فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال نهم، شماره ۲، بهار ۱۳۹۶

القاء تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی امنتوم موش نژاد NMRI به سلول‌های اجدادی اندوتلیالی توسط عصاره جفت

مریم السادات نژادفاضل[۱]، کاظم پریور[۱]*، نسیم حیاتی رودباری[۱]، میترا حیدری نصرآبادی[۲]

[۱] گروه زیست شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

[۲] گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، ایران

*E.mail: Kazem_parivar@yahoo.com

تاریخ دریافت : ۹۶/۴/۲ تاریخ پذیرش: ۹۶/۴/۱۶

چکیده

سلول‌های بنیادی سلول‌های تمایز نیافته پرتوانی هستند که می‌توانند بعد از تمایز، سلول ها، بافت ها و اندام های مختلف بدن را تولید کنند. سلول‌های بنیادی، دارای دو ویژگی خود نوزایی و تمایز می باشند و توانایی ازدیاد و تکثیر و القا شدن در مجاورت با انواع فاکتورهای رشد را دارا می باشند. از آنجایی که عصاره جفت، حاوی مقدار زیادی VEGF می‌باشد، از آن برای القاء تمایز سلول‌های مزانشیمی امنتوم استفاده شد. از مهمترین سلول‌های بنیادی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی هستند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی امنتوم استخراج گردید و بنیادی بودن آنها توسط فلوسایتومتری و با مارکرهای مخصوص سلول‌های مزانشیمی یعنی مارکرهایCD105 ,CD73, CD44 CD90 و CD34 مورد اطمینان قرار گرفت. عصاره جفت نیز تهیه شد و پس از انجام تست MTT، درصد زنده مانی ۲۰درصدی را برای آن انتخاب کردیم. پس از ۲۱ روز مجاورت سلول‌های بنیادی مزانشیمی امنتوم با محیط کشت و ۲۰ درصد عصاره جفت، سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های اجدادی اندوتلیالی تمایز پیدا کردند. بیان مارکرهای CD73،CD90 و CD105 منفی و بیان CD31، FLK1 و CD34 مثبت بود. نمودار چرخه سلولی و طولانی شدن فاز G1 در هفته دوم تمایزی نسبت به گروه کنترل، نشان داد که سلول‌ها از مرحله تکثیر خارج شده و در مرحله تمایز قرار داشتند. سلول‌های مزانشیمی امنتوم در مجاورت با عصاره جفت، به سلول‌های اجدادی اندوتلیالی تمایز پیدا می‌کنند.

کلیدواژه‌ها: تست MTT، چرخه سلولی، فاکتورهای رشد، فلوسایتومتری، مارکرهای سلولی، VEGF

مقدمه

سلول‌های بنیادی سلول‌های تمایز نیافته‌ای هستند که توانایی تبدیل و تمایز به انواع مختلف سلول‌ها را داشته و دارای دو ویژگی مهم هستند که آنها را از سایر سلول‌ها متمایز می‌کنند. این سلول‌ها، توانایی تکثیر نامحدود دارند و در حالت متمایز نشده باقی می‌مانند. علاوه بر این، چنانچه در شرایط محیطی مناسب قرار بگیرند، قادرند به سلول‌های مورد نظر

