



گزارش نهایی طرح:

بررسی اثر بی وزنی بر بیان ژن های ماتریکس متالوپروتئینازها در سلول های بنیادی  
مشتق از چربی

کد طرح:

۲۴۳۶

کد اخلاق:

IR.ACECR.ROYAN.REC.1395.54

مسئول طرح:

دکتر سید مهدی طبایی، دکتر زهرا حاج ابراهیمی

محل اجرا:

جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، گروه پژوهشی ترمیم نوری

و

پژوهشکده هوا فضا

فروردین ۹۶

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Archive of SID



گزارش نهایی طرح:

بررسی اثر بی وزنی بر بیان ژن های ماتریکس متالوپروتئینازها در سلول های بنیادی  
مشتق از چربی

کد طرح:

۲۴۳۶

کد اخلاق:

**IR.ACECR.ROYAN.REC.1395.54**

مسئول طرح :

دکتر سید مهدی طبایی، دکتر زهرا حاج ابراهیمی

همکاران طرح:

دکتر مینا سادات نادری

فرید ابن رسولی

مریم جهانشیری مقدم

محل اجرا:

جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، گروه پژوهشی ترمیم نوری

مشخصات مجری و همکاران طرح :

ردیف	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی		آخرین رشته تحصیلی	آخرین مقطع تحصیلی	سال اخذ مدرک	دانشگاه	کشور	شغل و موسسه متبوع
		رتبه	پایه						
۱	سید مهدی طبایی	استادیار	۱۰	متخصص پوست	دکتری تخصصی	۱۳۹۱	تهران	ایران	هیات علمی مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی
۲	زهرا حاج ابراهیمی	استادیار	۶	ژنتیک مولکولی	دکتری تخصصی	۱۳۸۷	تربیت مدرس	ایران	هیات علمی پژوهشگاه هوافضا
۳	مینا سادات نادری	پژوهشگر		بیوفیزیک	دکتری تخصصی	۱۳۹۶	تربیت مدرس	ایران	مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی
۴	فرید ابن رسولی	پژوهشگر		ژنتیک مولکولی	دکتری تخصصی	۱۳۹۶	آزاد مرودشت	ایران	پژوهشکده هوافضا
۵	مریم جهانشیری مقدم	کارشناس		شیمی محض	کارشناسی	۱۳۸۵	آزاد اراک	ایران	مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی

## چکیده

در بیماری های مزمن مانند دیابت و سوختگی های عمیق، بهبود پوست نسبت به بهبود طبیعی آن پیچیده و مشکل تر است. یکی از بزرگترین مشکلات پیوند اندام، کمبود بافت یا اندام دهنده است. امروزه با توجه به تعداد کم اهداکنندگان بافت و آلودگیهای ویروسی آن، سعی در مهندسی بافت به کمک سلولهای بنیادی و داربستهای گوناگون اعم از سنتزی و به ویژه طبیعی شده است. بافت چربی به دلیل داشتن مقادیر زیاد سلول بنیادی در مقایسه با مغز استخوان و قابلیت پیوند به میزبان خودی توجه زیادی را به خود جلب کرده است. بی وزنی محیط جدیدی است که دارای مزیت هایی چون رشد سه بعدی سلول بدون وجود نیاز به داربست می باشد و امروزه تلاش های زیادی جهت مهندسی بافت و تولید بافت در این شرایط می گردد.

در این تحقیق سلول های بنیادی مشتق از چربی در شرایط بی وزنی شبیه سازی شده کشت داده شد و بیان ژن های ماتریکسمتالوپروتئیناز در دوره زمانی ۱، ۲ و ۳ روز بعد از اعمال بی وزنی بررسی شد. این پروتئین ها گروه بزرگی از پروتئینها هستند که مسئول تجزیه ماتریکس خارج سلولی اند و فعالیت آنها تحت شرایط فیزیولوژیکی مثل ترمیم زخم تغییر می کند. نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان داد که میزان بیان این ژن ها نسبت به نمونه کنترل پس از ۱، ۲ و ۳ روز اعمال بی وزنی تغییر کرده است. به طوری که بی وزنی منجر به کاهش بیان MMP2، TIMP1 و TIMP2 و افزایش بیان ژن های MMP3 و MMP14 گردید.

با توجه به اینکه تغییرات بیانی این ژن ها در شرایط بی وزنی معنا دار بود و این ژن ها پتانسیل تمایزی سلول های بنیادی و کاربرد در پیوند سلولی و ترمیمی پزشکی را دارند بنابراین نتایج حاصل از این تحقیق را می توان هم در شاخه مطالعات زیست فضا مورد استفاده قرار داد و هم از نتایج آن در مهندسی بافت پوست و ترمیم آسیب های پوستی استفاده کرد.

واژه های کلیدی:

سلول های بنیادی مشتق از چربی ، شرایط بی وزنی شبیه سازی شده ، ماتریکس متالوپروتئینازها

## فهرست مطالب

۶.....	فصل اول ضرورت پژوهش.....
۱۲.....	فصل دوم پیشینه پژوهش.....
۱۷.....	فصل سوم اهداف پژوهش.....
۱۹.....	فصل چهارم روش پژوهش.....
۳۶.....	فصل پنجم یافته های پژوهش.....
۴۸.....	فصل ششم نتیجه گیری و بحث.....
۵۹.....	فصل هفتم منابع.....

Archive of SID

# فصل اول

## ضرورت پژوهش

در بیماری های مزمن مانند دیابت و سوختگی های عمیق، در بسیاری از مراحل، بهبود پوست نسبت به بهبود طبیعی آن پیچیده و مشکل تر است. در مورد زخم های گسترده و عمیق، درمان اتوگرافت رایج است. با این حال، پیشرفت در زیست شناسی سلول های بنیادی پژوهشها را به سمت پیوند سلولی و مهندسی بافت برده است. فیبروبلاست پوست خود بیماران توسط پژوهشگران بسیاری برای ترمیم بافت های پوستی استفاده شده است (۱).

یکی از بزرگترین مشکلات پیوند اندام، کمبود بافت یا اندام دهنده است. آنچه در این روند مورد نیاز است فراهم سازی تسهیلات یا تکنیکی جهت القای بازسازی بافت آسیب دیده است تا بتواند خود را ترمیم کند. امروزه با توجه به تعداد کم اهداکنندگان بافت و آلودگی های ویروسی آن، سعی در مهندسی بافت به کمک سلولهای بنیادی و داربستهای گوناگون اعم از سنتزی و به ویژه طبیعی شده است. بافت چربی به دلیل داشتن مقادیر زیاد سلول بنیادی در مقایسه با مغز استخوان و قابلیت پیوند به میزبان خودی و غیر خودی توجه زیادی را به خود جلب کرده است. نکته قابل توجه دسترسی آسان به حجم بزرگی از چربی طی روند لیپوساکشن می باشد. سالانه حدود 400,000 عمل جراحی لیپوساکشن انجام میشود که به طور معمول چربی حاصل از آن دور ریخته می شود، اما مطالعات جدید نشان می دهد که استفاده از این بافت به عنوان منبع سلولهای بنیادی مزانشیمی پتانسیل عظیم برای کاربردهای مهندسی بافت و تهیه داربست طبیعی فراهم کرده است (۱).

در مهندسی بافت و سلول درمانی جهت پیوند توجه ویژه ای به بازسازی پوست به ویژه برای موارد مربوط به از دست رفتن مناطق گسترده ای از پوست می شود، که در آن درمان های رایج قادر به القا جایگزین رضایت بخش دائمی نمی باشد. مطالعات مختلفی نشان داده است که سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی انسانی (ASC) در شرایط



آزمایشگاهی توانایی تمایز به هر دو رده مزانشیمی و غیر مزانشیمی را دارد. این پتانسیل تمایزی چند جانبه ، همراه

با سهولت برداشت، ASC ها را به عنوان پیشرو در درمان های مبتنی بر سلول های بنیادی قرار داده است(۲).

در پزشکی ترمیمی تحقیقات پایه و مطالعات پیش بالینی در حال تلاش هستند که بتوانند به مشکلات ناشی از

استفاده از سلول های بنیادی مزانشیمی فائق آیند تا از آنها در درمان بیماران نیز به صورت گسترده استفاده نمایند.

سلول های بنیادی مزانشیمی را می توان از بافت هایی همانند مغز استخوان و یا بافت چربی جدا نمود. برای سال های

طولانی مغز استخوان مهم ترین منبع تهیه سلول های بنیادی مزانشیمی برای مهندسی بافت بود، ولی در سال های

اخیر بافت چربی جایگاه ویژه ای را در این خصوص پیدا کرده است چرا که جدا کردن این سلول ها از بافت چربی

آسان تر از مغز استخوان بوده و عوارض کمتری برای بیمار دارد(۲، ۳). این نوع از سلول های بنیادی برای اولین بار در

سال ۲۰۰۱ توسط Zuk و همکارانش شرح داده شد و تحت عنوان سلول های جدا شده از آسپیراسیون چربی

(PLA) نام گذاری شدند. البته PLA به سلول های استرومایی جدا شده از بافت چربی گفته می شود و لازم است از

سلول های بنیادی جدا شده بعد از هضم آنزیمی بافت چربی (ASCs) جدا شود. شباهت سلول های ASCs به

سلول های بنیادی مغز استخوان (BMSCs) این تصور را پیش می آورد که شاید منشأ این سلول ها BMSCs در حال

گردش باشند که توسط دیواره عروق در بافت چربی ارتشاح پیدا می کنند(۳).

فیبروبلاست ها سلول های چند وجهی ای هستند که مسئول ایجاد ساختارهای خارج سلولی برای رشد و عملکرد

سلولی می باشند. از آنجایی که محیط زندگی سلول ها در بافت های مختلف، متفاوت است فیبروبلاست هر بافتی

ویژگی های همان بافت را داشته و بر اساس ساختار موجود در بافت پروتئین ها و فیبرهای تشکیل دهنده ی بافت را

ترشح می کنند. : فیبروبلاست ها دارای قابلیت چسبندگی به سطوح ظروف کشت، سیتوپلاسم انباشته از شبکه ی اندوپلاسمی خشن هستند. فیبروبلاست ها علاوه بر آن ممکن است حاوی نقاط متراکم، دستگاه گلژی بزرگ و گاه گرانول های کلاژنی قابل مشاهده در سیتوپلاسم باشند ولی این سلول ها میکروفیلانمان و یا لامینا در سیتوپلاسم خود ندارند (۴).

یکی از شرایط جدید برای تمایز، استفاده از محیط بی وزنی است که امروزه برای کشت سلول و مهندسی بافت می توان از آن استفاده کرد. در شرایط بی وزنی تغییراتی مهم چون عدم رسوب و ته نشینی، تغییر در جریان های همرفت و فشار هیدرواستاتیک در کشت سلولی اتفاق می افتد. در جاذبه ۱g، سلول های پستانداران در عرض دقایقی کوتاه در ته فلاسک ته نشین شده و در سطح آن پخش شده یا به آن می چسبند. اما در جاذبه صفر، سلول ها در محیط کشت معلق می مانند. رفتن از جاذبه ۱g به جاذبه صفر مثل تغییر مکان از محیط دوبعدی به محیط سه بعدی است. این امر تأثیر چشمگیری بر میان کنش های سلولی، حرکت سلول و شکل آن دارد (۵-۱۰).

با توجه به تفاوت های ذکر شده در شرایط بی وزنی و جاذبه 1g می توان از این تفاوت ها جهت کشت سلول و تمایز استفاده کرد. مطالعات نشان داده است که در شرایط بی وزنی تمایز به سمت سلول هایی مانند چربی بیشتر است اما در شرایط هایپرگراویتی سلول ها تمایل بیشتری به سمت تمایز به استخوان و غضروف دارند و مجموع این تفاوت ها بین شرایط بی وزنی و جاذبه را می توان در تغییرات فیزیولوژیکی که در فضاوردان ایجاد می شود مشاهده کرد (۵-۱۰).

از دست دادن بافت یا اندام ناشی از جراحی یا هر آسیب دیگری یکی از مهمترین مسایل بالینی است . برای درمان جایگزینی، ترمیم بوسیله جراحی، پروتز های مصنوعی برای ترمیم اندام یا بافت از دست رفته، پیشنهاد می شود. اما تمامی این روش ها با محدودیت هایی همراه است ، تکثیر بیوشیمیایی سلول ها عمومی ترین تکنیکی است که استفاده می شود . اگر چه اخیرا نیروهای بیوفیزیکی، مانند استرس لرزش و بی وزنی برای تکثیر سلول ها بسیار استفاده شده است. در میان نیروهای بیوفیزیکی، بی وزنی بخصوص در زمینه مهندسی بافت بسیار مورد توجه است. نشان داده شده که بی وزنی محیط ایده آل برای رشد سلول، تکثیر سلول و تشکیل اندام است . قرار گرفتن در شرایط بی وزنی باعث برداشته شدن فشار از روی بافت های استخوانی و نیز سایر بافت هایی که تحت فشار هستند می شود این مسئله باعث تضعیف شدن این بافت ها می شود. بافت های پیوندی نیز یکی از مهمترین این بافت ها هستند . یکی از اصلی ترین سلول هایی که در تشکیل بافت های پیوندی و تشکیل کلاژن و الاستین شرکت دارند فیبروبلاست ها هستند. یک مطالعه بر روی سلول های فیبروبلاست نشان داده است که هایپرگراویتی باعث کاهش بیان کلاژن و میکروگراویتی باعث افزایش بیان کلاژن در این سلول ها می شود(۵-۱۰).

در این تحقیق سلول های بنیادی مشتق از چربی در شرایط شبیه سازی شده بی وزنی کشت داده میشوند و بیان ماتریکس متالوپروتئینازها در این سلول ها به روش Real time PCR بررسی می شود.

ماتریکس متالوپروتئیناز ها (MMPs) گروه بزرگی از آنزیم های پروتئولیتیک هستند که مسوول تجزیه ماتریکس خارج سلولی اند و فعالیت آنها تحت شرایط فیزیولوژیکی مثل ترمیم زخم و رگ زایی و ... مهم و ضروری اما موقت و زودگذر است و با مهارکننده های درون زا کنترل می شود. اما، در فرایندهای پاتولوژیکی مثل انواع بیماری ها، همین

طور پس از فشارآفرین های فیزیکی و مکانیکی، بیان و فعالیت این نوع آنزیم های پروتئولیز به واسطه ترشح سیتوکین های پیش التهابی افزایش می یابد و باعث تجزیه انواع کلاژن ها و ژلاتین ها و به هم خوردن ساختار میکروآناتومی و بافتی بدن می شود که نتیجه آن تشدید التهاب و بروز بیماری های مختلفی مثل ضایعات قلبی، تخریب دیواره عروقی، تسریع گسترش سلول های سرطانی، استئوآرتریت و ... در طول زمان است. متالوپروتئیناز، آنزیم های وابسته به کلسیم و روی هستند و در ترمیم زخم نقش اساسی دارند. فیبروبلاست ها منبع اصلی تولید این آنزیم ها در پوست هستند. به طور کلی ماتریکس خارج سلولی در حفظ یکپارچگی و تمامیت بافت ها نقش مهمی دارد و به همراه اسکلت سلولی در هدایت و انتقال پیام بین سلول ها و در نتیجه تنظیم فعالیت سلول و بافت و هموستازی بدن نقش مهمی دارد. نیروی جاذبه بر روی اسکلت سلولی و ماتریکس خارج سلولی نیز تاثیرگذار است و مطالعه تغییرات آن در شرایط بی وزنی می تواند اطلاعات با ارزشی را در زمینه چگونگی سازگاری آن به بی وزنی و همچنین استفاده از بی وزنی برای کاربردهای زمینی در اختیار ما قرار دهد.

## فصل دوم

### پیشینه پژوهش

تا کنون در شرایط بی وزنی هیچ مطالعه ای به بررسی ماتریکس متالوپروتئینازها در سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی جهت استفاده برای تمایز به سلول های پوست انجام نشده است. تمامی مطالعاتی که تا به امروز صورت گرفته در شرایط نرمال و جاذبه ۱g بوده است که می توان به مواردی که در ادامه می آید اشاره کرد. البته دو مطالعه محدود بر روی سلول های فیبروبلاست در شرایط بی وزنی صورت گرفته که به بررسی بیان کلاژن و ماتریکس متالوپروتئیناز ۱ در شرایط بی وزنی پرداخته است.

اولریخ و همکارانش در سال ۱۹۹۵ در یک مطالعه که بر روی سلول های فیبروبلاست انجام شد نشان دادند که هایپرگراویتی باعث کاهش بیان ژن کلاژن و میکروگراویتی باعث افزایش بیان ژن کلاژن در این سلول ها می شود. از آنجا که کلاژن در بازسازی پوست بسیار مهم است می توان تاثیر بی وزنی بر تولید بافت های پوستی به منظور پیوند پوست و ترمیم زخم را بررسی نمود (۱۱).

