035) که در BSA/PBS ۰/۲٪ حل شده بود به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق اضافه گردید. خانه‌های پلیت سه بار با PBS-Tween ۰/۱٪، هر بار به مدت ۵ دقیقه شست و شو داده شدند و در آخرین مرحله در تاریکی به خانه‌ها Hoechst اضافه گردید و پس از ۱۰ دقیقه با PBS شست و شو داده و در زیر میکروسکوپ فلورسانس سلول‌ها مشاهده شدند.

### پاساژ دادن سلول‌ها

سلول‌های گرفته شده از چربی موش در طی هشت روز سه بار پاساژ داده شدند. برای هر فلاسک  $25 \text{ cm}^2$  که به مقدار ۷۰ تا ۸۰ درصد از پرشدگی فلاسک رسیده بود از تریپسین ۰/۰۵٪ استفاده شد. برای پاساژ دادن آنها و تقسیم سلول‌ها در دو فلاسک، ابتدا محیط کشت خارج گردید و سلول‌ها دو بار با PBS شست و شو داده شدند، سپس مقدار  $500 \mu\text{l}$  از تریپسین به فلاسک اضافه شد و پس از ماندن در انکوباتور به مدت ده دقیقه، سلول‌ها از کف فلاسک کنده شدند و به صورت شناور درآمدند. سپس با محیط کشت خنثی شده و در فلاسک‌های جدید قرار گرفتند. در این روش از سانتریفیوژ استفاده نشد تا استرس کمتری به سلول‌ها وارد شود و در ضمن نسبت تریپسین و محیط کشت داخل فلاسک حدود یک به ده در نظر گرفته شد تا آسیبی به سلول‌ها وارد نشود.

### تیمار سلول‌های جدا شده با مایع زجاجیه

پس از آخرین پاساژ سلول‌ها و بعد از شمارش آنها، تعداد  $26 \times 10^4$  سلول در هفت خانه از پلیت ۲۴ خانه‌ای کشت داده شدند و پس از چسبیدن سلول‌ها به کف ظرف، پنج خانه با درصدهای ۱۰٪، ۲۰٪، ۳۰٪، ۴۰٪ از مایع زجاجیه به نسبت DMEM و FBS ۱۵٪ و آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان نمونه‌های تجربی مورد بررسی قرار گرفتند. بدین صورت که در خانه اول که نسبت زجاجیه به محیط کشت ۱۰ به ۹۰ بود ۱۰۰ میکرولیتر از مایع زجاجیه به همراه ۹۰۰ میکرولیتر از محیط کشت به همراه FBS ریخته شد و در خانه‌های بعدی نیز به ترتیب ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میکرولیتر مایع زجاجیه ریخته شد و به ترتیب ۸۰۰، ۷۰۰ و ۶۰۰ میکرولیتر از محیط کشت به همراه FBS اضافه شد. دو خانه به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند که در آنها تیمار با مایع زجاجیه صورت نگرفت و صرفاً با DMEM و FBS ۱۵٪ و آنتی‌بیوتیک‌ها کشت داده شدند. این خانه‌ها به مدت ۱۴ روز تحت تیمار و کشت قرار گرفتند.