تبدیل شوند[۱۸]. سلول‌های بنیادی می‌توانند تحت تاثیر بعضی شرایط فیزیولوژیکی یا آزمایشگاهی به سلول‌هایی با عملکردهای اختصاصی تبدیل شوند. سلول‌های بنیادی از لحاظ منشا به دو دسته عمده، سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی بالغ تقسیم می شوند[۲۶،۱۹]. از مهمترین سلول‌های بنیادی بالغ، سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای اولین بار از مغز استخوان در سال ۱۹٦٦ شناسایی شدند[۱۳]. در سال‌های اخیر، مهمترین منبع سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بوده است، اما سلول‌های بنیادی مزانشیمی را از منابع دیگر مثل بافت چربی، خون بندناف، غشای آمنیوتیک، پولپ دندان، خون محیطی، بافت پریوست استخوان، ماهیچه اسکلتی و امنتوم نیز جدا کرده اند[۲۷]. در بزرگسالان در هنگام جراحت و حتی در غیاب آن، به طور مداوم این سلول‌ها فعال هستند. قبلا دانشمندان فکر می کردند که سلول های بنیادی بزرگسالان، تنها سلول‌های همان بافت را ایجاد می‌کنند، اما امروزه اعتقاد بر این است که انعطاف پذیری این سلول‌ها بیش از آن می‌باشد و می‌توانند انواع دیگری از سلول‌ها را بسازند[۹]. تا کنون از عوامل زیادی برای تحریک تمایز این سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده شده است. از جمله: ۱- محرک‌های شیمیایی مانند Transforming growth factor beta3، انسولین، اسکوربیک اسید ۲- فسفات، B گلیسروفسفات، دگزامتازون و غیره[٦]. ۲- اتصال به ماتریکس خارج سلولی مانند کلاژن نوع۱، نمک‌های کلسیم، منیزیم، فلورید، ۳- مجاورت با سلول‌های دیگر مانند کندروسیت ها [١٤]، سلول‌های عصبی، سلول‌های عصاره مغزی[۳۰]، عصارهٔ کبدی[۳٦] و غیره. یکی از این مجاورت ها می‌تواند مجاورت سلول‌های بنیادی مزانشیمی با سلول‌های جفت (Placenta) باشد. زیرا جفت با داشتن عوامل محرک بسیاری که در بافت خود دارد منبع مناسبی از فاکتورهای رشد برای القاء تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد[۲۳]. جفت اندام واسطه‌ای بین مادر و جنین که در پستانداران تشکیل می شود و اکسیژن و مواد غذایی لازم را از مادر به جنین برای رشد و نمو آن انتقال می‌دهد. جفت علاوه بر جنبه‌های فیزیولوژیکی‌ای که دارد، از مواد تغذیه ای گسترده‌ای تشکیل شده است که از مهمترین آنها می توان موارد ذیل را نام برد. مانند اسیدهای آمینه، پروتئین‌های فعال، آنزیم‌ها، فاکتور های رشد، فاکتور محرک کلونی، اینترلوکینها، بنابراین جفت با دارا بودن چنین ترکیباتی می‌تواند به عنوان عامل محرک بسیار قوی و نیرومندی برای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی که مستعد تمایز هستند در نظر گرفته شود. جفت به علت ماهیت خود و مواد غنی‌ای که دارد پتانسیل زیادی برای کاربردهای پزشکی از قبیل درمان ناباروری و درمان سرطان و ترمیم دارد[٤۲]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی، هم چنین در بازسازی و ترمیم بافت‌های مختلف بدن به دنبال آسیب و جراحت موثر بوده و می‌توانند به درون بافت‌های آسیب‌دیده، پیوند زده شوند و جایگزین سلول‌های آسیب دیده شده و به ترمیم و رفع نقص در آن بافت بپردازند[۱۲]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی آن محل، فاکتورهای رشدی را بیان می‌کنند که موجب بهبود و ترمیم و همچنین رگ زایی در آن منطقه شود. فرایند درمان استخوان، با تولید پروتئین‌های استخوان ساز مانند BMP ها و پروتئین رگ‌زایی مانند فاکتور رشد فیبروبلاست (FGF) و یا فاکتور رشد اندوتلیال عروقی(VEGF) و غیره نجام می‌شود [۲۸]. برای اینکه یک بافت آسیب دیده ترمیم