جین و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که بی وزنی باعث افزایش بیان ماتریکس متالوپروتئیناز ۳ و آپوپتوز در سلول های دیسک مهره ای در موش می شود آنها دیسک مهره ای را در شرایط بی وزنی با استفاده از دستگاه بیوراکتور قرار دادند و مشاهده کردند که بی وزنی منجر به دژنره شدن دیسک مهره ای از طریق افزایش آپوپتوز و افزایش بیان ماتریکس متالوپروتئیناز ۳ می گردد (۱۲). همچنین برخی دیگر از مطالعات نیز حاکی از القای بیان ماتریکس متالوپروتئینازها در شرایط بی وزنی است (۱۳-۱۵).

ژانگ و همکاران در سال ۲۰۱۳ در مطالعه ای که بر روی رده ی سلولی سرطان ادنوکارسینومای ریه انجام دادند مشاهده کردند که بی وزنی منجر به کاهش خواص متاستازی این سلول ها می شود. آنها بیان کردند که در شرایط بی وزنی بیان ژن ماتریکس متالوپروتئیناز ۲ در این سلول ها کاهش می یابد و از بی وزنی می توان برای مطالعه روند پیشرفت سلول های سرطانی و ارائه راه حل هایی برای درمان آن استفاده نمود (۱۶).

ژیکسانگ تونگ و همکاران در سال ۲۰۱۰ در مقاله ای تحت عنوان *Controlling the Fibroblastic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Via the Combination of Fibrous Scaffold*

and Connective Tissue Growth Factor، کنترل شرایط تمایز فیبروبلاست مشتق شده از سلول های بنیادی در حین ترکیب داربست فیبروزی و فاکتور های رشد بافت پیوندی را بررسی کردند. هدف از این مطالعه تعیین پارامترهای تجربی است که برای کنترل تمایز فیبروبلاستی اولیه از سلولهای ADSc در شرایط *in vitro* میتواند مورد استفاده قرار گیرد. برای این منظور، فاکتور رشد بافت همبند (CTGF) و میکرو ساختار آن، داربست فیبری بر پایه (glycerol sebacate (PGS) و poly (caprolactone) (PCL) برای ایجاد یک میکرو محیط سه بعدی، مانند بافت همبند استفاده شد MSC.ها به آسانی در امتداد میکرو فیبرها متصل شدند، بر اساس شکل دوکی مانند در طول 3روز اولیه در یک محیط ابتدایی کشت در محیط کشت ابتدایی MSC. سپس داربست سلول انباشته شده در یک محیط مشروط شامل CTGF و اسیدهای اسکوربیک تا 21روز کشت شدند. شکل سلولی، تکثیر و تمایز با تجزیه و تحلیل PCR کمی، و روش های بیوشیمیایی و ایمونوسیتوشیمی آنالیز شد. رنگ آمیزی F-اکتین نشان داد که سلول های MSC فرم فیبروبلاست خود را در طول 3هفته در محیط کشت حفظ کرده اند. علاوه بر این تغییرات در این موارد هم مشاهده شد: افزایش تقسیم سلولی، بالا رفتن بیان fibroblast-specific protein-1، و تکثیر سلولی و کاهش بیان اپی توپهای سطحی مزانشیمی بدون تغییر قابل توجه سلول ها در حرکت به سمت استخوان، adipogenesis، و آپوپتوز. در سطح mRNA، CTGF منجر به بیان کاهش کلاژن I و مهار کننده بافت metalloproteinase، اما افزایش بیان decorin و سنتز اسید هیالورونیک 3 شد. در سطح پروتئین، تولید کلاژن I، کلاژن III، گلیکوزآمینوگلیکان سولفات و الاستین در محیط PGSPCL نسبت به محیط طبیعی بیشتر بود. این یافته ها در مجموع نشان می دهد که تارهای فیبروس همراه با عوامل لازم بیوشیمیایی می تواند محیطی مناسب برای تمایز MSC fibroblastic در *in vitro* باشد (17).

Rong و همکارانش در سال 2014 سلولهای فیبروبلاست مانند تمایز یافته از سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی (ADSCs) را برای ترمیم آسیب تار صوتی حاد سگ (canine) استفاده کردند. پس از آن تغییر در پروتئین های ماتریکس خارج سلولی (ECM) لامینای صوتی را توصیف کردند. برای این منظور، ADSCs ها را برای تمایز به سلولهای فیبروبلاست تحت تنظیم فاکتورهای رشد بافت همبند در *in vitro* القاء کردند و پروتئین

های سطح سلولی را بوسیله رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس شناسایی شدند. نتایج نشان داد که در شرایط آزمایشگاهی، dADSCs مورفولوژی و بیان پروتئین سطحی سلول شبیه به VFFs را نشان می دهد. بعد از جایگزینی در داخل بدن، سطح تارهای صوتی دریافت شده در dADSCs و ADSCها در طی ۶ ماه صاف شد اما در گروه VFFs کمی مقعر و سفت باقی ماند. شدت فلورسانس الاستین بطور قابل توجهی افزایش یافته و در گروه dADSCs در سطح بالا حفظ شده بود(۳).

Moioli و همکارانش در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که فاکتور رشد بافت همبند (CTGF)، همچنین به عنوان CCN2 شناخته شده) برای القاء سلول های مزانشیمی/ استرومال مغز استخوان انسان (MSC)ها برای تمایز به فیبروبلاست ها کافی است. CTGF، سلول های MSC را برای از دست دادن اپی توپ مزانشیمی سطح خود، بیان مارکرهای های وسیع فیبروبلاست، و سنتز فزاینده کلاژن نوع I و C-tenacin تحریک می کند. پس از سوق به سمت فیبروبلاست، توانایی سلول های بنیادی به تمایز به رده های سلولی غیر فیبروبلاستی - از جمله استئوبلاست ها، کندروسیت ها، و سلول های چربی - کاهش می یابد. سلول های بنیادی تیمار شده با CTGF،  $\alpha$ -SMA، منفی بودند که زمانی که تنها پس از سوق به سمت فیبروبلاست و فیبروزنیز با  $TGF-\beta 1$  تحریک شدند. در موش، تحویل microencapsulated های CTGF تشکیل بافت همبند پس از ایجاد fibrogenesis نسبت به ectopic mineralization را سریعتر می کند. دانستن اینکه سلولهای فیبروبلاست دارای منشا مزانشیمی هستند ممکن است درک از فیروز اندام، سرطان استروما، ectopic mineralization، زخم، و بازسازی بالا ببرد(۴).

Moioli و همکارانش در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که فاکتور رشد بافت همبند (CTGF)، همچنین به عنوان CCN2 شناخته شده) برای القاء سلول های مزانشیمی/ استرومال مغز استخوان انسان (MSC)ها برای تمایز به فیبروبلاست ها کافی است. CTGF، سلول های MSC را برای از دست دادن اپی توپ مزانشیمی سطح خود، بیان مارکرهای های وسیع فیبروبلاست، و سنتز فزاینده کلاژن نوع I و C-tenacin تحریک می کند. پس از سوق به سمت فیبروبلاست، توانایی سلول های بنیادی به تمایز به رده های سلولی غیر فیبروبلاستی - از جمله استئوبلاست



ها، کندروسیت ها، و سلول های چربی - کاهش می یابد. سلول های بنیادی تیمار شده با CTGF ،  $\alpha$ -SMA ، منفی بودند که زمانی که تنها پس از سوق به سمت فیبروبلاست و فیبروژنز با  $TGF-\beta 1$  تحریک شدند. در موش، تحویل microencapsulated های CTGF تشکیل بافت همبند پس از ایجاد fibrogenesis نسبت به ectopic mineralization را سریعتر می کند. دانستن اینکه سلولهای فیبروبلاست دارای منشا مزانشیمی هستند ممکن است درک از فیروز اندام، سرطان استروما ، ectopic mineralization ، زخم، و بازسازیلا ببرد(۴).

در مطالعه ای که سال ۲۰۰۷ در آمریکا در ۱۵۱ بیمار مبتلا به ضایعات ناشی از جوش های جوانی (آکنه)، تورفتگی کنار لب و بینی، خطوط پیشانی، کنار چشمی و تورفتگی های زیر چشمی انجام شده نشان می دهد که سه بار تزریق بیست میلیون سلول های فیبروبلاست در عرض دو هفته بطور قابل توجهی بعد از گذشت ۶ ماه در هشتاد درصد بیماران موجب ترمیم ضایعات پوستی می گردد (۱۸).

در مطالعه ی دیگری که در سال ۱۹۹۹ در ۱۰ بیمار مبتلا به ضایعات پوستی صورت گرفته، نتایج مشابهی بدست آمده است و نتایج نشان می دهد که تزریق سلول های فیبروبلاست خودی بدون داشتن عارضه ای می تواند به طور مناسبی ضایعات پوستی را ترمیم کند. Frerich و همکارانش نشان داده اند که هم کشتی سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی و سلول های عروقی مشتق از سیاه رگ بند ناف انسانی می تواند منجر به تشکیل عروق در ظرف کشت گردد. مدل سه بعدی این روش توسط Kang و همکارانش توسعه یافت و نشان داده شده که تنها دو هفته بعد از هم کشتی عروق می توانند در داربست فیبرینی رشد یابند (۱۹).

در مقاله ای که توسط Valérie Planat و همکارانش در سال ۲۰۱۴ منتشر شد ، نشان داده شد که رده سلولی چربی پتانسیل تمایز به فنوتیپ سلول های اندوتلیال را دارد و در تشکیل عروق خونی در *in vivo* شرکت می کنند (۲۰).

# فصل سوم

## اهداف پژوهش

Archive of SID

## اهداف و فرضیات

### هدف اصلی:

بررسی اثر بی وزنی بر بیان ماتریکس متالوپروتئینازها در سلولهای بنیادی مشتق از چربی

(Adipose derived stem cells)

### اهداف ویژه:

1- بررسی اثر شرایط بی وزنی بر روی رشد سلولهای بنیادی چربی

2- بررسی اثر بی وزنی بر بیان ژنهای ماتریکس متالوپروتئیناز در سلولهای بنیادی بافت چربی

### هدف کاربردی:

هدف از این طرح پژوهشی توسعه سلول درمانی و مهندسی بافت با استفاده از شرایط شبیه سازی بی وزنی بر روی زمین برای ترمیم بافت پوست و زخم در ضایعات پوستی می باشد.

### سوالات یا فرضیات پژوهشی:

1- بی وزنی منجر به تغییر بیان ژنها می گردد.

2- شبیه سازی بی وزنی بر رشد سلولهای بنیادی چربی تاثیر گذار است.

3- شبیه سازی بی وزنی بیان ماتریکس متالوپروتئینازهای سلولهای بنیادی مشتق از چربی را تغییر می دهد.

# فصل چهارم

## روش پژوهش

## نوع مطالعه:

نوع این مطالعه مطالعه، مورد شاهدی (Case Control Studies) و مطالعه تجربی (Experimental Studies) می باشد.

## مکان و زمان مطالعه:

این مطالعه در سال ۱۳۹۴-۱۳۹۵ در گروه ترمیم نوری جهاد دانشگاهی علوم پزشکی تهران و گروه فیزیولوژی هوافضایی پژوهشگاه هوا فضا انجام گردید.

## جامعه مورد بررسی:

از افرادی که جهت انجام عمل های زیبایی به کلینیک پوست و زیبایی مراجعه کرده بودند یک نفر به صورت تصادفی انتخاب گردید.

## ملاحظات اخلاقی:

با توجه به نمونه گیری (۲۰ سی سی چربی) از فرد مراجعه کننده ، ابتدا توسط پژوهشگر توضیحات لازم در خصوص اهداف تحقیقاتی ارائه شد و پس از اخذ رضایت نامه کتبی نمونه گیری صورت گرفت. کد اخلاق IR.ACECR.ROYAN.REC.1395.54 بود.

## روش اجرای طرح:

### ۱- استخراج سلول های آدیپوز:

بافت چربی از بیمارانی که تحت عمل لیپوساکشن قرار می گیرند و با رضایت بیمار مورد استفاده قرار گرفت.

### ۲- جداسازی سلول های ADSC:

برای جداسازی سلول های بنیادی مشتق از چربی از روش هضم آنزیمی با کلاژناز استفاده شد. به طور خلاصه بعد از عمل لیپوساکشن بافت چربی تحت شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل شد، سپس زیر هود لامینار و برای حذف سلول های خونی و دبری ها چند بار با PBS شستشو داده شد بعد با استفاده از آنزیم کلاژناز بافت چربی لیز شده و بعد از سانتریفیوژ روغن و محلول رویی دور ریخته شد و رسوب باقی مانده در محیط DMEM کشت داده شد.

### 3- تایید بنیادی بودن سلول ها از لحاظ عملکردی:

برای اثبات این مسئله، ابتدا تمایز به رده های آدیپوژنیک و استئوژنیک انجام شد. برای این منظور از سلول های بنیادی مزانشیمی در پاساژ ۴ استفاده شد. روش کار بدین صورت بود که بعد از رسیدن سلول ها به تراکم ۵۰ درصد برای تمایز به استخوان و ۱۰۰٪ برای تمایز به چربی، محیط کشت القا کننده تمایز اضافه می شد. محیط کشت القا کننده آدیپوژنیک برای مدت ۱۴ روز و محیط کشت القا کننده استئوژنیک برای مدت ۲۱ روز به سلول های مورد آزمایش اضافه می شد. محیط کشت هر دو گروه هر ۳ یا ۴ روز تعویض شد. برای تمایز آدیپوژنیک از محیط کشت DMEM، ۱۰ درصد FBS و کیت تایید سلول های بنیادی مزانشیمی شرکت R&D System جهت تمایز به سلول های چربی استفاده شد. برای تمایز استئوژنیک از محیط کشت DMEM، ۱۰ درصد FBS و کیت تایید سلول های بنیادی مزانشیمی شرکت R&D System جهت تمایز به سلول های استخوانی استفاده شد.

#### ۴- تایید مارکرهای سطحی سلول های بنیادی مزانشیمی:

به منظور تایید سلول مزانشیمی بنیادی بودن، بیان مارکرهای CD اختصاصی مزانشیمی و عدم بیان شاخص های سلول های خونی و عروقی به روش فلوسایتومتری نیز در سلول های استخراج شده انجام شد. سلول های مورد نظر در پاساژ سوم بعد از جداسازی از فلاسک و شستشو با PBS در PBS معلق شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه با آنتی بادی های کانجوگه CD90-PE, CD105-FITC, CD73-PE به عنوان مارکرهای مثبت و آنتی بادی های CD34-PE, CD46-FITC به عنوان مارکرهای منفی انکوبه شدند. سپس آنالیز فلوسایتومتری توسط دستگاه Cyflow Space (Partec) انجام شد. داده های حاصل با نرم افزار FloMax software (version 2.70) آنالیز گردید.

#### ۵- کشت سلول های ADSC در شرایط طبیعی و بی وزنی:

برای کشت سلول ها در شرایط شبیه سازی بی وزنی از دستگاه clinostat استفاده می شود. نمونه ها شامل سلول های کنترل (۱G یا بدون بی وزنی) و نمونه های بی وزنی بودند که برای مدت ۱، ۲ و ۳ روز در شرایط بی وزنی قرار گرفتند. میزان بی وزنی ۰/۰۱G بود. برای ایجاد بی وزنی از دستگاه کلینواستت یک محوره در پژوهشگاه هوافضا که از سازمان ملل گرفته شده بود؛ استفاده شد.