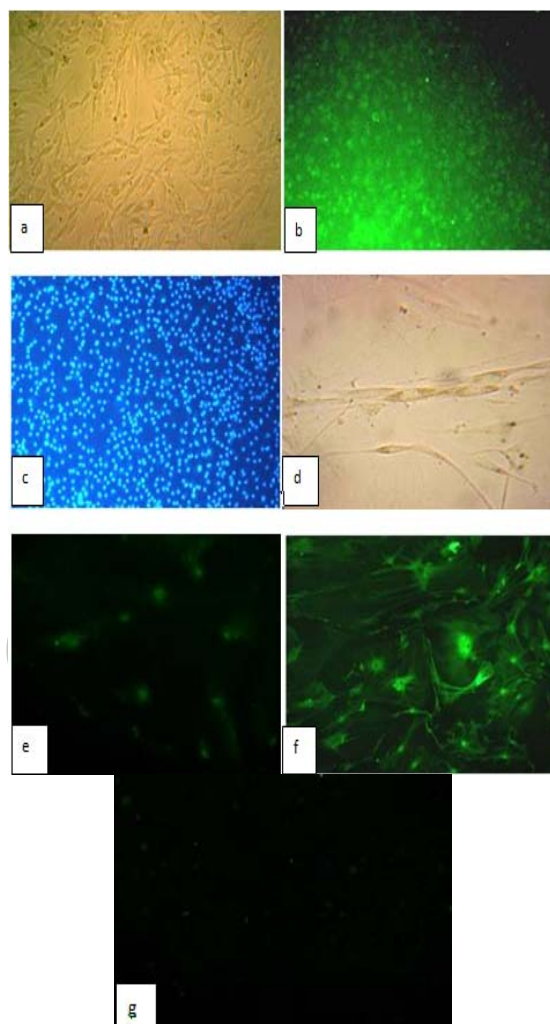
### رنگ‌آمیزی سلول‌ها با مارکر کریستالین

در انتهای روز چهاردهم، طبق روش ایمونوسیتوشیمی ذکر شده در بالا، نمونه‌های تجربی و نمونه‌های کنترل، با آنتی‌بادی اولیه کریستالین alpha A+ alpha B crystalline antibody (ab28163) و آنتی بادی ثانویه anti-rabbit- IgG- AF8035 (FITC) رنگ‌آمیزی شدند.

### یافته‌ها

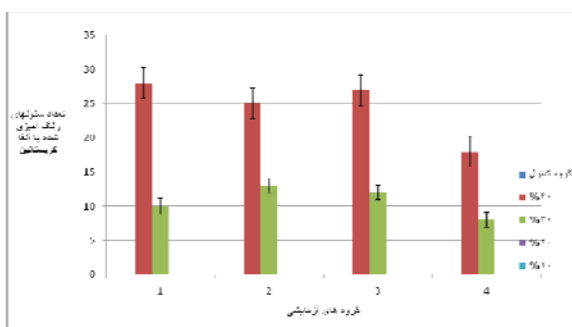
سلول‌های بنیادی مزانشیمی گرفته شده از بافت چربی پس از بیست و چهار ساعت به کف فلاسک چسبیدند و سلول‌ها در روزهای آتی به فرم فیبروبلاستی درآمدند (شکل ۱a). در این مرحله از ویژگی چسبندگی به کف ظروف پلاستیکی که شاخص سلول‌های بنیادی مزانشیمی است برای جداسازی آنها استفاده شد. سپس سلول‌های جدا شده برای اثبات بنیادی بودن قبل از اولین پاساژ توسط مارکر OCT4 که مارکر سلول‌های بنیادی پرتوان است، با روش ایمونوسیتوشیمی رنگ‌آمیزی شدند و چنان چه در شکل ۱b و ۱c مشاهده می‌شود به این مارکر پاسخ مثبت نشان دادند. پس از پاساژ سوم سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت چربی تحت القاء درصدهای مختلف (۴۰-۱۰٪) مایع زجاجیه نسبت به محیط کشت، به مدت چهارده روز قرار گرفتند. پس از بررسی‌های مورفولوژیکی، تمامی گروه‌ها توسط مارکر کریستالین آلفا (مارکر سلول‌های فیبری عدسی) رنگ‌آمیزی شدند. نتایج

بررسی های ایمونوسیتوشیمی که بر روی سلول های گروه کنترل و سلول های تیمار شده با درصد های مختلف زجاجیه انجام شد در شکل ۱ آورده شده است.