شود، به همکاری مولکول‌های بسیاری نیاز دارد و حضور تک تک آنها مانند یک کار تیمی و گروهی ضروری است. از لحظه فعال شدن سلول‌های بنیادی تا تمایز کامل، بیان پروتئین‌هایی نظیر bFGF ، VEGF، HGF، IGF-1، TGF_B، (IL-1)، TGF، EGF، PDGF و غیره باید با همکاری یکدیگر، کار ترمیم رگ و رگزایی را با موفقیت به اتمام برسانند[۳۵]. منبع غنی جفت، و مولکول‌هایی که از خود سلول‌های مزانشیمی آزاد میشوند، تمام مولکول‌ها و هورمون‌ها را در اختیار هم قرار دادند تا چنین تمایزی صورت بگیرد. جفت علاوه بر جنبه‌های فیزیولوژیکی‌ای که دارد، از گروه‌های تغذیه‌ای گسترده ای تشکیل شده است که از مهمترین آنها می‌توان موارد ذیل را نام برد. اسیدهای آمینه مانند لوسین، لیزین، والین، ترئونین، ایزولوسین، گلایسین، آلانین و آرژنین، پروتئین‌های فعال، پروتئین‌هایی مانند آلبومین و گلوبولین، اسیدهای چرب مانند کلسترول، فسفاتیدیک اسید، لائوریک اسید و پالمیتیک اسید، کربوهیدرات‌ها مانند ویتامین B1, B2, B6, B12, C, D, E و نیاسین، موکوپلی ساکاریدها مانند هیالورونیک اسید و کوندروئیتین، مواد معدنی مانند کلسیم، سدیم، پتاسیم، فسفر، منیزیم، روی و آهن، اسیدهای نوکلوئیک مانند DNA, RNA و محصولات متابولیکی، آنزیم‌ها که نزدیک به ۱۰۰ نوع مختلف از آنها شناخته شده است مانند: اسید فسفاتاز، آلکالین فسفاتاز، هیالورونیداز و آدنوزین تری فسفات. جفت همچنین دارای فاکتورهای رشد بسیار زیادی می‌باشد که مهمترین آنها شامل موارد ذیل است: فاکتور رشد هپاتوسیتی (HGF)، فاکتور رشد نورونی (NGF)، فاکتور رشد اپیدرمی (EGF)، فاکتور رشد فیبرویلاستی (FGF)، فاکتورهای رشد شبه انسولینی (IGF). علاوه براین‌ها، دارای فاکتورهای رشدی نیز می‌باشد که موجب افزایش قدرت ایمنی بدن می‌شوند: فاکتور محرک کلونی (CSF)، اینترلوکین ۱- (IL-1)، اینترلوکین ۲- (IL-2)، اینترلوکین ۳- (IL-3)، اینترلوکین ٤- (IL-4)[٤٢]. پروتئین PLGF (Placental Growth Factor) یا فاکتور رشد جفتی نیز یکی از مهمترین پروتئین‌ها در تحریک آنژیوژنزیس جفتی است که در مژه‌های ترفوبلاستی جفت و سلول‌های اندوتلیال جنینی مانند سلول‌های HUVEC (Human Umblical Vein Endothelial Cell) بیان می‌شود و طی دوران جنینی باعث تشکیل عروق خونی در بافت جفت می‌گردد[۳]. PLGF در سایر بافت‌ها از جمله قلب، شش، عضله، تیروئید و بافت‌های چربی نیز در سلول‌های آندوتلیال، شناسایی شده است. بیان PLGF در ترفوبلاست‌ها، منوسیت‌ها و سلول‌های اریتروئید نیز گزارش شده است. این فاکتور در تومورها به عنوان یکی از فاکتورهای رگزایی قوی مطرح می‌باشد[۱۷]. بنابراین جفت می‌تواند به عنوان عامل محرک بسیار قوی و نیرومندی برای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های اندوتلیالی در نظر گرفته شود. PLGF یکی از اعضای خانواده VEGF می‌باشد VEGF. یک مولکول کلیدی در آنژیوژنز و عروق بافتی است که به طور خاصی در طول دوران جنینی بیان می‌شود. PLGF به طور مستقیم، موجب تحریک رگ زایی سلول‌های اندوتلیال و بلوغ سلول‌های دندریتیکی می‌شود و به طورغیر مستقیم، با استخدام سلول‌های ماکروفاژی، رگ زایی را تحریک می‌کند. PLGF همچنین به طور مستقیم و یا به صورت غیر مستقیم با فعال کردن سلول‌های استرومال موجب رشد تومور می‌شود. همچنین سلول‌های پیش‌سازی مانند سلول‌های پیش‌ساز گرفته شده از مغزاستخوان نیز با تاثیر PLGF، به سلول‌های

عامل‌های رگ‌زایی یعنی سلول‌های اندوتلیالی تبدیل می‌شوند[۱۱]. هدف ما از این آزمایش این بود که متوجه شویم سلول‌های مزانشیمی استخراج شده از بافت امنتوم در محیط غنی‌ای از مواد و فاکتورهای رشد، از کدامیک از آنها تاثیر گرفته و با کدام مسیر القایی القا شده و در نهایت به چه سلولی تمایز پیدا می‌کنند.