۵-۱: روش ایجاد بی وزنی:

مراحل ایجاد بی وزنی به شرح زیر بود:

- استریل کردن دستگاه کلینواستت توسط نور ماوراءبنفش و الکل ۷۰ درصد
- قرار دادن کلینواستت در داخل انکوباتور کشت سلولی
- تراز کردن کلینواستت و محور آن در داخل انکوباتور

- تنظیم کردن دور دستگاه کلینواستت بر روی ۳۰rpm
- پاساژ سلول ها و انتقال آنها به پلیت ۹۶ خانه
- پر کردن خانه های حاوی سلول در پلیت ۹۶ خانه از محیط کشت دارای ۱۰ درصد سرم (این امر برای جلوگیری از ایجاد نیروهای ناخواسته به هنگام چرخش پلیت بر روی دستگاه شبیه سازی بی وزنی بود)
- چسباندن پلیت بر روی صفحه کلینواستت توسط چسب دوطرفه (پلیت باید به گونه ای بر روی صفحه کلینواستت قرار گیرد که خانه های حاوی سلول در مرکز صفحه قرار گیرد تا میزان جی وارده بر سلول ها ۰/۰۱ باشد)

#### ۶- استخراج RNA :

از نظر شیمیایی مولکول RNA فعالتر از DNA می باشد و توسط آنزیم RNase به سرعت شکسته می شود. آنزیم RNase به هنگام پاره شدن سلولها، از آنها خارج می گردد و روی سطح پوست هم وجود دارد، بنابراین کار با RNA بسیار حساس تر از کار با DNA بوده و کلیه مواد و وسایل مورد استفاده به هنگام استخراج RNA باید عاری از RNase باشند. بدین منظور، میکرولوله ها (ویال) و تیپ هایی که برای استخراج RNA و در مرحله بعد، جهت انجام واکنش RT-PCR و سنتز cDNA استفاده می شدند، در صورتی که به هنگام خرید عاری از RNase نبودند؛ در محلول DEPC ۰/۱۱ در صد به مدت یک ساعت در  $37^{\circ}\text{C}$  و یا یک شب در دمای اتاق تیمار گردیدند و سپس ۲۰ دقیقه در فشار ۱۵ psi اتوکلاو شدند. ظروف شیشه ای نیز به مدت ۲ ساعت در آون با دمای  $200^{\circ}\text{C}$  قرار گرفتند. باید توجه داشت که DEPC ماده ای سمی و کارسینوژن است، بنابراین در هنگام کار جلوگیری از تماس مستقیم آن با پوست و پوشیدن دستکش ضروری است.

۶-۱: مواد و وسایل لازم جهت استخراج RNA:

نمونه مورد نظر

کیت استخراج Takara (به شماره ۳۷۳۲)

<sup>1</sup> - Di Ethyl Pyro Carbonate



میکروتیوب تیمارشده با DEPC

سرسپلر آبی، زرد و کریستالی تیمارشده با DEPC

### ۶-۲: مراحل استخراج RNA از سلول

مراحل استخراج RNA از سلول ها مطابق با دستورالعمل کیت و به شرح زیر انجام شد:

۱. خارج کردن محیط کشت از روی سلول ها
  ۲. اضافه کردن ۱۲۵ میکرولیتر بافر شستشوی ۲ کیت
  ۳. حذف کردن بافر شستشو
  ۴. اضافه کردن ۴۹ میکرولیتر بافر پروسس کننده ۳
  ۵. اضافه کردن ۱ میکرولیتر آنزیم DNase
  ۶. قرار دادن نمونه ها در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه
  ۷. انتقال نمونه ها به میکروتیوب عاری از RNase و انکوباسیون میکروتیوب ها برای مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد
  ۸. انتقال میکروتیوب ها به فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد تا زمان ساخت cDNA
- نکته: ۲ میکرولیتر از لیز سلولی در واکنش ساخت cDNA مورد استفاده قرار می گرفت.

### ۶-۳: بررسی صحت RNA استخراج شده

پس از استخراج RNA، برای اطمینان از صحت استخراج باید cDNA ساخته شده و PCR برای ژن کنترل داخلی گذاشته شود. در صورت داشتن محصول PCR ژن کنترل داخلی، RNA استخراج شده سلامت می باشد.

<sup>2</sup>- Washing buffer  
<sup>3</sup>- Processing buffer

#### ۷- ساخت cDNA و واکنش رونویسی معکوس (RT):<sup>۴</sup>

برای تبدیل RNA به cDNA نیاز به پرایمری است که با mRNA هیبرید شود و توسط آنزیم DNA پلیمراز وابسته به RNA دنباله آن ساخته شود. پرایمری که برای سنتز اولین رشته cDNA استفاده می شود، می تواند به طور اختصاصی طراحی شود تا به یک ژن خاص هیبرید شود و یا اینکه عمومی باشد و به همه mRNA ها متصل شود. در این تحقیق، از هر دو نوع پرایمر عمومی یعنی 18 oligo(dt) و هگزامر تصادفی<sup>۵</sup> استفاده شد.

#### ۷-۱: مواد و وسایل مورد نیاز

از کیت سنتز cDNA تاکارا به شماره RR037A استفاده شد که دارای مواد زیر بود:

- بافر تکثیر 5X (5X Prime Script)، ۲ μl
- آنزیم رونوشت بردار معکوس 6 (RT)، ۰/۵ μl
- پرایمر هگزامر تصادفی (50 pmol)، ۰/۵ μl
- پرایمر الیگو dT (25 pmol)، ۰/۵ μl
- RNA کل، ۲۰ μl
- آب استریل عاری از RNase، ۵ μl

#### ۷-۲: روش کار

غلظتی از RNA کل که برای سنتز رشته اول cDNA استفاده می شود می تواند از ۰/۱ تا ۵ میکروگرم متغیر باشد. در این پژوهش ۲ میکرولیتر از RNA کل استخراج شده توسط کیت استخراج تاکارا (مطابق پیشنهاد کیت تاکارا) جهت سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت.

۱. در یک ویال استریل، مقدار ۲ میکرولیتر از RNA کل استخراج شده به همراه ۰/۵ μl از پرایمر الیگو dT و ۰/۵ پرایمر هگزامر تصادفی ریخته شد.

4 - Reverse transcription  
5 - Random hexamer  
6 - Reverse transcriptase

۲. سپس مواد زیر به هر میکروتیوب اضافه شد.

- بافر ۵X همراه آنزیم ۲  $\mu$ l

- آنزیم رونوشت معکوس ۰/۵  $\mu$ l

- آب RNase Free به میزان ۵  $\mu$ l

۳. مخلوط واکنش به مدت ۱۵ دقیقه در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  انکوبه شد.

۴. سپس ویال ها در دمای  $85^{\circ}\text{C}$  درجه سانتیگراد به مدت ۵ ثانیه، به منظور غیر فعال کردن آنزیم Reverse Transcriptase انکوبه شدند.

۵. محصول واکنش تا زمان استفاده در واکنش PCR، در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شد.

همیشه هنگام ساخت cDNA دو ویال کنترل منفی نیز گذاشته می شد. در یکی از ویال ها تمامی اجزای واکنش ریخته می شد به استثنای RNA، تا آلودگی احتمالی بوجود آمده در حین کار یا آلودگی موجود در مواد به کار رفته مشخص شود. در ویال دوم نیز تمامی اجزای واکنش به جز آنزیم RT اضافه می شد تا آلودگی احتمالی با DNA ژنومی خود را نشان دهد. هر دوی این کنترل ها وارد مرحله PCR می شدند.

#### ۸- واکنش زنجیره ای پلیمرز<sup>۷</sup> (PCR):

پس از انجام واکنش رونویسی معکوس، به منظور تکثیر قطعه مورد نظر واکنش PCR روی محصول RT انجام گرفت. برای انجام واکنش PCR از کیت شرکت پارس طوس استفاده شد.

۸-۱: مواد و وسایل مورد نیاز برای واکنش PCR

- مخلوط مواد واکنش<sup>۸</sup> ۲X

- پرایمرهای بالا دست<sup>۹</sup> و پایین دست<sup>۱۰</sup> (۲۰ pmol) (PRIMM/MWG-Biotech AG)

<sup>7</sup> - Polymerase chain reaction

<sup>8</sup> - 2x Taq primeV

- DNA الگو

- آب تزریقی

- دستگاه ترموسایکلر (BIORAD).

#### ۹- طراحی پرایمر:

در این پژوهش، ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی انتخاب شد. در واکنش RT-PCR تا حد ممکن بایستی پرایمرهای بالادست و پایین دست بر روی اگزون های جداگانه و یا مرز دو اگزون طراحی شوند تا آلودگی احتمالی با DNA ژنومی در محصول واکنش PCR شناسایی شود. همچنین پرایمرها باید به گونه ای باشند تا ژن های کاذب احتمالی هم قادر به تکثیر نباشند. در مورد کلیه پرایمرها، جستجو با نرم افزار Blast با ژنوم انسان انجام شد تا از یکتا بودن محل جفت شدن پرایمرها اطمینان حاصل شود. نتایج جستجو در ژنوم، نشان داد که کلیه پرایمرها دارای محل باند شدن منحصر بفردی می باشند و به طور اختصاصی به ژن های هدف متصل می شوند. به منظور اطمینان بیشتر از مناسب بودن پرایمرها از جهت درصد GC، دمای Tm و نداشتن دایمر با یکدیگر، کلیه پرایمرها با برنامه Gene Runner، Oligo و وب سایت IDT بررسی شدند. در ضمن برای ژن GAPDH که به عنوان ژن کنترل داخلی<sup>۱۱</sup> انتخاب شد نیز پرایمرهایی طراحی شد. کلیه پرایمرها پس از طراحی، جهت سنتز به شرکت پیشگام سفارش داده شدند و توسط شرکت Oligo کره سنتز شدند.

#### ۱۰- آماده سازی پرایمرهای PCR:

پرایمرها پس از ساخته شدن به صورت لیوفیلیزه دریافت شدند. پودر پرایمر در مقدار معینی آب استریل که توسط شرکت سازنده توصیه شده بود حل شد تا غلظت ۱۰۰ پیکو مول (pmol) از آن به دست آید و به دمای ۸۰°C منتقل شد. یک نمونه از آن نیز با غلظت ۲۰ pmol به عنوان محلول کاری ۱۲ تهیه شد و در فریزر ۲۰°C نگهداری شد.

<sup>9</sup> - Forward

<sup>10</sup> - Reverse

<sup>11</sup> - Endogenous control

<sup>12</sup> - Work solution

**۱-۱۰: روش انجام واکنش PCR**

۱. در یک ویال استریل ۰/۲۵ میلی لیتری، مواد زیر به ترتیب اضافه گردید :

نوع ماده	مقدار
- مخلوط مواد واکنش <sup>۱۳</sup> ۲X	۱۰ میکرولیتر
- پرایمر بالا دست	۱ میکرولیتر
- پرایمر پایین دست	۱ میکرولیتر
- DNA الگو	۱ میکرولیتر
- آب تزریقی	۷ میکرولیتر

۲. ویال در دستگاه ترموسایکلر گذاشته شد و برنامه زیر اجرا شد:

- واسرشتگی <sup>۱۴</sup> اولیه (جدایی دو رشته DNA) ۹۴°C	۴ دقیقه
- واسرشتگی هر چرخه	۹۴°C ۳۰ ثانیه
- اتصال پرایمر <sup>۱۵</sup> ۶۰ °C	۴۰ ثانیه
- امتداد <sup>۱۶</sup> و ساخت رشته جدید در هر چرخه	۶۸°C ۳۵ ثانیه
- امتداد نهایی <sup>۱۷</sup> ۷۲°C	۵ دقیقه

۳. تعداد سیکل های اجرا شده ۳۵ سیکل بود.

<sup>13</sup> - 2x Taq primeV  
<sup>14</sup> - Initial denaturation  
<sup>15</sup> - Annealing  
<sup>16</sup> - Extention  
<sup>17</sup> - Final extention

پس از اتمام واکنش، ۷ میکرولیتر از محصول PCR برای بررسی بیان ژن، توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد برسیگرید و بقیه محصول PCR در دمای ۲۰°C- نگهداری شد.

#### ۱۱- روش Real-time PCR :

اساس این روش تعیین غلظت RNA براساس اندازگیری نور فلورسنت ساطع شده در مراحل متوالی PCR می باشد؛ که توسط دستگاه صورت می گیرد. رنگ فلورسنت استفاده شده در این مرحله هم می تواند اتیدیوم برماید (EtBr) باشد و هم رنگ اختصاصی اتصال یابنده به DNA ۲ رشته ای SYBR Green. مشکل استفاده از اتیدیوم برماید، آلودگی های محیطی ناشی از مراحل دفع آن؛ جهش زا بودن برای محقق و ایجاد جهش در نمونه های در حاصل تکثیر می باشد که اگر محصول PCR برای توالی یابی فرستاده شود، مشکل ایجاد می شود؛ و دیگر نمی توان به طور کامل مطمئن بود جهشی که در مرحله توالی یابی دیده شده در طی مراحل PCR ایجاد شده است یا در ژن سلول های بیان کننده RNA مورد اتفاق افتاده است. ویژگی رنگ SYBR Green اتصال آن به DNA ۲ رشته ای می باشد. با پیشرفت مراحل PCR، میزان محصول ۲ رشته ای بیشتر شده، SYBR بیشتری به محصول متصل شده و نور فلورسنت بیشتری ساطع می شود. سیکلی که در آن میزان نور فلورسنت ساطع شده ۲ برابر سیکل قبلی اش باشد به عنوان Cross point یا Cycle threshold (Ct) شناخته می شود. اشکال این رنگ این است که با اختصاصیت محصول ارتباطی ندارد.

نکته مهمی که برای کار با دستگاه های Real-Time PCR باید در نظر گرفت روش تعیین تعداد الگوهای ژن مورد بررسی است، که به طور کل به ۲ روش تقسیم می شود.

روش مطلق<sup>۱۸</sup>:

در این روش ابتدا cDNA دو رشته ای را ساخته و سپس با تطبیق بر منحنی های استاندارد میزان ژن اولیه محاسبه می شود.

<sup>18</sup> - Absolute

روش نسبی<sup>۱۹</sup>:

در این روش نیاز به کلون کردن نیست بلکه از یک ژن خانه دار که در تمام سلولها بیان می شود و بیان آن وابسته به نوع بافت می باشد به عنوان ژن Reference استفاده کرده و سپس ژن هدف را به طور نسبی با در نظر گرفتن ژن خانه دار موجود در همان نمونه اندازه گیری و مقایسه می کنند.

#### ۱-۱۱: محاسبه $T_m$ محصول توسط دستگاه:

در قسمت قبل به این نکته اشاره شد که رنگ SYBR Green به طور غیراختصاصی به DNA دو رشته ای متصل می شود که برای آن ایراد محسوب می شود. برای تایید صحت محصول PCR که آیا این افزایش فلورسنت بخاطر افزایش محصول اختصاصی می باشد یا نه، در دستگاه های Real-time PCR بخشی قرار داده شده است؛ که می توان از آن برای تعیین این اختصاصیت استفاده کرد؛ به این صورت که بر طبق برنامه ای که کاربر به دستگاه می دهد، ابتدا دستگاه به وسیله حرارت تمام محصولات دو رشته ای را باز کرده و سپس محصولات را در دمایی قرار می دهد تا تمام دو رشته ای شدن های ممکن صورت بگیرد. سپس با افزایش تدریجی دما، سختی ۲۰ محیط واکنش را زیاد می کند که این امر باعث باز شدن DNA های ۲ رشته ای و کاهش فلورسنت می شود، حال اگر این کاهش در منطقه دمایی بالای ۸۳-۸۵ درجه سانتیگراد باشد، محصول ما اختصاصی است و اگر در پایین این درجه حرارت باشد غیراختصاصی است و احتمالاً پرایمر دایمر است. این درجه حرارت به طور تجربی و به طور محاسباتی بر طبق در صد نوکلئوتید های G و C و شرایط دستگاه و آزمایش قابل اندازه گیری است؛ چرا که یک محصول قابل قبول در Real-time PCR حدود ۵۰۰-۱۵۰ جفت باز طول باید داشته باشد که دمای باز شدن دو رشته ای آن از یکدیگر در این محدوده دمایی قرار می گیرد.

#### ۱-۲: نحوه بیان ژن و داده های حاصل از Real-Time PCR :

همان طور که گفته شد Cycle threshold در واقع سیکلی از واکنش PCR است که مقدار نور فلورسنت ساطع شده در آن ۲ برابر مرحله قبل باشد. حال هرچه که این Cycle threshold مقدار کمتری داشته باشد بیانگر تعداد بیشتر

<sup>19</sup>-Relative

<sup>20</sup>- Stringency

cDNA الگو در نمونه اولیه می باشد که آن نیز بازتابی از mRNA بیان شده در سلول مورد بررسی می باشد. که می توان میانگین این اعداد بدست آمده را در ۲ گروه نمونه ها مقایسه نمود که بیانگر میزان اختلاف بیان ژن مورد نظر در دو گروه است.

### ۱۱-۳: انجام واکنش Real-time PCR

پس از انجام واکنش رونویسی معکوس، به منظور تکثیر قطعه مورد نظر و ارزیابی کمی بیان ژن ها، بر روی cDNA ساخته شده، واکنش Real-time PCR به روش SYBR Green انجام گرفت.

#### ۱۱-۳-۱: مواد و وسایل لازم

- SYBR Green Master mix (Takara)
- پرایمرهای مخلوط  $10 \text{ pmol}/\mu\text{l}$
- آب استریل
- Rox reference dye II
- cDNA Template
- استریپ های ۸ تایی و cap آن ها
- دستگاه ABI 7500 Real-time PCR

#### ۱۱-۳-۲: مراحل انجام کار

۱. به علت پیچیدگی انجام Real-time PCR و به منظور جلوگیری از بروز هرگونه خطایی، قبل از هر کار، باید ابتدا برنامه انجام کار مشخص باشد و به طور دقیق معین شود که در هر چاهک ۲۱ از چاهک های استریپ های هشت گانه کدام cDNA و کدام پرایمرها قرار است استفاده گردد. پس از تعیین برنامه کار، این برنامه باید با حروف اختصاری دلخواه برای ژن های مورد نظر، در دستگاه ABI 7500 Real-time PCR نیز ثبت گردد تا در نهایت یک طرح از چاهک ها توسط نرم افزار ارائه شود.