**شکل ۱- بررسی های ایمونوسیتوشیمی بر روی سلول های گروه کنترل و سلول های تیمار شده با درصد های مختلف زجاجیه. a** سلول های بنیادی مزانشیمی بافت چربی در روز هفتم کشت که فرم فیبروبلاستی و چسبیده داشتند. بزرگنمایی 200X. **b** سلول های بنیادی مزانشیمی بافت چربی پس از اولین پاساژ که با مارکر OCT4 رنگ شده اند و در زیر میکروسکوپ معکوس فلورسانس با رنگ FITC سبز دیده می شوند، با بزرگنمایی 200X. **c** هسته سلول های بنیادی مزانشیمی بافت چربی که با رنگ آمیزی Hoechst در زیر میکروسکوپ معکوس فلورسانس آبی دیده می شوند. بزرگنمایی 200X. **d** سلول های گروه های تجربی پس از چهارده روز تیمار با غلظت ۴۰٪ مایع زجاجیه که سلول ها کشیده و کاملاً به موازات هم آرایش یافته اند. بزرگنمایی ۴۰۰X. **e** سلول های تیمار شده با غلظت ۳۰٪ از مایع زجاجیه که با مارکر کریستالین آلفا رنگ آمیزی شده اند و سبز دیده می شوند. با بزرگنمایی 400X. **f** سلول های تیمار شده با غلظت ۴۰٪ از مایع زجاجیه که با مارکر کریستالین آلفا رنگ آمیزی شده اند و سبز دیده می شوند. با بزرگنمایی 400X. **g** سلول های گروه کنترل که با مارکر کریستالین آلفا رنگ آمیزی شده اند و هیچ گونه رنگی را نشان نمی دهند. با بزرگنمایی 400X

در درصد های ۱۰ و ۲۰ درصد هیچ گونه بیان کریستالین مشاهده نشد، ولی در درصد های ۳۰ و ۴۰ درصد بیان این مارکر رویت شد که با مقایسه آماری صورت گرفته توسط Insat3 با استفاده از تست ANOVA بهترین پاسخ در دوز ۴۰٪ از مایع زجاجیه مشاهده شد (نمودار ۱). در این دوز، سلول های گروه تجربی از لحاظ شکل ظاهری نسبت به سلول های گروه کنترل کشیده تر و به صورت موضعی به موازات هم آرایش یافتند (ویژگی تمایز به سلول های فیبری عدسی) (شکل ۱f). به علاوه در داخل هسته آنها تعداد هستک ها افزایش یافت که بیانگر افزایش پروتئین سازی در آنها بود (شکل ۱d). سلول های گروه های تجربی که با درصد های کمتر مایع زجاجیه تیمار شدند، تفاوت قابل ملاحظه ای با سلول های گروه کنترل نداشتند، شکل ظاهری آنها فیبروبلاستی و یا با کشیدگی خفیف بدون جهت گیری موازی باهم بودند. در دوز ۳۰ درصد همانند دوز ۴۰ درصد بیان صورت گرفت، اما میزان این بیان در دوز ۳۰ درصد بسیار کم بود (شکل ۱e).



**نمودار ۱- مورفومتري تعداد سلول های رنگ آمیزی شده با آلفا کریستالین در گروه کنترل و گروه های تیمار شده با ۱۰٪، ۲۰٪، ۳۰٪ و ۴۰٪ از مایع زجاجیه نسبت به محیط کشت (در هر گروه n=۴). در گروه های تیمار شده با ۳۰٪ و ۴۰٪ از مایع زجاجیه افزایش معنی داری به صورت  $P < 0.001$  در تعداد سلول های رنگ آمیزی شده با آلفا کریستالین نسبت به گروه کنترل و گروه های تیمار شده با ۱۰٪ و ۲۰٪ از مایع زجاجیه مشاهده شد. در مقایسه بین گروه های تیمار شده با ۴۰٪ نیز این افزایش معنی دار به صورت  $P < 0.001$  در تعداد سلول های رنگ آمیزی شده با آلفا کریستالین نسبت به گروه تیمار شده با ۳۰٪ مشاهده شد. روش آماری انجام شده ANOVA بود.**