مواد و روش کار

جداسازی و کشت سلول های امنتوم

موش‌هایی که برای این کار مورد استفاده قرار گرفتند، موش‌های نوزادی بودند که نهایتا ۲۰ روزه بودند. بافت امنتوم به مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ ٪ قرار داده شدند تا ضد عفونی شود سپس در پتری دیش حاوی DMEM انتقال داده شدند و با قیچی و تیغ بیستوری به قطعات ریزی خرد شدند. قطعات بافت، تحت تاثیر تریپسین ۲۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور قرار گرفته، سپس سلول‌ها را از انکوباتور بیرون آورده و چندین بار توسط سرنگ پیپتاژ شدند و دوباره به مدت ۱۰دقیقه در انکوباتور قرار داده و باز، بعد از ۱۰ دقیقه پیپتاژ انجام شد تا سلول‌ها کاملا از هم جدا شوند. سپس محتویات پلیت را به فالکون منتقل کرده و در سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۲۰۰ و در دمای ٤ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. مایع رویی را دور ریخته و ته فالکون را که محتوی سلول‌ها بودند، به ۲ فلاسک انتقال داده شدند و ۳ میلی لیتر محیط کشت آماده شده حاوی DMEM، ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد پن استرپ، توسط سرنگ، از فیلتر سرسرنگی با قطر ۲۲/. عبور داده شد و داخل فلاسک و روی سلول‌ها ریخته شد. گنجایش فلاسک مورد استفاده ٤ میلی لیتر است ولی بار اول بهتر است فقط ۳ میلی لیتر محیط کشت ریخته شود، چون بعد از سه روز دیگر محیط کشت را تعویض نکرده و فقط محیط کشت تازه به آن اضافه کنیم تا سلول‌هایی که هنوز به ته ظرف نچسبیده‌اند، از محیط خارج نشوند. در فلاسک بسته و در انکوباتور Co_2 ۵٪ ، با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. محیط‌ها، هر ۳ روز یک بار تعویض شده و اولین پاساژ، پس از ۲۰ روز انجام شد. سلول‌های گرفته شده از امنتوم موش در طی ۱۵ روز یک بار پاساژ داده شدند. در طی٤٥ روز، ۳ بار پاساژ انجام شد[٤].

تهیه و آماده سازی عصاره جفت

برای جداسازی عصاره جفت جنین‌ها، درابتدا نکات ایمنی مربوط به جداسازی در نظر گرفته شد و قبل از عمل جراحی از سالم بودن موش‌های باردار، اطمینان حاصل گردید. پس از تشریح و استخراج جفت، در شرایط کاملا استریل، خون اضافی را با بافر شستشوی PBS(1x) حاوی 100 µg/mL streptomycin و 100 U/mL penicillin شستشو داده و با قرار دادن ظرف حاوی جفت بر روی یخ ان را در مدت زمان ۳۰ دقیقه به آزمایشگاه انتقال داده شد. پروتکل جداسازی از جفت برای هر ۲۰ گرم از نمونه در نظر گرفته شد. در ابتدا، برای حذف کردن گلبول‌های قرمز، از بافر شتشوی(50 mMTris–HCl, 150 mM NaCl, 150 mM sucrose, pH 7.2) در دمای4 °C استفاده شد. بافت شستشو داده شده، به قطعات بسیار ریز تقسیم شدند. این قطعات، به یک لوله فالکون ۵۰ میلی لیتری انتقال داده شدند. سپس بافر همگن 0.32 M sucrose, DMEM high glucose, 2mM EDTA به میزان ۱۵ میلی لیتر به آنها اضافه شده و در داخل یک بشر حاوی یخ به دستگاه

سونیکاسیون انتقال داده شدند. بافت‌ها طبق پروتکل (amplitude 60, pulse 4, 45s, repeat 8) سونیکه شده و به شکل یک مخلوط کاملا همگن درآمدند. محتویات فالکون برای بدست اوردن عصاره جفت طبق شرایط 170 g for 15 min at 4°C سانتریفیوژ و نهایتا به صورت الیکه در دمای C °80- نگه داری شدند[۲٤].

تعیین مقدار مناسب عصاره جفت توسط تستMTT

آزمون بر اساس روش آزمون سمیت سلولی MTT و در پلیت ۹٦ خانه ای انجام گرفت. در آزمون MTT ابتدا بایستی تعداد مناسبی سلول، (ترجیحا تعداد$۱۰^{٤}$ × ٤ سلول در هرچاهک) را در هر یک از چاهک‌ها کشت داده، اجازه داد تا سلول‌ها به کف پلیت چسبیده و به حالت پایدار خود درآیند. سپس چاهک‌های کنترل و آزمایش انتخاب شده و مقادیر مناسبی از ماده مورد آزمون، به چاهک‌های تست اضافه شد و پلیت را تا زمان‌های مورد نیاز جهت تاثیر عصاره جفت، به انکوباتورCO2، منتقل گردید(۳۳). دوزهای فرضی درنظر گرفته عبارت بود از: دوز ۵، ۱۰، ۲۰، ٤۰، ۸۰ و ۱۰۰ درصد. ابتدا، غلظتهای مختلفی از عصاره جفت، بر روی سلول های مزانشیمی ریخته شد و پس از گذشت ۲٤، ٤۸ و۷۲ ساعت با کمک دستگاه ELISA-reader مورد آزمایش قرار گرفتند[۱] و نتایج حاصله به صورت درصد بقای سلولی در برابر غلظت عصاره گزارش شد.