۲. اضافه کردن مواد زیر به چاهک ها



SYBR Green Master mix(Ex Tag II)	10 $\mu$ l
Rox reference dye II	0.08 $\mu$ l
Primer mix 10 pmol/ $\mu$ l	1.6 $\mu$ l
Sterile H <sub>2</sub> O	6.32 $\mu$ l
cDNA Template	2 $\mu$ l

نکته ۱: به علت آنکه معمولاً این واکنش‌ها برای چند نمونه به صورت همزمان انجام می‌شود، از این‌رو برای کاهش خطای ناشی از ریختن مواد به صورت جداگانه ۲۲ در هر چاهک، یک Master که حاوی تمامی مواد (به جز cDNA بود)، برای هر گروه از ژن‌ها (هر جفت پرایمر) ساخته می‌شود و به چاهک‌ها اضافه می‌گردید و سپس cDNA مربوط به هر چاهک را نیز به آن می‌افزودیم.

نکته ۲: در بهینه‌سازی پرایمرها به این نتیجه رسیدیم که بهترین حالت مخلوط کردن پرایمرهای هر ژن است. چرا که در مرحله آماده‌سازی Real-time به دلیل بالابودن تعداد ژن‌ها و نمونه‌ها ممکن است استفاده از هر پرایمر به طور جداگانه باعث اشتباه شود. بنابراین ابتدا پرایمرهای F و R به صورت مخلوط تهیه شده و سپس هر کدام در چند تیوب جداگانه به نسبت ۱ به ۱۰ (از طریق افزودن آب استریل) رقیق شدند تا به صورت ۱۰ pmol/ $\mu$ l به کار روند. از این استوک مخلوط هر بار به مقدار لازم برداشته شد و در PCR به کار رفت.

نکته ۳: برای هر نمونه دو بار تکرار<sup>۲۳</sup> در هر سیکل در نظر گرفته می‌شود.

#### تنظیم برنامه زمانی PCR

Polymerase	۹۵ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه
------------	----------------------------

<sup>22</sup> - خطای Sampling -

23 - Duplicate

activation/denaturation	
Denaturation	۹۵ درجه سانتیگراد ۵ ثانیه
Annealing and extension	۶۰ درجه سانتیگراد ۳۴ ثانیه
Number of amplification cycles	۴۰ عدد

## ۱۲-آنالیز آماری داده ها

پس از تعیین Cycle threshold برای هر نمونه با بررسی میزان فلورسانت خوانده شده توسط دستگاه برای هر نمونه، Ct های ژن رفرانس و ژن هدف تعیین شد. میزان بیان ژن با روش کمی و تعیین  $\Delta\Delta CT$  و استفاده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta CT}$  محاسبه گردید. از *GAPDH* بعنوان ژن رفرانس استفاده شد. و سپس داده ها در نرم افزار Graph pad prism و با استفاده از تست T-test (unpair) آنالیز شد و  $p < 0.05$  به عنوان معناداری در نظر گرفته شد و نمودارها به کمک این نرم افزار رسم شد.

## فصل پنجم

### یافته های پژوهش

Archive of SID

## ۱- جدا سازی و کشت سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی:

سلول های بنیادی موجود در بافت چربی در شرایط کاملا استریل از نمونه چربی انسانی که به روش لیپوساکشن از متقاضیان جراحی لیپوساکشن گرفته شده بود و به روشی که در فصل قبل گفته شد؛ استخراج شدند. شکل ۱ مرحله هضم با آنزیم کلاژناز و استخراج سلول های بنیادی از بافت چربی را نشان می دهد.

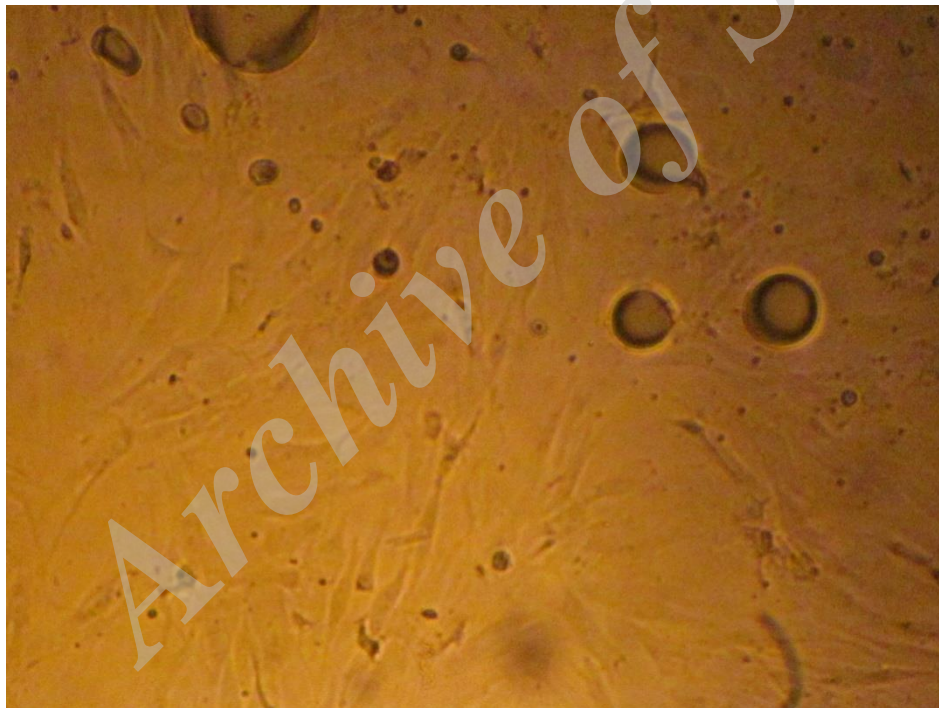


شکل ۱: هضم با آنزیم کلاژناز و استخراج سلول های بنیادی از بافت چربی

## ۲- استخراج سلول های بنیادی از نمونه بافت چربی انسانی:

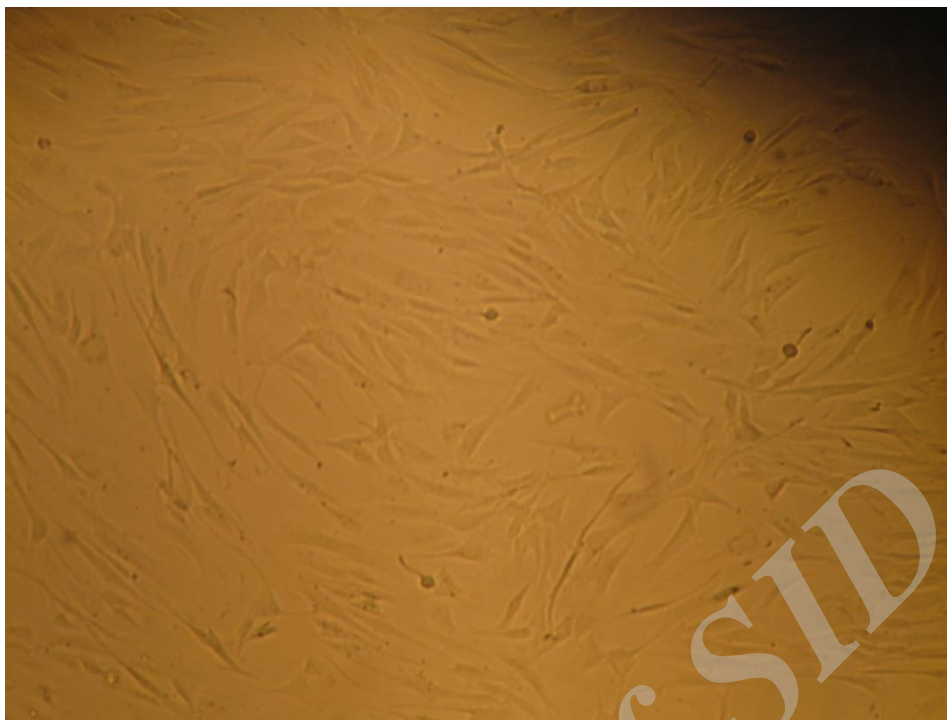
در روز اول و بلافاصله بعد از استخراج، ناخالصی های زیادی همراه با این سلول ها می باشد که شامل جمعیتی از سلول های مختلف از جمله سلول های چربی، سلول های اندوتلیال و .... بودند.

پس از آن که سلول های موجود در نمونه چربی از آن خارج شدند، به داخل فلاسک  $25\text{cm}^2$  ریخته شده و سلول ها در زیر میکروسکوپ مشاهده گردیدند. در روز اول تنها سلول های گرد شناور در محیط کشت به همراه قطرات چربی در داخل محیط کشت قابل مشاهده بودند و مقدار سلول ها بسیار زیاد بود. به دلیل حجم زیاد سلول های مرده، و سلول های چربی و ... در روز بعد محیط کشت ظاهری تقریباً کدر داشت اما به دنبال تعویض محیط کشت سلول ها و شستشو با PBS، عمده این ذرات از فلاسک خارج شدند. با این حال بقایایی از این ذرات و سلول ها تا پاساژ اول نیز باقی ماندند. شکل ۲ سلول ها را در روز اول و بعد از استخراج نشان می دهد.



شکل ۲: سلول های بنیادی جداشده از نمونه چربی انسان در روز اول و بلافاصله بعد از استخراج به همراه سایر سلول های غیر بنیادی و ذرات چربی

بعد از تعویض محیط کشت و حذف سلول های شناور، حال می توانستیم به دنبال سلول های چسبیده به کف فلاسک باشیم و آنها را مشاهده کنیم. معمولاً به دنبال تعویض محیط و کاسته شدن از میزان ناخالصی ها در روز اول، تعداد معدودی سلول با مورفولوژی فیروپلاستی نیز در محیط کشت قابل مشاهده بودند که البته بسیار پراکنده و دور از هم قرار داشتند. از آن جا که سلول ها پس از استخراج، داخل فلاسک های کوچک  $25\text{cm}^2$  ریخته شده بودند در روز سوم پس از استخراج پاساژ داده شدند. در این هنگام ۳ گروه سلولی قابل تشخیص بودند: سلول های دوکی و دراز که جمعیت غالب سلولی را تشکیل می دادند، سلول های پهن و سلول های گرد و کوچک با هسته های بزرگ. البته این وضعیت پایدار نبود به طوری که در پاساژهای بعدی کاهش قابل توجهی در فراوانی سلول هایی با مورفولوژی گرد و دارای هسته های بزرگ و نیز سلول های پهن، رخ داده و صرفاً سلول های دوکی و دراز در محیط باقی می ماندند. رشد سلول ها خوب بود و معمولاً هر یک روز در میان سلول ها نیاز به پاساژ داشتند. به طور کلی پاساژ سلولی باید کمی قبل از این که سلولها ۱۰۰٪ فلاسک را پر کنند انجام می شد چرا که سلول هایی که تحت فشار قرار می گرفتند دیگر دارای رشد خوبی نبودند. سلول های استخراج شده تا بیش از ۱۵ پاساژ در محیط کشت رشد نمودند، بدون این که قدرت تکثیر خود را از دست بدهند. شکل ۳ ظاهر این سلول ها را در پاساژ سوم نشان می دهد. همان گونه که مشاهده می کنید اکثر سلول ها به صورت دوکی شکل کشیده هستند.



شکل ۳: سلول های بنیادی جداشده از نمونه چربی انسانی در پاساژ سوم

از همان پاساژ اول تعدادی از سلول ها فریز شدند و ذوب آن ها پس از چند ماه نشان داد که این سلول ها در طی فرآیند انجماد زنده مانده و قدرت تقسیم خود را از دست نداده اند.

### ۳- اثبات سلول های بنیادی مزانشیمی بافت چربی:

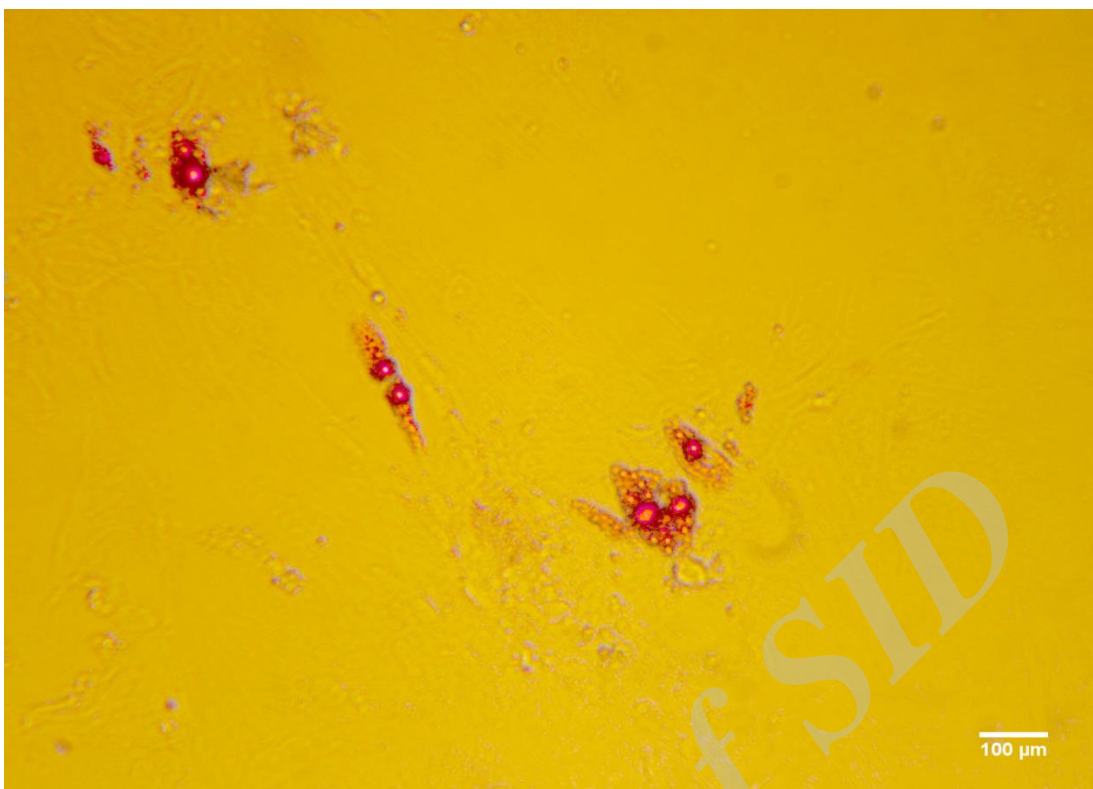
اولین ویژگی سلول های بنیادی مزانشیمی توانایی آنها در چسبیدن به کف ظرف و شکل دوکی مانند می باشد که در اولین مرحله موجب جدا شدن این سلول ها از سلول های غیرچسبنده می شود. در این پژوهش نیز از این ویژگی استفاده شد و سلول های مزانشیمی از سایر سلول ها در پاساژهای متوالی جدا گردید.

#### ۴- تمایز سلول های استخراج شده به سلول های چربی و استخوان :

یکی دیگر از راه های اثبات وضعیت بنیادی در سلول های بنیادی مزانشیمی، تمایز آنها به رده های مزانشیمی چربی و استخوان و غضروف می باشد. برای اثبات این مسئله، دو تمایز آدیپوژنیک و استئوژنیک انجام شد. برای این منظور از سلول های بنیادی مزانشیمی در پاساژ ۴ استفاده شد. روش کار بدین صورت بود که بعد از رسیدن سلول ها به تراکم ۷۰ درصد برای تمایز به استخوان و ۱۰۰ درصد برای تمایز به چربی، محیط کشت القا کننده تمایز اضافه می شد. محیط کشت القا کننده آدیپوژنیک برای مدت ۱۴ روز و محیط کشت القا کننده استئوژنیک برای مدت ۲۱ روز به سلول های مورد آزمایش اضافه می شد که در فصل قبل ترکیب این دو محیط توضیح داده شد.