## بحث

سلول های بنیادی مشتق شده از بافت چربی، سلول هایی هستند که چند توان بوده و از نوع بنیادین بالغ می باشند (۱۰). این سلول ها به جهت میزان زیاد و همچنین جداسازی آسان از بدن فرد بدون در خطر انداختن حیات موجود، منابعی

دارای FGF-2 کشت دادند. در نهایت مشاهده کردند که مورفولوژی آنها تغییر یافته و اجسام لونتوئیدی (lentoid) (مجموعه دستجات چند سلولی گرد و دارای خاصیت انکسار بسیار) ظاهر شدند. آنها برای اثبات ادعای خود در مورد تمایز این سلول‌ها به عدسی چشم از مارکر آلفا کریستالین نوع A و B با روش RT-PCR استفاده کردند (۱۷).

همچنین در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۰ توسط ملکی و همکارانش انجام شد، موفق شدند سلول‌های بنیادی بندناف موش را جدا کرده و در مجاورت مایع زجاجیه چشم گاو به نسبت (۱:۳) کشت دادند و بیان پروتئین‌های  $\alpha$  کریستالین A و B را بعد از ۱۰ روز کشت با استفاده از روش Western blot analysis مشاهده نمودند (۱۸).

در تحقیق حاضر، بررسی میزان تمایز سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت چربی در درصدهای مختلف مایع زجاجیه به مدت ۱۴ روز صورت گرفت و غلظت ۴۰٪ از مایع زجاجیه به عنوان بهترین غلظت تمایزی در نظر گرفته شد. جهت تعیین تمایز ابتدا تغییرات در مورفولوژی سلول‌ها و سپس بیان پروتئین‌های آلفا کریستالین که مارکر تمایزی سلول‌های فیبری عدسی هستند بررسی شد. در غلظت ۴۰٪ مایع زجاجیه به محیط کشت سلول‌ها کاملاً کشیده و آرایشی موازی با یکدیگر یافتند که معرف تمایز آنها به سمت سلول‌های فیبری عدسی بود. به علاوه، تعداد هستک‌ها در درون هسته افزایش یافت که نشان دهنده افزایش میزان پروتئین سازی در آنها بود. جهت بررسی بیان پروتئین‌های آلفا کریستالین از روش ایمونوسیتوشیمی استفاده شد.

آلفا کریستالین‌ها که عمده‌ترین پروتئین‌های محلول در آب در سلول‌های عدسی چشم هستند که به دو گروه  $\alpha$ Crystallin و  $\beta$ Crystallin تقسیم می‌شوند.  $\alpha$ B-Crystallin در مرحله E<sub>9</sub> در پلاک عدسی موش بیان می‌شود (۹) و یک پروتئین کوچک شوک حرارتی است (۱۴).  $\alpha$ Crystallin در مرحله E10 تا E10.5 در جام عدسی بیان می‌شوند (۹). هر دوی این کریستالین‌ها دارای فعالیت چارپرونی بوده و عملکرد آنها با اعمال پروتئین‌های دیگر از جمله Hsp70 و GroE که وابسته به ATP و جزو پروتئین‌های شوک حرارتی هستند مشترک می‌باشد (۱۵).

بررسی بیان پروتئین‌های کریستالین در گروه کنترل برای نشان دادن میزان استرس وارده به محیط بدین صورت انجام شد که تمامی سلول‌های تحت تیمار همراه با نمونه کنترل در یک پلیت ۲۴ خانه‌ای و در داخل انکوباتور با شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت کافی و ۵٪ CO<sub>2</sub> قرار گرفتند. این

مهم برای بررسی‌های سلولی و استفاده در سلول درمانی و تمایز به سمت سلول‌های دیگر هستند (۶). بیان ژن Oct-4 در بافت‌های بالغ نظیر بافت کبد، پستان، پانکراس، کلیه، مزانشیمی و پوست در سطح mRNA و پروتئین بررسی و مشخص شد که بیان Oct-4 در این بافت‌ها منحصراً در بن یاخته‌های بافتی اتفاق می‌افتد. نقش این ژن در مهار تمایز بن یاخته‌های جنینی و پرتوان و چند توان به خوبی مطالعه شده است (۱۵-۱۳). در این تحقیق، پاسخ مثبت سلول‌های جدا شده از بافت چربی موشی نسبت به مارکر OCT4 بیانگر بنیادی بودن این سلول‌ها بود.