نتایج

تست اثبات بنیادی بودن سلول‌های امنتوم توسط روش فلوسایتومتری

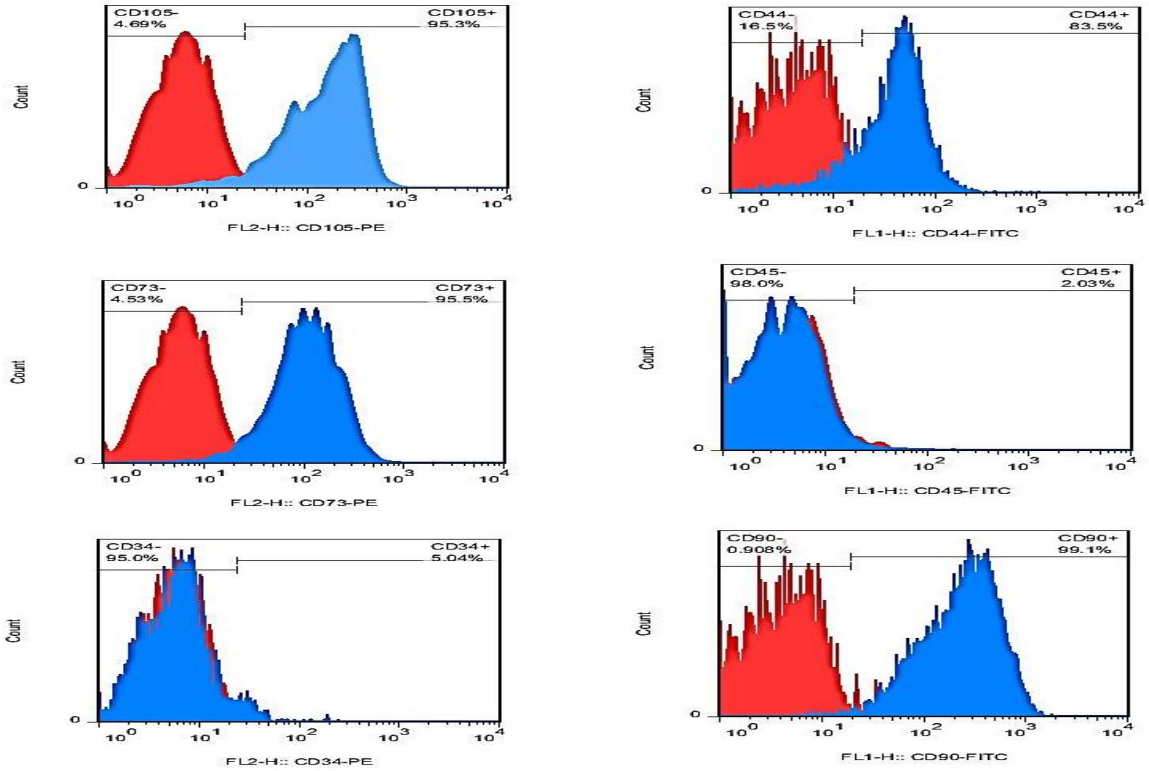
پس از سومین پاساژ، یکی از فلاسک‌ها به مرکز انتقال خون تهران انتقال داده شد تا بنیادی بودن این سلول‌ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر اثبات گردد. در این روش، ٦ آنتی بادی، مورد آزمایش قرار گرفته و سنجیده شد که شامل: CD45, CD44, CD90 ,CD34, CD73, وCD105 بود. یک لوله کنترل منفی یا unstain کنترل نیز به عنوان گروه کنترل درنظر گرفته شد که همه گروه‌ها نسبت به این گروه سنجیده شوند. در این لوله آزمایش فقط نمونه‌های سلولی قرار داشتند و هیچ یک از آنتی بادیها و کنژوکه ها در آن حضور نداشتند. [۳۹]. سلول‌ها پس از سومین پاساژ، با استفاده از تریپسین، جداسازی شدند و به مقدار $۱۰^{٥}$ سلول، در حجم ۱۰۰ میکرولیترPBS سوسپانس شدند. سپس هر یک از آنتی‌بادی‌های ذکر شده به مقدار۳ میکرولیتر به آن اضافه شد. پس از اضافه کردن آنتی بادی ها، نمونه ها در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس باPBS به حجم ۵۰۰ میکرولیتر شستشو داده شدند و همچنین به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۱۵۰۰ سانتریفیوژ شدند. بعد محلول رویی برداشته شد و حجم ۲۵۰ میکرولیتر PBS، اضافه شد و سپس نمونه‌ها در دستگاه فلوسایتومتری BD FCES Calibur. USA، مورد خوانش قرار گرفته و نتایج، توسط نرم افزار flowjo (version 7.6.1)، آنالیز شدند. سلول‌های بنیادی، با بیان منفی CD34 و 45 و بیان مثبت 105, 90, 44 CD 73, تشخیص داده می شوند (تصویر ۱).