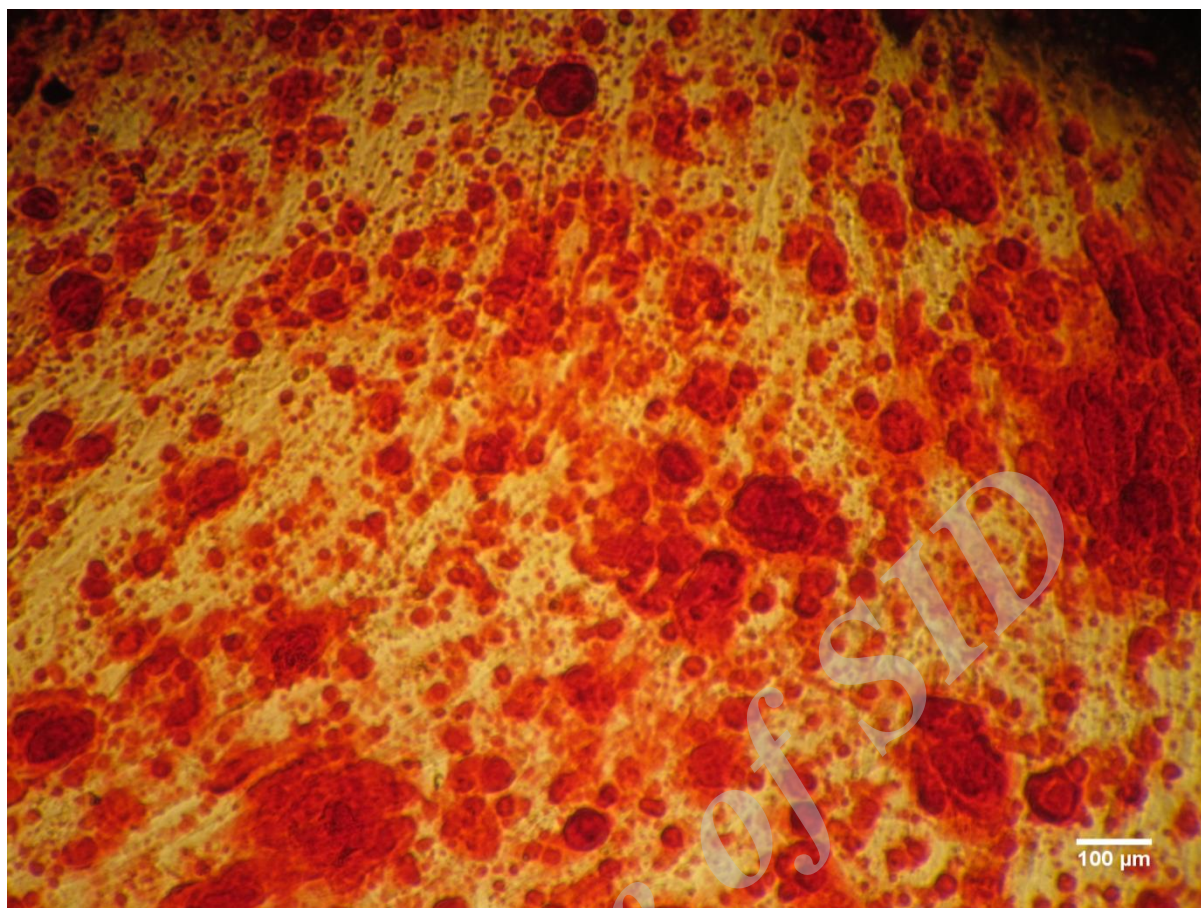
بنابراین پتانسیل تمایزی سلول های بنیادی مزانشیمی با کشت این سلول ها در محیط های آدیپوژنیک و استئوژنیک مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از دو هفته کشت سلول ها در محیط آدیپوژنیک، قطرات چربی در سیتوپلاسم سلول ها ظاهر می شدند. برای مشاهده محتوی تری گلیسیریدی آنها، از رنگ آمیزی Oil red استفاده می شد. شکل ۴ رنگ آمیزی Oil red را در این سلول ها بعد از تمایز آدیپوژنیک نشان می دهد.





شکل ۴: رنگ آمیزی Oil red برای تمایز آدیپوژنیک

در تمایز استئوژنیک، بعد از ۳ هفته سلول ها چند لایه می شدند و در اطراف خود ماتریکس معدنی ترشح می کردند که با رنگ آمیزی Alizarin red به صورت کلونی های استخوانی قابل رویت بودند. شکل ۵ رنگ آمیزی این سلول ها با Alizarin red بعد از تمایز استئوژنیک را نشان می دهد.

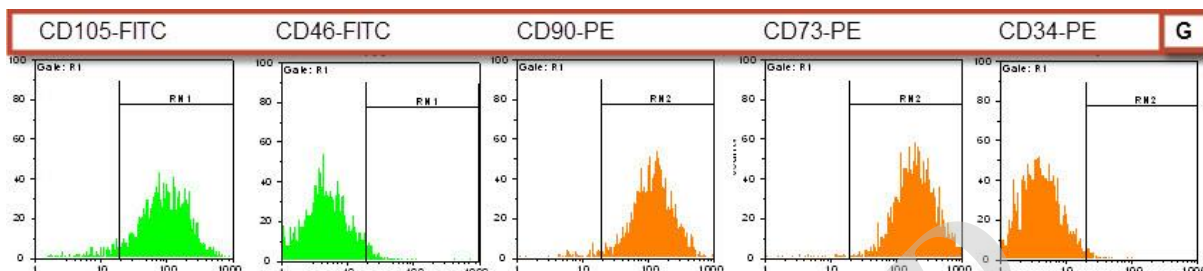


شکل ۵: رنگ آمیزی Alizarin red برای تمایز استئوژنیک

#### ۵- بیان شاخص های سطحی:

سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی (ASCs) همانند سلول های بنیادی مزانشیمی شاخص های سطحی همانند CD10, CD13, CD29, CD34, CD44, CD54, CD71, CD90, CD105, CD106, CD177 را بیان می نمایند. این سلول ها شاخص های مربوط به سلول های خونی مانند CD14, CD16, CD56, CD61, CD62E, CD104, CD133 و CD106 و شاخص های مربوط به سلول های عروقی مانند CD31, CD144 را در سطح خود بیان نمی کنند. به منظور تایید سلول مزانشیمی بنیادی بودن، باید بیان مارکرهای CD اختصاصی نیز در سلول های استخراج شده صورت بگیرد. به این منظور سلول های استخراج شده در پاساژ چهارم جهت تشخیص بیان یا عدم بیان آنتی

بادیهای کانجوگه CD90-PE, CD105-FITC, CD73-PE به عنوان مارکرهای مثبت و آنتی بادی های-CD46, CD34-PE FITC به عنوان مارکرهای منفی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج فلو سایتو متری در شکل ۶ آمده است.



شکل ۶: نتایج فلو سایتو متری مارکرهای مثبت و منفی سلول های بنیادی مزانشیمی

همانطور که در شکل مشاهده می شود میزان بیان مارکرهای مثبت شامل CD90, CD105, CD73 در سلول های استخراج شده بیش از ۹۵ درصد و میزان بیان مارکرهای منفی شامل CD46 و CD34 کمتر از ۵ درصد بوده است.

#### ۶- ایجاد شرایط بی وزنی:

نمونه ها شامل سلول های کنترل (G یا بدون بی وزنی) و نمونه های بی وزنی (اروز، ۲ روز و ۳ روز) بودند. میزان بی وزنی ۰/۰۱G بود. برای ایجاد بی وزنی از دستگاه کلینواستت یک محوره در پژوهشگاه هوافضا که از سازمان ملل گرفته شده بود؛ استفاده شد.

#### ۷- طراحی پرایمر:

درواکنش RT-PCR تا حد ممکن ایستی پرایمرهای بالادست و پایین دست بر روی اگزون های جداگانه ویا مرز دو اگزون طراحی شوند تا آلودگی احتمالی با DNA ژنومی در محصول واکنش PCR شناسایی شود. همچنین پرایمرها باید به گونه ای باشند تا ژن های کاذب احتمالی هم قادر به تکثیر نباشند.

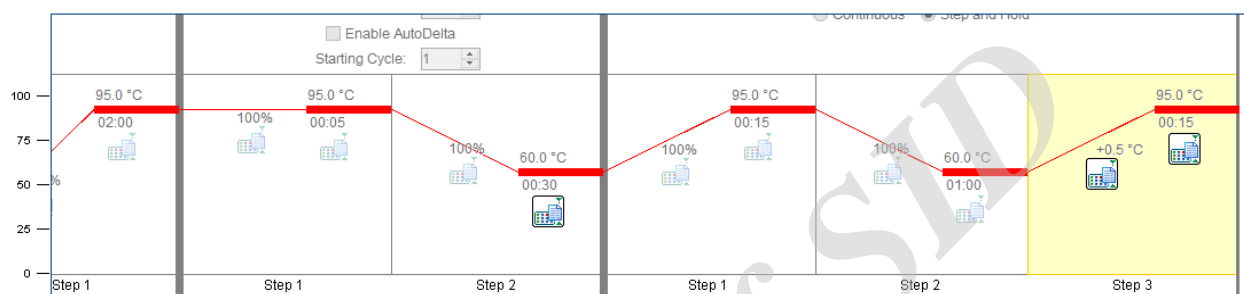
درمورد کلیه پرایمرها، جستجو با نرم افزار Blast با ژنوم انسان انجام شد تا از یکتا بودن محل جفت شدن پرایمرها اطمینان حاصل شود. نتایج جستجو در ژنوم، نشان داد که کلیه پرایمرها دارای محل باند شدن منحصر بفردی می باشند و به طور اختصاصی به ژن های هدف متصل می شوند. به منظور اطمینان بیشتر از مناسب بودن پرایمرها از جهت درصد GC، دمای Tm و نداشتن دایمر با یکدیگر، کلیه پرایمرها با برنامه Gene Runner ، Oligo و وب سایت IDT بررسی شدند. در ضمن برای ژن GAPDH که به عنوان ژن کنترل داخلی<sup>۲۴</sup> انتخاب شد نیز پرایمرهایی طراحی شد. کلیه پرایمرها پس از طراحی، جهت سنتز به شرکت پیشگام سفارش داده شدند و توسط شرکت Oligo کره سنتز شدند. نام کلیه ژن ها و توالی پرایمرهای طراحی شده آن ها، در جدول زیر آمده است.

جدول ۱: مشخصات ژن ها و توالی پرایمرهای استفاده شده

نام ژن	شماره RefSeq	توالی پرایمر (۵ به ۳)	طول محصول PCR(bp)
GAPDH	NM_001289746.1	Forward: TGCACCACCAACTGCTTAGC Reverse: GGCATGGACTGTGGTCATGAG	۸۷
MMP2	NM_001302510.1	Forward: TTGACCAGAATACCATCGAGACC Reverse: TGTGTAGCCAATGATCCTGTATGT	۱۳۱
TIMP2	NM_003255.4	Forward: GAGCACCACCCAGAAGAAGAG Reverse: GATGTAGCACGGGATCATGGG	۹۱
TIMP1	NM_003254.2	Forward: CCCAGAGAGACACCAGAGAAC Reverse: GCAACAACAGGATGCCAGAAG	۶۹
MMP3	NM_002422.4	Forward: ACAAAGGATACAACAGGGACCAA Reverse: ATCTTGAGACAGGCGGAACC	۱۵۳
MMP14	NM_004995.3	Forward: CCAGTTCGCCGACTAAGCAG Reverse: CGCTGTGTGTGGGTACGTAG	۳۹۵
MMP9	NM_004994.2	Forward: GTGAACATCTTCGACGCCATC Reverse: AATCGCCAGTACTTCCCATCC	۷۴
MMP1	NM_002421.3	Forward: TCACACCTCTGACATTCACCAAG Reverse: TCCCGATGATCTCCCCTGAC	۷۹

### ۸- میزان بیان ژن های مورد نظر در نمونه ها:

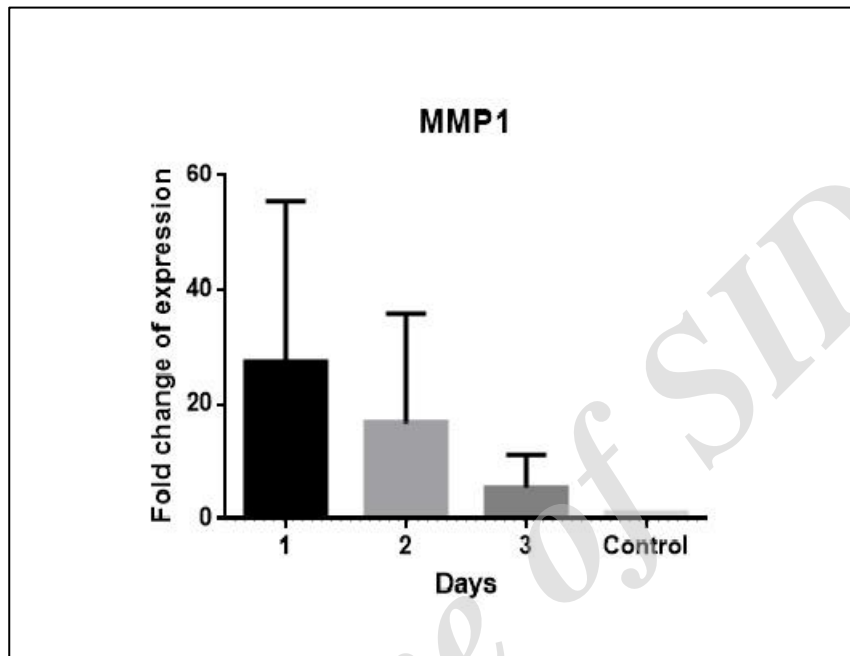
در واکنش Real-time PCR، واکنش به صورت تکرارهای دوتایی انجام شد و سیکل دمایی به صورتی که در شکل مشاهده میشود، وضع گردید.



شکل ۷: سیکل دمایی واکنش Real-time PCR

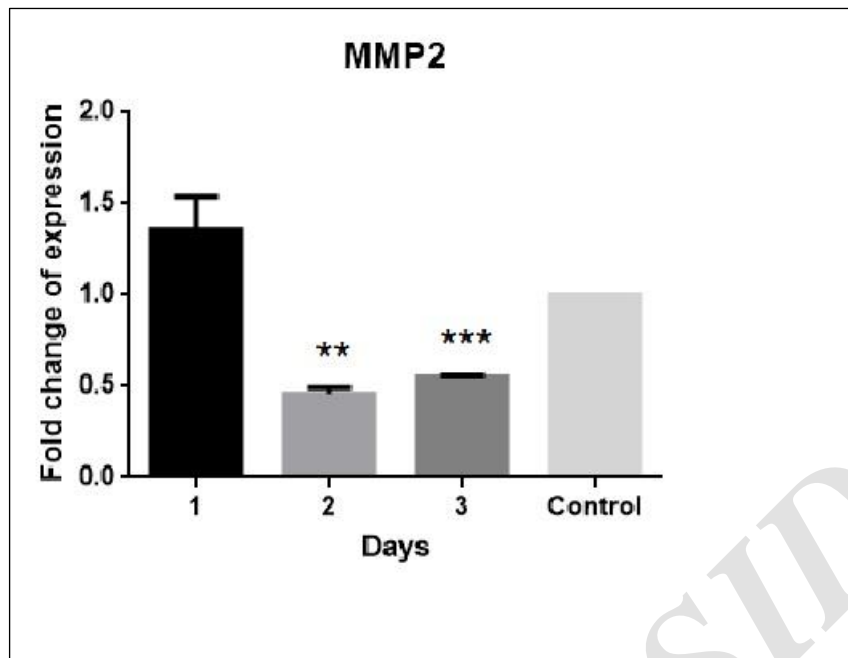
پس از به دست آوردن تمامی داده ها، با کمک نرم افزار Graph pad prism و تست آماری T-test (unpair) آنالیز داده ها انجام شد، به این ترتیب که با داشتن CT هر ژن و همچنین داشتن CT نرمالایزر که در این آزمایش از ژن GAPDH استفاده شده است، می توان تغییرات بیان ژن را محاسبه و آنالیز نمود. نتایج بیان ژن های MMP2،MMP1، MMP3،TIMP1،TIMP2،MMP14 را توسط نرم افزار در روزهای ۱، ۲ و ۳ روز بعد از اعمال بی وزنی در مقایسه با نمونه کنترل بیان گردید. در سلول های بنیادی مشتق از چربی در شرایط شبیه سازی بی وزنی و Ig (شرایط کشت نرمال) GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده شده است و بیان ژن ها در مقایسه با کشت سلولی که در شرایط نرمال جاذبه ای (Ig) و بدون CTGF بودند، نرمالایز شد.

نمودار ۱ بیان ژن MMP1 را در نمونه های کنترل (اجی) و پس از اعمال بی وزنی برای مدت ۱، ۲ و ۳ روز نشان می دهد. همانطور که نمودار نشان می دهد بی وزنی تاثیر بی تاثیر بر بیان ژن MMP1 نداشت ( $P>0.05$ ) و نمونه کنترل اختلاف معنی داری با نمونه های بیوزنی نشان نداد.