در مطالعات گذشته که بر روی توان تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی انسان و موش صورت گرفته نشان داده شده است که سلول‌های بنیادی چند توان این بافت می‌توانند به استخوان، غضروف، چربی و سلول‌های تشکیل دهنده آئورت تبدیل شوند (۱۰). این سلول‌ها همانند سلول‌های بنیادی مغز استخوان به کف ظرف پلاستیکی کشت می‌چسبند و از لحاظ بررسی مارکرها حدوداً مشابه عمل می‌کنند. این سلول‌ها نسبت به مارکرهای سطحی سلول‌های خونساز منفی عمل کرده و نسبت به مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مثبت هستند (۶). یکی از علائم مزانشیمی بودن سلول‌ها چسبندگی آنها به کف ظروف پلاستیکی است که در نمونه‌های گرفته شده پس از بیست و چهار ساعت این رویداد مشاهده شد و سلول‌ها در روزهای آتی به فرم فیبروبلاستی درآمدند.

جهت تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی به سلول‌های فیبری عدسی چشم، از مایع زجاجیه استخراج شده از چشم گاو استفاده شد. مایع زجاجیه با دارا بودن فاکتورهای رشد متعدد به ویژه FGF<sub>1</sub> و FGF<sub>2</sub> منابع مناسبی جهت القای تمایز این سلول‌ها به سمت سلول‌های فیبری عدسی محسوب می‌شود. در این رابطه O'Connor و Mc Avoy در سال ۲۰۰۷ دو بافت اپیتلیومی از دو عدسی مجزا را بر روی هم در محیط کشت مخلوط با زجاجیه گاوی (۱:۱) کشت دادند و علاوه بر بررسی‌های میکروسکوپی و تعیین میزان توانایی این ساختار عدسی مانند نشان دادند که در این شرایط این سلول‌ها بعد از ۳۰ روز کشت شکل کروی پیدا کرده و شفاف شده‌اند و قادر به متمرکز کردن نور گردیده‌اند. در نتیجه مایع زجاجیه گاوی فاکتورهای مناسب برای تمایز به سمت سلول‌های عدسی را داراست (۱۶).

در سال ۲۰۰۰، Blakely و همکارانش بر روی رشد و تمایز سلول‌های اپیتلیومی عدسی انسان مطالعه کردند. آنها این سلول‌های اپیتلیومی را جدا کرده و بمدت ۱۵ روز در محیط

آلفا را دارند و نسبت به غلظت های دیگر بهترین نتیجه را هم از نظر مولکولی و هم از لحاظ مورفولوژیکی نشان می دهند. افزایش تعداد هستک ها، تغییر شکل سلول ها و طویل شدن آنها، و به موازات هم در یک راستا قرار گرفتن سلول ها که حاکی از تمایز آنها به سمت سلول های فیبری عدسی چشم است و بیان آلفا کریستالین های A و B با نتایج محققان دیگر مطابقت دارد (۱۸-۱۶).

در مقایسه با مطالعه انجام شده توسط ملکی و همکارانش که از دو دوز ۲۵٪ و ۵۰٪ از مایع زجاجیه در طی ده روز استفاده کردند و در دوز ۲۵٪ از مایع زجاجیه کشیدگی سلولی و بیان مارکر کریستالین بیشتر را گزارش نمودند (۱۸)، می توان نتیجه گرفت که دوز حداکثر تمایز در سلول های بنیادی با منشاهای متفاوت متغیر می باشد، به طوری که در بررسی های انجام شده در این تحقیق حداکثر تمایز در دوز ۴۰٪ به دست آمد.