محاسبه درصد بقای سلولی:

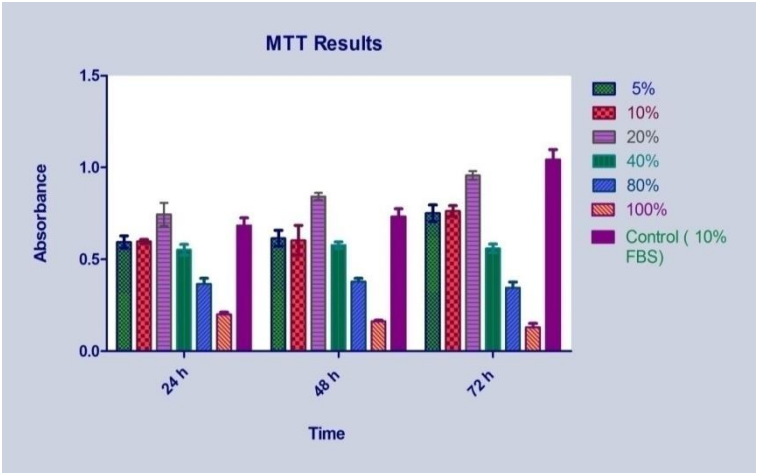
درصد بقای سلولی این گونه محاسبه گردید:

میزان بقای سلولی = (جذب نوری کنترل/ جذب نوری تست)_ ×100

با بدست آوردن مقادیر جذب‌نوری در مقابل تعداد سلول مربوطه منحنی استاندارد را رسم کردیم (تصویر ۲). از آنجایی که در سلول‌های بیشتر و فعال تر، میزان رنگ ایجاد شده بیشتر است. با استفاده از میزان جذب‌های خوانده شده میزان درصد زنده ماندن (viability%) سلول‌ها، پس از مواجهه با عصاره جفت، تعیین گردید. با توجه به نتایج نمودار، دوز ۲۰درصد، مناسب ترین دوز در نظر گرفته شد [۳۳].



تصویر ۱: نمودار هیستوگرام فلوسایتومتر، برای مارکرهای CD34, CD105, CD73, CD44, CD45, CD90. نمودارهای هیستوگرام نشان داد که سلول های مزانشیمی مارکرهای CD105, CD73, CD44, CD90 را بیان کردند ولی مارکرهای CD45 وCD34 را بیان نکردند.

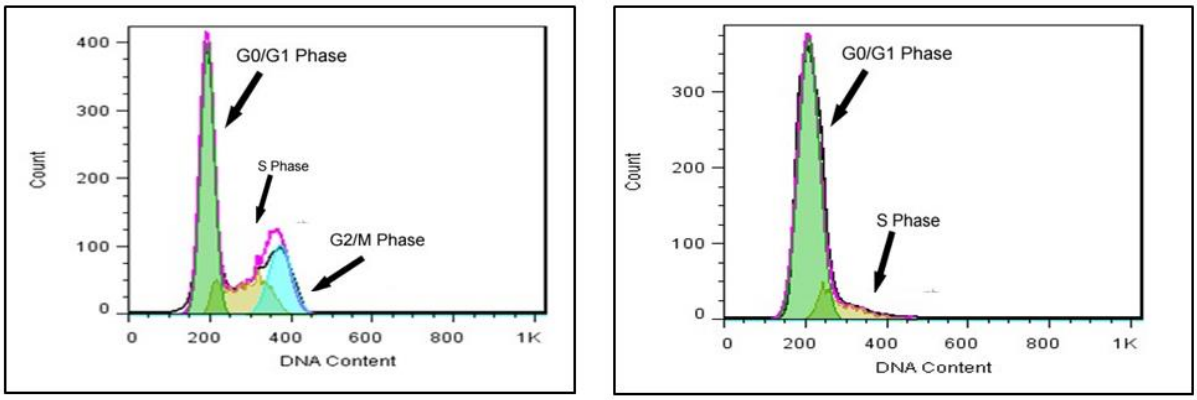


تصویر ۲: نتایج حاصل از تست MTT برای تعیین مقدار عصاره جفت. میله بنفش راه راه، بیشترین تعداد سلول های زنده را در ساعت های ۲٤، ٤٨ و ۷۲ ساعت را نشان داد که این میله مربوط به نمونه های سلولی کشت داده شده با ۲۰درصد عصاره جفت بود.