نمودار ۱: تغییرات بیان ژن MMP1 در حالت کنترل ۱ جی و پس از اعمال ۱، ۲ و ۳ روز بی وزنی

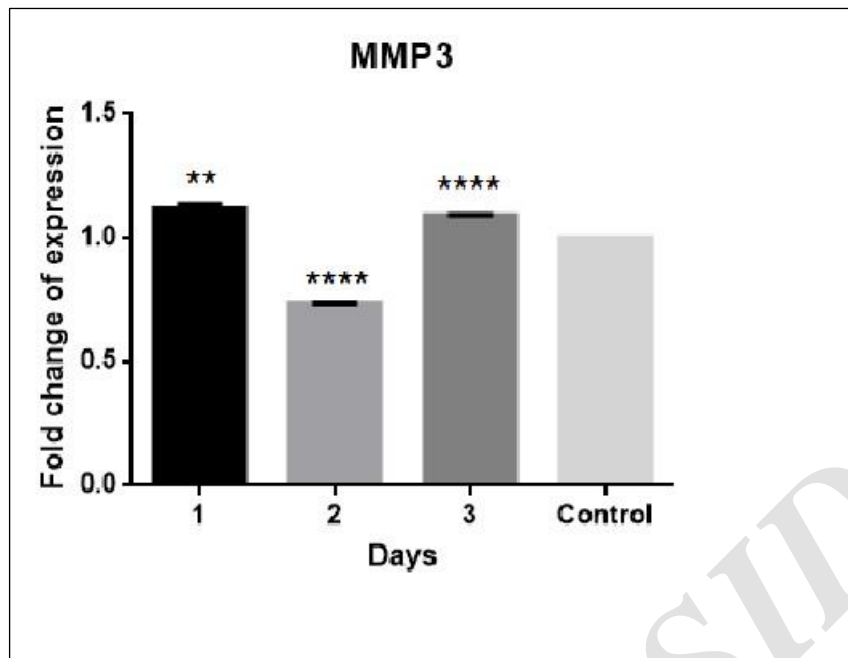
نمودار ۲ تغییرات بیانی ژن MMP2 را در نمونه های کنترل (اجی) و پس از اعمال بی وزنی برای مدت ۱، ۲ و ۳ روز نشان می دهد. همانطور که نمودار نشان می دهد بی وزنی تاثیر معنی دار بر بیان ژن MMP2 نداشت ( $P<0.05$ ) و نمونه کنترل اختلاف معنی داری با نمونه های بیوزنی نشان داد. یک روز قرارگیری در شرایط بی وزنی تاثیر بی بیان این ژن نداشت اما ادامه بی وزنی منجر به کاهش معنی دار (۵۰٪) بیان این ژن در روز دوم بی وزنی شد ( $P<0.01$ ) و این کاهش همچنان در روز سوم باقی ماند ( $P<0.001$ ).



نمودار ۲: تغییرات بیان ژن MMP2 در حالت کنترل ۱ جی و پس از اعمال ۱، ۲ و ۳ روز بی وزنی؛ \*\*:  $P < 0.01$  و

\*\*\*:  $P < 0.001$

نمودار ۳ تغییرات بیانی ژن MMP3 را در نمونه های کنترل (۱جی) و پس از اعمال بی وزنی برای مدت ۱، ۲ و ۳ روز نشان می دهد. همانطور که نمودار نشان می دهد بی وزنی تاثیر معنی دار بر بیان ژن MMP3 داشت ( $P < 0.05$ ) و نمونه کنترل اختلاف معنی داری با نمونه های بیوزنی نشان داد. یک روز قرارگیری در شرایط بی وزنی منجر به افزایش بیان این ژن (۱۲٪) شد ( $P < 0.01$ ). بیان این ژن در روز دوم در حدود ۲۵٪ کاهش یافت ( $P < 0.0001$ ) و مجددا در روز سوم بیان آن افزایش یافت و مشابه با روز اول بی وزنی شد ( $P < 0.0001$ ).

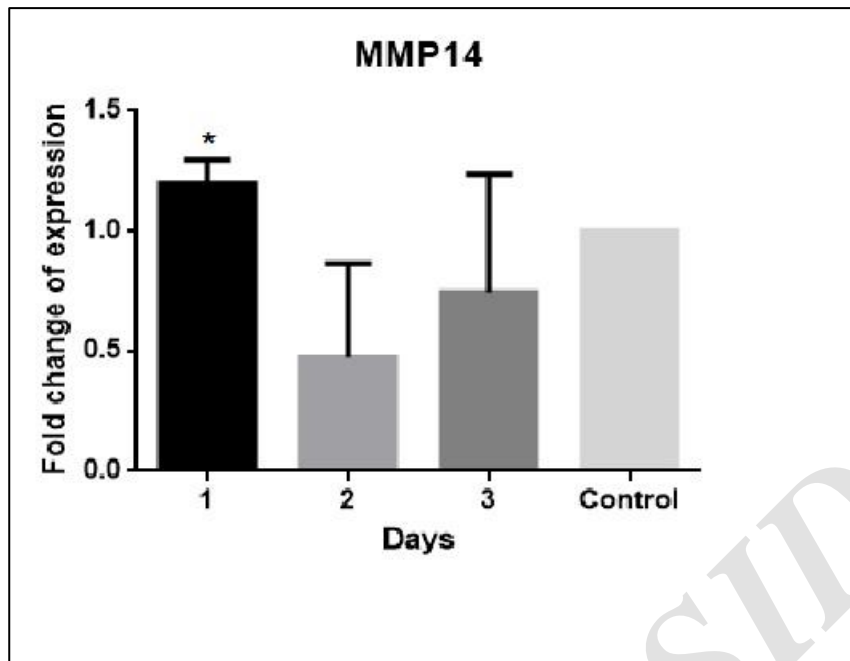


نمودار ۳: تغییرات بیان ژن MMP3 در حالت کنترل ۱ جی و پس از اعمال ۱، ۲ و ۳ روز بی وزنی؛ \*\*:  $P < 0.01$  و

\*\*\*\*:  $P < 0.0001$

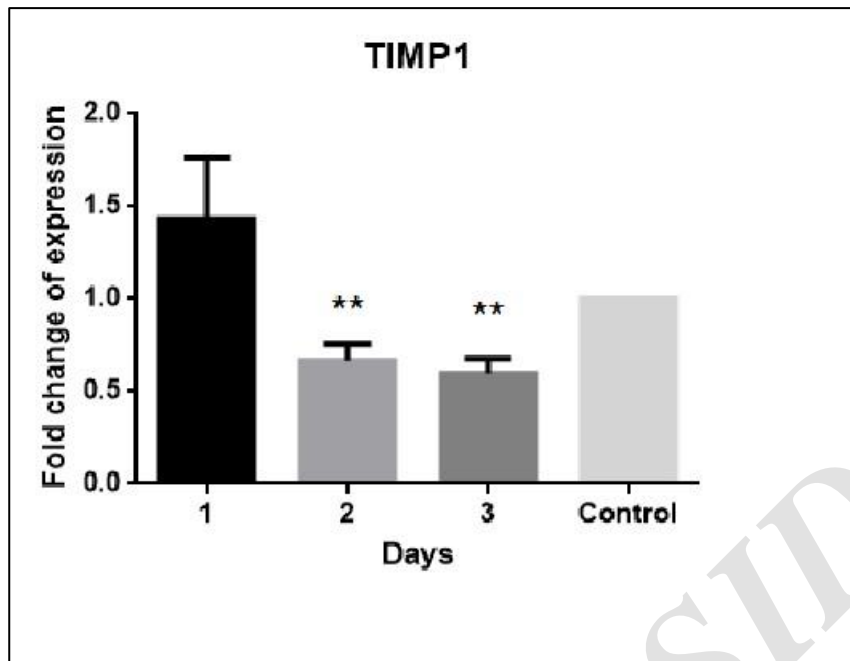
نمودار ۴ تغییرات بیانی ژن MMP14 را در نمونه های کنترل (۱جی) و پس از اعمال بی وزنی برای مدت ۱، ۲ و ۳ روز نشان می دهد. همانطور که نمودار نشان می دهد بی وزنی تاثیر معنی دار بر بیان ژن MMP14 داشت ( $P < 0.05$ ) و نمونه کنترل اختلاف معنی داری با نمونه های بیوزنی پس از یک روز اعمال بی وزنی نشان داد. یک روز قرارگیری در شرایط بی وزنی منجر به افزایش بیان این ژن (۲۰٪) شد ( $P < 0.05$ ). بیان این ژن در روز دوم و سوم بی وزنی اختلاف معنی داری با نمونه کنترل نشان نداد.





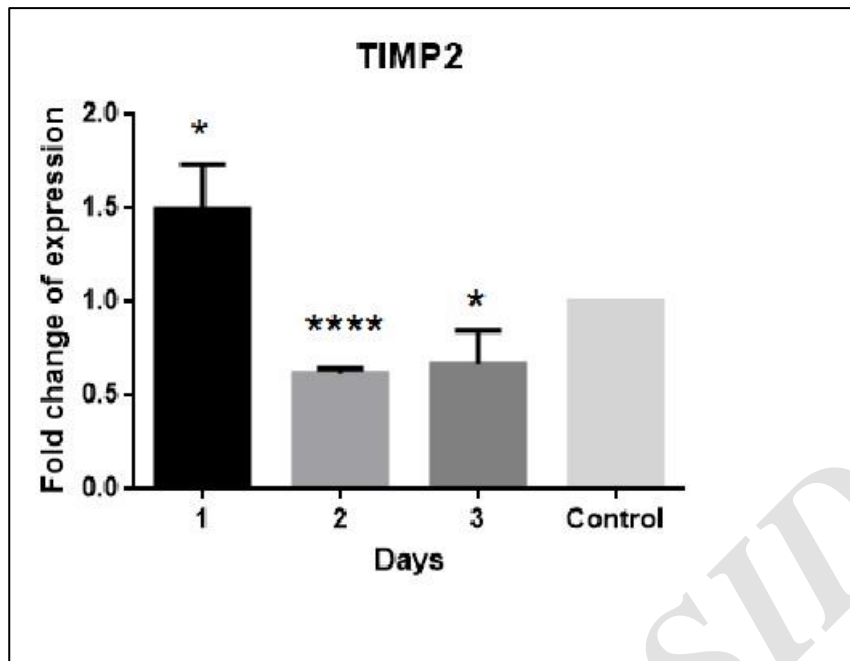
نمودار ۴: تغییرات بیان ژن MMP14 در حالت کنترل ۱ جی و پس از اعمال ۱، ۲ و ۳ روز بی وزنی؛ \* $P < 0.05$

نمودار ۵ تغییرات بیانی ژن TIMP1 را در نمونه های کنترل (۱جی) و پس از اعمال بی وزنی برای مدت ۱، ۲ و ۳ روز نشان می دهد. همانطور که نمودار نشان می دهد بی وزنی تاثیر معنی دار بر بیان ژن TIMP1 داشت ( $P < 0.05$ ) و نمونه کنترل اختلاف معنی داری با نمونه های بیوزنی نشان داد. یک روز قرارگیری در شرایط بی وزنی تاثیری بر بیان این ژن نداشت. اما ادامه دادن بی وزنی منجر به کاهش معنی دار ( $P < 0.01$ ) بیان این ژن در حدود ۴۲٪ در روز دوم شد که در روز سوم در همین سطح باقی ماند.



نمودار ۵: تغییرات بیان ژن TIMP1 در حالت کنترل ۱ جی و پس از اعمال ۱، ۲ و ۳ روز بی وزنی؛ \*\*:  $P < 0.01$

نمودار ۶ تغییرات بیانی ژن TIMP2 را در نمونه های کنترل (۱جی) و پس از اعمال بی وزنی برای مدت ۱، ۲ و ۳ روز نشان می دهد. همانطور که نمودار نشان می دهد بی وزنی تاثیر معنی دار بر بیان ژن TIMP1 داشت ( $P < 0.05$ ) و نمونه کنترل اختلاف معنی داری با نمونه های بیوزنی نشان داد. یک روز قرارگیری در شرایط بی وزنی منجر به افزایش معنی داری ( $P < 0.05$ ) در بیان این ژن (۵۰٪) شد. اما ادامه دادن بی وزنی منجر به کاهش معنی دار بیان این ژن در حدود ۴۰٪ در روز دوم ( $P < 0.05$ ) و سوم ( $P < 0.0001$ ) شد.



نمودار ۶: تغییرات بیان ژن TIMP2 در حالت کنترل ۱ جی و پس از اعمال ۱، ۲ و ۳ روز بی وزنی؛ \* :  $P < 0.05$  و

\*\*\*\* :  $P < 0.0001$

ژن MMP9 در این سلول ها قبل و بعد از اعمال بی وزنی بیان نمی شد.

## فصل ششم

# نتیجه گیری و بحث

## ۱- اهمیت مطالعه سلول های بنیادی :

مطالعات گسترده و فزاینده پیرامون سلول های بنیادی به طور عمده به منظور درک دقیق ایجاد یک ارگانسیم پیچیده از یک سلول زنده و نیز چگونگی جایگزینی سلول های سالم با سلول های آسیب دیده در یک موجود بالغ متمرکز می باشد. این حوزه از پژوهش، پژوهشگران بی شماری را به سوی پژوهش در مورد امکان سلول درمانی برای درمان شمار زیادی از بیماری های مهم انسانی نیز سوق داده است. سلول های بنیادی، سلول های پرتوانی هستند که قادر به تمایز و تولید انواع دیگر سلول ها می باشند. این سلول ها همچنین قادر به تجدید و ابقا خود می باشند. برای مدت های طولانی، سلول های بنیادی در زیست شناسی پستانداران مطرح بودند. اگر چه دانشمندان قادر به تولید و مطالعه آنها در محیط آزمایشگاه نبوده اند تا این که در سال ۱۹۸۱، سرانجام دانشمندان موفق به تولید کشت سلول های بنیادی جنین موش در آزمایشگاه گردیدند. امروزه به موجب مطالعات بسیار و پیشرفت فزاینده دانش درباره سلول های بنیادی بالغ، قادر به جداسازی انواع سلول های بنیادی، به طور مثال سلول های بنیادی عصبی، سلول های تولید کننده بافت اندوتلیال رگ ها، سلول های مخروطی شکل بافت کبدی، از بافت های بالغ می باشیم. در آغاز، این اندیشه وجود داشت که سلول های بنیادی تنها قادر به تولید سلول های بافتی هستند که از آن منشا می گیرند. امروزه به نظر می رسد که سلول های بنیادی بالغ بسیار انعطاف پذیرتر از آنچه که در گذشته تصور می شد می باشند و قادر می باشند به انواع مختلفی از سلول ها تبدیل شوند. به طور مثال، سلول های بنیادی خونی به سلول های مغزی و کبدی، سلول های بنیادی مغزی به سلول های خونی و سلول های بنیادی کبدی قادر به تبدیل به سلول های خونی می باشند. این یافته های جدید پژوهشگران را قادر به یافتن راههایی برای مبارزه با بیماری های تهدید کننده حیات از جمله پارکینسون، آلزایمر، سکته مغزی و آسیب نخاعی، دیابت ملیتوس وابسته به انسولین و نارسایی های قلبی و عروقی خواهد ساخت. شایان تاکید است که مطالعه سلول های بنیادی در فهم فرایند پیری و

درمان بیماری های وابسته به سن نیز بسیار ارزشمند است. در دهه آینده، بیشتر پژوهش ها بر روی سلول های بنیادی به منظور سلول درمانی یا ترکیبی از ژن درمانی و سلول درمانی متمرکز خواهد بود (۲۱ و ۲۲ و ۲۳).

به طور کلی در بدن موجودات زنده پرسلول، برخی از سلولها ضامن بقای موجود می باشند که از آن جمله میتوان به سلولهای بنیادی اشاره کرد. سلولهای بنیادی، سلولهای سوماتیکی تمایز نیافته ای هستند که قادرند تحت شرایط خاص به یکی از انواع سلولهای بالغ یا کاملاً تمایز یافته تبدیل شوند (۲۱).

از ویژگی های آنها میتوان به توانایی خود تجدیدی، تقسیم میتوزی بالا، خاصیت کلونی زایی و همچنین تمایز به انواع سلولهای تخصص یافته (۲۳) و ایجاد یک جمعیت سلولی ترمیمی اشاره کرد (۲۴). 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 اکثر محققین را به خود جلب کرده است، میتوان به سلولهای بنیادی مزانشیمی اشاره کرد.

در سال ۱۹۸۷، فریدنشتاین و همکارانش موفق به جداسازی گروهی از سلول ها از مغز استخوان شدند که تحت شرایط ویژه ای قادر به تمایز به سلول های بافت همبند از قبیل سلول های استخوانی، غضروف و چربی بودند. این سلول ها در کشت آزمایشگاه بعد از ۲۰ الی ۳۰ پاساژ، هنوز قادر به حفظ قابلیت تشکیل استخوان و غضروف هستند و به عنوان سلول های بنیادی مزانشیمی Mesenchymal stem cell یا MSC یا سلول های استرومایی مغز استخوان نامیده شدند (۲۵).