عوامل خود حافظ سلول ها در برابر استرس بود، چنان چه در بررسی های ایمونوفلورسانت هیچ بیانی از  $\alpha$ A-Crystallin و  $\alpha$ B-Crystallin در نمونه های کنترل مشاهده نشد. بدین وسیله فعالیت چپرونی پروتئین ها در چنین شرایطی ظهور نکرده و می توان به داده های حاصله از نمونه های تجربی اطمینان کرد (شکل ۱f).

در بررسی میزان بیان دو نوع پروتئین کریستالین آلفا در روز چهاردهم پس از تیمار و مقایسه گروه های تجربی در دوز های مختلف مایع زجاجیه، مشاهده شد که سلول های القا شده توسط دوز ۴۰٪ میزان بالایی از پروتئین های آلفا کریستالین را بیان کردند که با مشاهدات حاصل از تغییرات مورفولوژیکی این سلول ها در این دوز، کاملاً مطابقت دارد. از یافته های این تحقیق می توان نتیجه گرفت که سلول های بنیادی گرفته شده از بافت چربی تحت القا زجاجیه با غلظت ۴۰٪ نسبت به محیط کشت قابلیت بیان ژن های کریستالین

## REFERENCES

- Grove JE, Bruscia E, Krause DS. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells* 2004; 22:487-500.
- Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Physiol* 1963; 62:327-36.
- Sanai N, Tramontin AD, Quiñones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, et al. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 2004; 427:740-4.
- Svendsen CN, Caldwell MA, Ostenfeld T. Human neural stem cells: isolation, expansion and transplantation. *Brain Pathol* 1999; 9:499-513.
- Pournasr Khakbaz B and Baharvand H. Human mesenchymal stem cells and their clinical application. *Journal of Iranian Anatomical Sciences* 2007; 5: 159.
- Freshney RI, Stacy GN, Auerbach JM, Editors. *Culture of human stem cells*. New York: Wiley Interscience; 2007. P.303-305.
- Lovicu FJ, McAvoy JW. Growth factor regulation of lens development. *Dev Biol* 2005; 280:1-14.
- Carlson Bruce M, Editor. *Human embryology and developmental biology*. 3th ed. New York: Mosby, Inc; 2004. P. 297-98.
- Robinson ML, Overbeek PA. Differential expression of alpha A- and alpha B-crystallin during murine ocular development. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 2276-84.
- Lidong G, LI S, Yunfang W, Huimin Y, Daqing L, He L, et al. In vitro differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells into endothelial-like cells. *Chinese Science Bulletin* 2006; 51:1863-68.
- Dhawan S. Lens and cataract. *Light on Ayurveda Journal* 2005; 11:13-14.
- Sgodda M, Aurich H, Kleist S, Aurich I, König S, Dollinger MM, Fleig WE, et al. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from rat peritoneal adipose tissue in vitro and in vivo. *Exp Cell Res*. 2007; 313:2875-86.
- Palmieri SL, Peter W, Hess H, Schöler HR. Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev Biol* 1994; 166: 259-67.
- Klemenz R, Fröhli E, Steiger RH, Schäfer R, Aoyama A. Alpha B-crystallin is a small heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88:3652-56.
- Carver JA, Aquilina JA, Cooper PG, Williams GA, Truscott RJ. Alpha-crystallin: molecular chaperone and protein surfactant. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1204:195-206.

16. O'Connor MD, McAvoy JW. In vitro generation of functional lens-like structures with relevance to age-related nuclear cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48:1245-52.
17. Blakely EA, Bjornstad KA, Chang PY, McNamara MP, Chang E, Aragon G, et al. Growth and differentiation of human lens epithelial cells in vitro on matrix. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:3898-907.
18. 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; 2:67-71.

Archive of SID