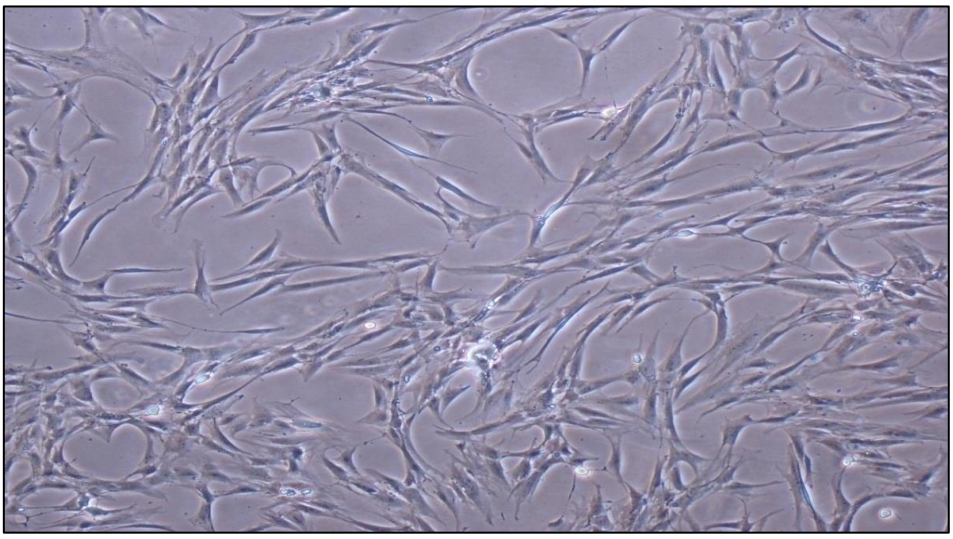
تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های اندوتلیالی توسط عصاره جفت و اثبات آن

سلول‌های مزانشیمی در معرض تیمار با ۲۰درصد عصاره جفت قرار گرفتند و هر هفته با میکروسکوپ اینورت بررسی شدند تا روند تغییرات ظاهری آنها نیز مشاهده شود (تصویر ٤).

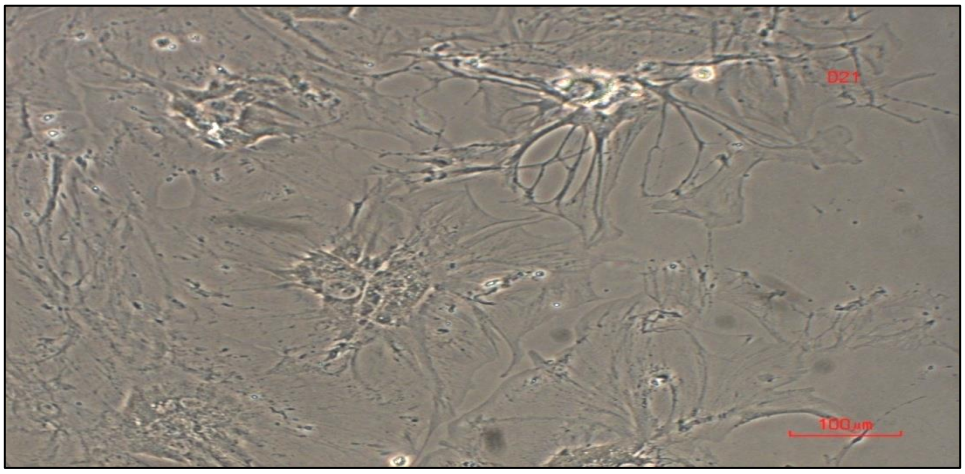
پس از ۲۱ روز تمایزی، تغییر شکل قابل ملاحظه‌ای در سلول ها مشاهده شد (تصویر ٥). بنابراین روش های اثبات تمایزی آغاز شد. به این صورت که مجددا بیان مارکرهای مزانشیمی CD73, CD90, CD105 و همچنین مارکرهای مخصوص سلول های اندوتلیالی CD34، CD31 و FLK1 مورد سنجش قرار داده شدند [۱۰] (تصویر ٦). در بیان مارکرهای مزانشیمی نسبت به تست اول، بیان CD105، CD73 و CD90 به شدت کاهش یافته ولی افزایش ۸/٥ درصدی ای در بیان مارکر CD34 مشاهده شد. بیان ٦٨ درصدی CD31 و ۱۸ درصدی FLK1 نیز نشان داد که سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های اندوتلیالی تمایز یافته‌اند. تشخیص بیان مارکرهای CD31، CD34 و همچنین FLK1 از اصلی‌ترین روش‌های تشخیص سلول های اندوتلیالی به حساب می‌آید [۱۰و۲۹].