## ۲- سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی :

اگرچه MSCها برای اولین بار از مغز استخوان گزارش شدند؛ در حال حاضر مشخص شده است که این سلول ها در بافت همبند تمامی ارگان های بدن وجود دارند (26) که در این بین می توان به بافت چربی (27) اشاره نمود که یک سیستم جامع و پیچیده را تشکیل می دهد و در سراسر بدن پراکنده شده است(28).

همچنین سلول های بنیادی مزانشیمی را می توان از بافت های بالغین و جنینی مانند قلب، عضلات اسکلتی، بافت سینوویال، پانکراس، پریوستئوم، خون محیطی، جفت، بندناف و مایع آمنیوتیک جداسازی کرد (29).

سلول های بنیادی مزانشیمی در محیط آزمایشگاه فنوتیپ پایداری دارند و به صورت تک لایه باقی می ماند و قادر به تمایز به استخوان، غضروف، بافت چربی، تاندون، عضله و بافت فیبری می باشند. جهت شناسایی MSCها، باتوجه به اختلاف نظرها و متغیر بودن شاخص های مطرح شده در مطالعات مختلف، کمیته بین المللی سلول درمانی شاخص های حداقلی جهت شناسایی MSCها ارائه کرده است که شامل سه گروه شاخص های کشت، فنوتیپ و قدرت تمایز می باشند و عبارتند از:

۱- کشت: اتصال به سطح پلاستیکی در شرایط کشت استاندارد

۲- فنوتیپ: بیان مثبت (بالای ۹۵درصد) شاخص های CD105, CD90, CD73 و بیان منفی (کمتر از

5درصد) شاخص های CD14(CD11b), CD34(CD79a), CD45 و HLA-DR

۳- تمایز در آزمایشگاه: تحت تحریک اختصاصی، سلول ها باید به استئوبلاست ها، آدیپوسیت ها و

کندروسیت ها تمایز یابند (30).

سلول های MSC به دلیل ویژگی های منحصر به فردی که دارند توجه محققین زیادی را به خود جلب کرده اند. این ویژگی ها عبارتند از:

۱- دسترسی آسان به این سلول ها با استفاده از روش های کمتر تهاجمی و همچنین کشت و تکثیر آسان

MSCها در آزمایشگاه. مطالعات نشان داده اند که MSCها در شرایط کشت قادر به ۵۰ مرتبه تقسیم هستند

بدون این که فنوتیپ و پتانسیل چندقوه ای خود را از دست بدهند(31).

۲- این سلول ها توانایی زیادی در مهاجرت به محل های آسیب، التهاب و توموری دارند(32).

۳- این سلول ها دارای ایمونوژنیسیته کم و میزان کم جهش های داخلی می باشند(33).

۴- از لحاظ ژنتیکی امکان تغییر MSCها برای اهدافی مانند بیان پروتئین های درمانی و ترشح این عوامل به ریز

محیط الهاب و تومور وجود دارد(34).

با افزایش روزافزون توجه به درمان های جدید از جمله سلول درمانی و در راس آن استفاده از سلول بنیادی

مزانشیمی، انتخاب منبع مناسب جهت به دست آوردن این سلول ها از اهمیت زیادی برخوردار است.

بافت چربی یکی از بافت های است که امروزه مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است . ثابت شده است که

علاوه بر سلول های چربی ، سلول های متعددی از قبیل سلول های عروقی، سلول های عضله صاف و اندوتلیال، حاوی

جمعیتی از سلول های چندظرفیتی بوده که ویژگی های آنها مشابه به سلول های بنیادی مزانشیمی مغزاستخوان است (35).

این سلولها تحت عنوان سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی (ADSCs) نامگذاری شدند. این بافتها مانند مغزاستخوان

منشأً مزانشیمال داشته و از چند جهت دارای مزیت میباشد:

۱- این سلولها را میتوان از طریق فرایند لیپوساکشن، از بافت زیرپوست به آسانی برداشت کرد. بافت چربی به

راحتی و باحداقل روش تهاجمی و به میزان فراوان قابل دستیابی است.

۲- جمعیت سلولی حاصل از بافت چربی دارای منشأً مزانشیمال بوده و ناخالصی کمی از سلول های اندوتلیال،

سلول های عضلانی صاف رادارد.

۳- سلول های بنیادی حاصل از بافت چربی حتی با گذراندن چندین پاساژ، دیرتر وارد فازپیری میشوند.



۴- این سلول ها می توانند در تعداد بیشتر استخراج شوند و توانایی رشد و تکثیر بالایی دارند.

۵- کارایی سلول های بنیادی جدا شده از بافت چربی با افزایش سن، جنس، چاقی و بعضی بیماری ها مانند

نارسایی کلیوی و بیماری عروقی تغییر نمی کند.

۶- سلولهای بنیادی حاصل از بافت چربی قابلیت تمایز به سلولهای آدیپوژنیک، استئوژنیک، کندروژنیک و

میوژنیک را دارند (36).

در این مطالعه با توجه به موارد ذکر شده و مزایای استفاده از بافت چربی به ویژه اینکه بافت چربی را می توان

با روش های کم تر تهاجمی مانند لیپوساکشن و یا لیپوپلاستی بدست آورد و همچنین تعداد سلول هایی که از

بافت چربی بدست می آید (5\*103 در هر گرم بافت چربی) بسیار بیشتر از سلول های استخراج شده از مغز

استخوان است ، تصمیم گرفتیم از بافت چربی جهت استخراج سلول های بنیادی مزانشیمی استفاده کنیم.

۳- استخراج و تایید سلول های بنیادی مشتق از چربی:

از آنجا که جایگاههای مختلف آناتومیکی بافت چربی ویژگی های متابولیکی ، مانند فعالیت لیپویتیکی ، ترکیب اسید

چرب و پروفایل بیان ژن ویژه خود را دارد، منع پیوند بافت چربی زیر جلدی ممکن است تحت تاثیر ویژگی های

خاص چربی آن ناحیه قرار بگیرد. بنابراین قبل از استخراج چربی، مطالعات جامعی راجع به محل استخراج بافت

چربی و سن شخص دهنده بافت انجام شد.

مطالعات زیادی راجع به اندام های مختلف دهنده مانند، باسن، ران، پهلو و غیره از نظر سلول بدست آمده، حیات

سلول و ظرفیت تمایز سلولی انجام شده است. به طور کلی مطالعات نشان میدهند که محل استخراج بافت چربی

تاثیر قابل توجهی بر فعالیت های اصلی سلولهای بنیادی مانند قدرت تمایز، سرعت تکثیر و تعداد کل سلول های

زنده ندارد (38).

به طور کلی محل استخراج بافت چربی تاثیری بر ویژگی های سلول های بنیادی ندارد اما در مورد سن شخص دهنده بافت، با توجه به یکسان نبودن نتایج، بهتر است که شخص دهنده بافت از بین گروه سنی جوان یا میانسال انتخاب شود. بعد از انجام مطالعات و نتیجه گیری، برای استخراج سلول های بنیادی در این تحقیق از بافت چربی استخراج شده از پهلوی یک خانم ۴۵ ساله استفاده شد.

روش های مختلفی جهت جداسازی سلول های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی وجود دارند. یکی از روش ها استفاده از آنزیم کلاژناز برای تجزیه بافت چربی و حتی کشت مستقیم بافت چربی در فلاسک کشت سلولی (۳۸). ما برای جداسازی سلول های بنیادی از چربی از روش هضم آنزیمی با آنزیم کلاژناز IA استفاده کردیم. این رایج ترین روش استخراج سلول بنیادی از چربی است و از نظر تعداد سلول های بدست آمده هم بازده مناسبی دارد. همچنین از لحاظ هزینه و زمان هم، روش مقرون به صرفه ای است.

همانطور که در بخش های قبلی هم عنوان شد، جهت تایید بنیادی و مزانشیمی بودن سلول های استخراج شده سه خصوصیت: ۱. توانایی اتصال به سطح ظرف کشت سلول ۲. بیان مارکرهای سلول های مزانشیمی و ۳. توانایی تمایز به ۲ رده ( چربی و استخوان) بررسی شد. توانایی اتصال سلول های بنیادی مزانشیمی از مهمترین خصوصیات این سلول ها است که البته روش جدا سازی با هضم آنزیمی هم بر پایه همین خاصیت سلول ها طراحی شده است. با توجه به نتایج ارائه شده در فصل قبل، بررسی مارکرهای سطحی و توانایی تمایز سلول ها، مزانشیمی و بنیادی بودن سلول ها را تایید کرد.

هدف اصلی از مطالعات زیست شناسی فضا، درک بهتر اثر جاذبه بر فرایند های بنیادی زیست شناختی است.

تمرکز اصلی زیست شناسی فضا بر روی جانداران کوچک مانند سلول ها و گیاهان است، در حالی که فیزیولوژی فضایی بر فیزیولوژی و عملکرد انسان تمرکز دارد. پزشکی فضایی هم به بررسی خطرات و مشکلاتی که انسان را طی پروازهای فضایی تهدید می کند، می پردازد. به صورت تخصصی تر زیست شناسی سلولی به عنوان زیر شاخه زیست شناسی فضا در نظر گرفته می شود که اثر تغییرات جاذبه را بر سلول در شرایط بی وزنی یا شبیه سازی بی وزنی مطالعه می کند. با توجه به تغییراتی که کشت سلولی در شرایط بی وزنی نشان میدهند، از جمله از دست دادن انتقال گرمایی وابسته به جاذبه، هیدرودینامیک ضعیف و عدم رسوب، می توان از آن به عنوان ابزاری جدید در مواردی مانند کشت بافت استفاده کرد (40).

#### ۵- ماتریکس خارج سلولی در بی وزنی:

ماتریکس خارج سلولی هم از ساختارهایی است که در اثر شرایط بی وزنی دچار تغییر می شود. زیرا یکی از وظایف آن محافظت از سلول و بافت ها در برابر فشار ها و استرس های مکانیکی محیطی است. پس با توجه به اینکه جاذبه هم یکی از استرس های مکانیکی محسوب میشود، بدیهی است که تغییر در میزان آن باعث تغییر در ماتریکس خارج سلولی هم شود (41).

اجزا تشکیل دهنده ماتریکس خارج سلولی شامل کلاژن، الاستین، فیبرونکتین، لامینین و هیالورونیک اسید است. همچنین سلول هایی که نقش اصلی را در ترشح ماتریکس خارج سلولی دارند، فیبروبلاست ها می باشند.

تقریباً تمام ژن ها و پروتین هایی که به عنوان مارکر های سلول های فیبروبلاست شناخته می شوند، در تشکیل ماتریکس خارج سلولی نقش دارند. از جمله این ژن ها میتوان به ماتریکس متالو پروتیناز ها اشاره کرد.

به طور کلی انتظار می رود که در شرایط بی وزنی (واقعی) از استحکام و مقدار ماتریکس خارج سلولی کاسته شود، زیرا بی وزنی باعث کم شدن نیروی مکانیکی وارد شده بر سلول می شود و در نتیجه میزان کمتری از ماتریکس خارج سلولی برای محافظت از سلول ها نیاز است (42).

سلول های بنیادی مزانشیمی هم بیان قابل توجهی از اجزا سازنده ماتریکس خارج سلولی را در سطح ژن و پروتین دارند. از جمله ژن های ماتریکس متالوپروتئین ها MMP1، MMP2، MMP3، MMP14، TIMP1، TIMP2 می باشد که در سلول های بنیادی مزانشیمی هم بیان می شوند. در این تحقیق برای بررسی اثر بی وزنی شبیه سازی شده توسط کلینواستت یک محوره بر ساختار ماتریکس خارج سلولی، بیان چند ژن شاخص ماتریکس خارج سلولی را در سلول های مزانشیمی بنیادی مشتق از چربی بعد و قبل از قرار گرفتن در کلینواستت مورد سنجش قرار دادیم.

نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان داد که میزان بیان این ژن ها نسبت به نمونه کنترل پس از ۱، ۲ و ۳ روز اعمال بی وزنی تغییر کرده است. بی وزنی تاثیری بر بیان ژن MMP1 نداشت. اما منجر به کاهش بیان MMP2، TIMP1 و TIMP2 و افزایش بیان ژن های MMP14 و MMP3 گردید.

آنزیم MMP1 مسئول شکستن ماتریکس خارج سلولی در فرایندهای طبیعی فیزیولوژیک مانند تکوین جنین، تولیدمثل و رمدلینگ بافتی و همچنین برخی بیماریها مثل آرتریت و متاستاز می باشد. به ویژه MMP1 مسئول شکستن کلاژن تیپ ۱، ۲ و ۳ می باشد. مطالعات طی پرواز های فضایی نشان داده است که ماتریکس متالو پروتیناز نوع یک افزایش بیان قابل توجهی نشان می دهد (43). نتایج ما تغییری در بیان این ژن در شرایط بی وزنی شبیه سازی شده نشان نداد. این امر می تواند ناشی از اختلاف در محیط بی وزنی باشد که در مطالعه قبلی محیط بی وزنی واقعی و در مطالعه حاضر محیط شبیه سازی بی وزنی و توسط دستگاه کلینواستت تک محوره بوده است. همچنین نوع سلول های مورد مطالعه نیز در دو مطالعه با یکدیگر متفاوت بوده است. از آنجا که این ژن مسئول شکستن کلاژن می باشد

عدم تغییر بیان آن می تواند برای مطالعات آتی در جهت استفاده از شرایط بی وزنی برای تمایز این سلول ها به سلول های فیروبلست جهت ترمیم آسیب های پوستی و کارهای زیبای سودمند باشد.

آنزیم MMP2 مسئول شکستن کلاژن تیپ ۴ بوده و در تنظیم رگزایی و پاسخ های التهابی نیز نقش دارد. افزایش بیان این ژن در بیماری های التهابی و مزمن مثل برونشیت و در متاستاز سرطان های کولورکتال، سینه، ریه، تخمدان و پروستات گزارش شده است (۴۴-۴۷). مطالعه ما نشان داد که بی وزنی منجر به کاهش بیان این ژن می گردد. به طوری که بیان آن پس از دو و سه روز بی وزنی به میزان ۵۰٪ در مقایسه با نمونه های کنترل ۱ جی کاهش یافت. با توجه به کاهش بیان این ژن این احتمال وجود دارد که بی وزنی بتواند برای مطالعه روند ایجاد و پیشرفت سرطان و متاستاز و همچنین بیماری های التهابی سودمند باشد. امروزه مطالعه سلول های سرطانی در شرایط بی وزنی شروع شده است و مطالعات حاکی از این است که بی وزنی می تواند منجر به تغییر برخی سلول های سرطانی از حالت بدخیم و متاستازی به حالت غیر متاستازی و حتی خوش خیم گردد (۴۸).

آنزیم MMP3 مسئول شکستن کلاژن تیپ ۲، ۳، ۴، ۹ و ۱۰ و فیبرونکتین و الاستین می باشد. همچنین این ژن در تنظیم روتویسی برخی ژن ها نیز دخیل می باشد و افزایش بیان آن منجر به برخی بیماری ها چون التهاب و ترومای مغزی به دلیل تاثیر بر سدخونی مغز می شود (۴۹-۵۰). نتایج ما نشان داد که بی وزنی بعد از دو روز منجر به کاهش بیان این ژن می گردد. این در حالی بود که ادامه یافتن بی وزنی برای سه روز منجر به افزایش بیان آن البته به میزان ۱۰ درصد گردید. بنابراین به نظر می رسد که طول مدت زمان بی وزنی می تواند منجر به بروز پاسخ های متفاوت در سلول شود و باید مشخص شود که بهترین زمان اعمال بی وزنی برای دیدن پاسخ خاص چه مدت زمانی می باشد. همچنین به نظر می رسد که سلول بعد از سه روز نسبت به شرایط بی وزنی خود را سازگار کرده و مجدداً بیان آن را افزایش داده تا به سطح کنترل و حتی مقداری بیشتر از سطح کنترل رسیده است.

آنزیم MMP14 بیشتر در سطح سلول قرار دارد و جزء پروتئین های غشایی و سطحی سلول می باشد و در انتقال پیام نقش دارد. این ژن مسئول فعال کردن MMP2 نیز می باشد که این فعال شدن در متاستاز و تهاجم تومور نقش دارد. نتایج ما نشان داد که بی وزنی برای یک روز منجر به افزایش بیان این ژن در حد ۲۰ درصد می شود اما ادامه یافتن آن در روزهای دوم و سوم منجر به کاهش بیان آن در مقایسه با نمونه های کنترل شد که البته این کاهش معنی دار نبود. این مسئله می تواند با کاهش بیان MMP2 در شرایط بی وزنی مجددا تاکید بر استفاده از بی وزنی برای مطالعه روند ایجاد و پیشرفت سرطان باشد (۵۱-۵۲).

آنزیم های TIMP در واقع مهار کننده های ماتریکس متالوپروتئیناز ها هستند که در هموستازی بافت و در برخی فرایندهای فیزیولوژیکی نقش به سزایی دارند. ۴ نوع از این آنزیم وجود دارد که هر یک بر روی نوعی از آنزیم های ماتریکس متالوپروتئیناز نقش مهارکنندگی دارد. به عنوان مثال نوع یک آن مهار کننده ماتریکس متالوزروتئیناز ۱ و ۳ و نوع ۲ آن مهار کننده ماتریکس متالوزروتئیناز ۲ می باشد (۵۳). نتایج ما نشان داد که بی وزنی پس از ۳ روز منجر به کاهش هر دوی TIMP های نوع ۱ و ۲ می باشد که این نتایج با نتایج به دست آمده در مورد ماتریکس متالوزروتئیناز نوع ۱، ۲ و ۳ تاحدی همسو می باشد.

نتایج این قسمت از تحقیقات نشان داد که شرایط شبیه سازی بی وزنی با کلیتو استت یک محوره باعث تغییر در بیان ژن های ذکر شده می شود. این نتایج بخشی از پاسخ تطبیق پذیری سلول به تغییر در نیروهای مکانیکی وارد شده بر سلول است. با شناخت بهتر این نیرو ها می توان از آنها برای تمایز سلولی بدون استفاده از مواد شیمیایی یا بیولوژیکی استفاده کرد. علاوه بر این استفاده از این بافت به عنوان منبع سلولهای بنیادی مزانشیمی پتانسیل عظیم برای کاربردهای مهندسی بافت و تهیه داربست طبیعی فراهم کرده است.

متالوپروتئیناز، آنزیم های وابسته به کلسیم و روی هستند و در ترمیم زخم نقش اساسی دارند. فیروبلاست ها منبع اصلی تولید این آنزیم ها در پوست هستند. به طور کلی ماتریکس خارج سلولی در حفظ یکپارچگی و تمامیت بافت ها نقش مهمی دارد و به همراه اسکلت سلولی در هدایت و انتقال پیام بین سلول ها و در نتیجه تنظیم فعالیت سلول و بافت و هموستازی بدن نقش مهمی دارد. نیروی جاذبه بر روی اسکلت سلولی و ماتریکس خارج سلولی نیز تاثیرگذار است و مطالعه تغییرات آن در شرایط بی وزنی می تواند اطلاعات با ارزشی را در زمینه چگونگی سازگاری آن به بی وزنی و همچنین استفاده از بی وزنی برای کاربردهای زمینی در اختیار ما قرار دهد.

### نتیجه گیری:

در پایان ما برای اولین بار بیان ژن های ماتریکس متالوپروتئین ها (TIMP1, MMP14, MMP3, MMP2, MMP1, TIMP2) را در سلول های بنیادی مزانشیمی در شرایط شبیه سازی بی وزنی مورد بررسی قرار دادیم. با توجه به نتایج بدست آمده از بیان ژنی میتوان چنین برداشت کرد که شرایط شبیه سازی بی وزنی ایجاد شده با کلینواستت یک محوره، باعث تغییر در بیان برخی ژن های مهمی شود. البته ممکن است با شناخت بهتر نیروهایی که در دستگاه شبیه سازی بی وزنی به سلول وارد می شود، شرایطی را فراهم کرد که بدون استفاده از عوامل شیمیایی یا بیولوژیکی، تغییر در بیان ژن ها را انجام داد. همچنین با توجه به تغییرات بیان ژنی، میتوان از شبیه سازی بی وزنی به عنوان روشی در کنار روش های قدیمی به منظور کاربرد های سلول درمانی و تمایز و همچنین ترمیم آسیب های پوستی استفاده کرد.

## پیشنهادات:

پیشنهاد می شود که در آینده کارهای تکمیلی زیر صورت پذیرد:

- ۱- بررسی تمایز سلول های استخراج شده به سلول های فیروبلاست در شرایط بی وزنی
- ۲- بررسی تمایز سلول های استخراج شده به سلول های غضروف در شرایط بی وزنی
- ۳- بررسی خاصیت تعدیل سیستم ایمنی و تحریک سیستم ایمنی و قبول یا رد پیوند توسط این سلول ها با استفاده از تکنیک MLR
- ۴- بررسی تنش یا استرس سلولی در شرایط بی وزنی
- ۵- بررسی تاثیر شرایط بی وزنی بر نقشه کروموزومی
- ۶- بررسی تاثیر شرایط بی وزنی بر طول تلومر



# فصل هفتم

## منابع

Archive of SID

- 1- Sivan U, Jayakumar K, Krishnan LK. Matrix-directed differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells to dermal-like fibroblasts that produce extracellular matrix. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2016 Oct 1;10(10).
- 2- Han Y, Chai J, Sun T, Li D, Tao R. Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into dermal fibroblasts in vitro. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011 Oct 7;413(4):561-5.
- 3- Hu R, Ling W, Xu W, Han D. Fibroblast-like cells differentiated from adipose-derived mesenchymal stem cells for vocal fold wound healing. *PloS one*. 2014 Mar 24;9(3):e92676.
- 4- Lee CH, Shah B, Moiola EK, Mao JJ. CTGF directs fibroblast differentiation from human mesenchymal stem/stromal cells and defines connective tissue healing in a rodent injury model. *The Journal of clinical investigation*. 2015 Oct 1;125(10):3992
- 5- Davis JR, Johnson R, Stepanek J, editors. *Fundamentals of aerospace medicine*. Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
- 6- Crawford-Young SJ. Effects of microgravity on cell cytoskeleton and embryogenesis. *International journal of developmental biology*. 2003 Jan 1;50(2-3):183-91
- 7- Carlsson SI, Bertilaccio MT, Ballabio E, Maier JA. Endothelial stress by gravitational unloading: effects on cell growth and cytoskeletal organization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2003 Oct 21;1642(3):173-9
- 8- Unsworth BR, Lelkes PI. Growing tissues in microgravity. *Nature medicine*. 1998 Aug 1;4(8):901-7.
- 9- Chiu B, Wan JZ, Abley D, Akabutu J. Induction of vascular endothelial phenotype and cellular proliferation from human cord blood stem cells cultured in simulated microgravity. *Acta astronautica*. 2005 Jun 30;56(9):918-22.
- 10- Siamwala JH, Majumder S, Tamilarasan KP, Muley A, Reddy SH, Kolluru GK, Sinha S, Chatterjee S. Simulated microgravity promotes nitric oxide-supported angiogenesis via the iNOS–cGMP–PKG pathway in macrovascular endothelial cells. *FEBS letters*. 2010 Aug 4;584(15):3415-23.
- 11- Seitzer U, Bodo M, Müller PK, Açil Y, Bätge B. Microgravity and hypergravity effects on collagen biosynthesis of human dermal fibroblasts. *Cell and tissue research*. 1995 Dec 1;282(3):513-7.
- 12- Jin L, Feng G, Reames DL, Shimer AL, Shen FH, Li X. The effects of simulated microgravity on intervertebral disc degeneration. *The Spine Journal*. 2013 Mar 31;23(3):235-42.
- 13- Stein TP, Wade CE. Metabolic consequences of muscle disuse atrophy. *The Journal of nutrition*. 2005 Jul 1;135(7):1824S-8S.
- 14- Nusgens BV, Chometon G, Guignandon A, Ho G, Lambert C, Mineur PS, Zhang Z, Deroanne C, Eckes B, Vico L, Krieg T. Role of the RhoGTPases in the cellular receptivity and reactivity to mechanical signals including microgravity. *InESA Special Publication 2005 Aug (Vol. 585)*.
- 15- Zhang ZG, Lambert CA, Servotte S, Chometon G, Eckes B, Krieg T, Lapière CM, Nusgens BV, Aumailley M. Effects of constitutively active GTPases on fibroblast behavior. *Cellular and molecular life sciences*. 2006 Jan 1;63(1):82.
- 16- Chang D, Xu H, Guo Y, Jiang X, Liu Y, Li K, Pan C, Yuan M, Wang J, Li T, Liu C. Simulated microgravity alters the metastatic potential of a human lung adenocarcinoma cell line. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*. 2013 Mar 1;49(3):170-7.
- 17- Tong Z, Sant S, Khademhosseini A, Jia X. Controlling the fibroblastic differentiation of mesenchymal stem cells via the combination of fibrous scaffolds and connective tissue growth factor. *Tissue Engineering Part A*. 2011 Jul 29;17(21-22):2773-85.

- 18- Schäffler A, Büchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells—basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem cells*. 2007 Apr 1;25(4):818-27.
- 19- Forcheron F, Agay D, Scherthan H, Riccobono D, Herodin F, Meineke V, Drouet M. Autologous adipocyte derived stem cells favour healing in a minipig model of cutaneous radiation syndrome. *PloS one*. 2012 Feb 14;7(2):e31694
- 20-Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells. *Circulation*. 2004 Feb 10;109(5):656-63.
- 21- Grove JE, Bruscia E, Krause DS. Plasticity of bone marrow–derived stem cells. *Stem cells*. 2004 Jul 1;22(4):487-500.
- 22- Svendsen CN, Caldwell MA, Ostefeld T. Human neural stem cells: isolation, expansion and transplantation. *Brain Pathology*. 1999 Jul 1;9(3):499-513.
- 23- Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *Journal of cellular physiology*. 1963 Dec 1;62(3):327-36
- 24- Sanai N, Tramontin AD, Quinones-Hinojosa A, Barbaro NM. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature*. 2004 Feb 19;427(6976):740.
- 25- Hou G, Mohamalawari DR, Blancaflor EB. Enhanced gravitropism of roots with a disrupted cap actin cytoskeleton. *Plant Physiology*. 2003 Mar 1;131(3):1360-73.
- 26- da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science*. 2006 Jun 1;119(11):2204-13.
- 27- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*. 2002 Dec 1;13(12):4279-95
- 28- Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A, Slaby O, Michalek J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem cells and development*. 2012 Apr 3;21(14):2724-52.
- 29- Kalervo Väänänen H. Mesenchymal stem cells. *Annals of medicine*. 2005 Jan 1;37(7):469-79.
- 30- Dai LJ, Moniri MR, Zeng ZR, Zhou JX, Rayat J, Warnock GL. Potential implications of mesenchymal stem cells in cancer therapy. *Cancer letters*. 2011 Jun 1;305(1):8-20.
- 31- In't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE, Kanhai HH. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. 2004;22(7):1338-45.
- 32- Studeny M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreeff M. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon- $\beta$  delivery into tumors. *Cancer research*. 2002 Jul 1;62(13):3603-8.
- 33- Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem cells*. 2006 Feb 1;24(2):462-71.
- 34- Lee CH, Shah B, Moioli EK, Mao JJ. CTGF directs fibroblast differentiation from human mesenchymal stem/stromal cells and defines connective tissue healing in a rodent injury model. *The Journal of clinical investigation*. 2015 Oct 1;125(10):3992.
- 35- Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ, Ailhaud G, Dani C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie*. 2005 Jan 31;87(1):125-8.
- 36- De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, Elbarbary A, Zhu M, Ashjian P, Benhaim P, Hedrick MH, Fraser JK. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunology letters*. 2003 Oct 31;89(2):267-70.

- 37- Kitagawa Y, Kobori M, Toriyama K. History of discovery of human adipose-derived stem cells and their clinical application. *Japanese Journal of Plastic and Reconstructive Surgery*. 2006;49(10):1097.
- 38- Kitagawa Y, Kobori M, Toriyama K. History of discovery of human adipose-derived stem cells and their clinical application. *Japanese Journal of Plastic and Reconstructive Surgery*. 2006;49(10):1097.
- 39- Busser H, De Bruyn C, Urbain F, Najar M, Pieters K, Raicevic G, Meuleman N, Bron D, Lagneaux L. Isolation of adipose-derived stromal cells without enzymatic treatment: expansion, phenotypical, and functional characterization. *Stem cells and development*. 2014 May 7;23(19):2390-400.
- 40- Becker JL, Souza GR. Using space-based investigations to inform cancer research on Earth. *Nature reviews. Cancer*. 2013 May 1;13(5):315.
- 41- Guignandon A, Lafage-Proust MH, Usson Y, Laroche N, Caillot-Augusseau A, Alexandre C, Vico L. Cell cycling determines integrin-mediated adhesion in osteoblastic ROS 17/2.8 cells exposed to space-related conditions. *The FASEB journal*. 2001 Sep 1;15(11):2036-8.
- 42- Arase Y, Nomura J, Sugaya S, Sugita K, Kita K, Suzuki N. Effects of 3-D clino-rotation on gene expression in human fibroblast cells. *Cell biology international*. 2002 Mar 1;26(3):225-33.
- 43- Blaber EA, Dvorochkin N, Lee C, Alwood JS, Yousuf R, Pianetta P, Globus RK, Burns BP, Almeida EA. Microgravity induces pelvic bone loss through osteoclastic activity, osteocytic osteolysis, and osteoblastic cell cycle inhibition by CDKN1a/p21. *PloS one*. 2013 Apr 18;8(4):e61372.
- 44- Suga M, Iyonaga K, Okamoto T, Gushima Y, Miyakawa H, Akaike T, Ando M (November 2000). "Characteristic elevation of matrix metalloproteinase activity in idiopathic interstitial pneumonias". *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 162 (5): 1949–56. PMID 11069839. doi:10.1164/ajrccm.162.5.9906096.
- 45- Taylor SL, Rogers GB, Chen AC, Burr LD, McGuckin MA, Serisier DJ. Matrix metalloproteinases vary with airway microbiota composition and lung function in non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Annals of the American Thoracic Society*. 2015 May;12(5):701-7.
- 46- Rogers GB, Zain NM, Bruce KD, Burr LD, Chen AC, Rivett DW, McGuckin MA, Serisier DJ. A novel microbiota stratification system predicts future exacerbations in bronchiectasis. *Annals of the American Thoracic Society*. 2014 May;11(4):496-503.
- 47- Björklund M, Koivunen E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2005 May 25;1755(1):37-69.
- 48-V Jhala D, K Kale R, P Singh R. Microgravity alters cancer growth and progression. *Current cancer drug targets*. 2014 May 1;14(4):394-406.
- 49- Falo MC, Fillmore HL, Reeves TM, Phillips LL. Matrix metalloproteinase-3 expression profile differentiates adaptive and maladaptive synaptic plasticity induced by traumatic brain injury. *Journal of neuroscience research*. 2006 Sep 1;84(4):768-81.
- 50- Morita-Fujimura Y, Fujimura M, Gasche Y, Copin JC, Chan PH. Overexpression of copper and zinc superoxide dismutase in transgenic mice prevents the induction and activation of matrix metalloproteinases after cold injury-induced brain trauma. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2000 Jan;20(1):130-8.
- 51- Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature*. 1994 Jul 7;370(6484):61.
- 52-Kuscu C, Evensen N, Cao J. MMP14 (matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)).

53- Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. In Seminars in cancer biology 2010 Jun 30 (Vol. 20, No. 3, pp. 161-168). Academic Press.

Archive of SID

## Abstract:

Improving the skin in the chronic diseases such as diabetes and deep burns is more difficult and complex rather than the natural skin. One of the biggest problems for organ transplantations is the shortage of tissues or organs. So using the stem cells and tissue engineering scaffolds are very useful. Fat tissue has high amounts of stem cells compared to the bone marrow. Also ability of the fat tissue in cell allograft transplantations has been more attracted. Microgravity conditions have advantages such as three-dimensional cell culture systems without any scaffold and also tissue engineering for producing the tissue.

In this study, Adipose derived stem cells were cultured in the simulated microgravity conditions. Effects of simulated microgravity conditions were analyzed on Matrix metalloproteinase (MMPs) gene expressions. MMPs are the biggest group of proteinase that responsible for extra cellular matrix decomposition. Activity of this proteins changed in some physiological conditions such as wound healing. Results showed that the gene expression of the MMP2, TIMP1 and TIMP2 decrease but MMP14 and MMP3 increase after exposing in the microgravity conditions. Result of this study could be useful in the environmental space studies and also tissue engineering and repairing skin damage.

Key words: Adipose derived stem cells, Microgravity conditions, Matrix metalloproteinase



## **Final report of project**

Effects of simulated microgravity conditions on matrix metalloproteinase  
gene expressions in adipose derived stem cells

**Regeneration Research group**

**Tehran medical science branch of ACECR**

**By:**

Dr. seyed Mehdi Tabaie

Dr. Zahra Hajebrahimi

Dr. Mina Sadat Naderi

Farid Ebne Rasouli

Maryam Jahanshiri Moghadam

**2017**

Archive of SID