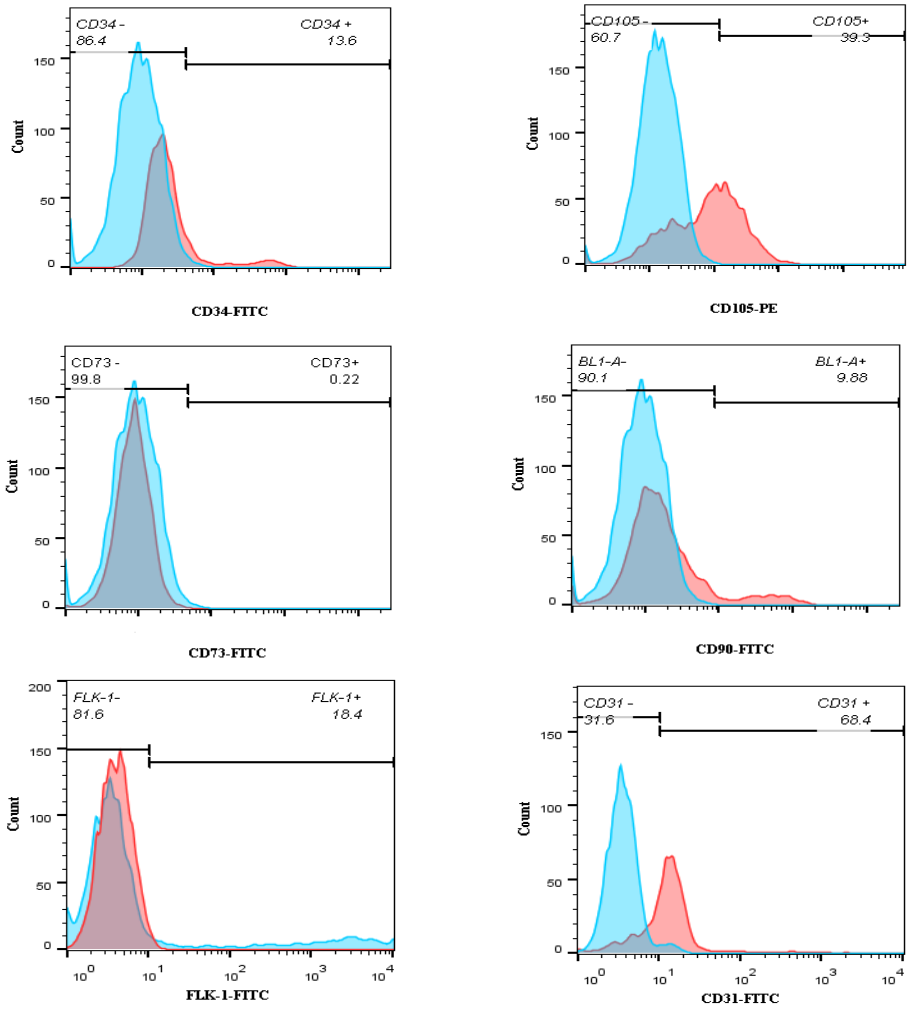
تصویر ۳: نمودار هیستوگرام سمت چپ: چرخه سلولی سلول‌های مزانشیمی گروه کنترل و نمودار سمت راست: چرخه چرخه سلولی سلول‌های مزانشیمی تیمار شده با عصاره جفت را نشان می دهد.



تصویر ٤: تصویر میکروسکوپی اینورت از سلول های مزانشیمی امنتوم چسبیده به کف فلاسک پس از گذشت یک هفته با بزرگنمایی 400 ×



تصویر ۵: مورفولوژی سلول‌های تمایز یافته به سلول‌های پروجنیتور اندوتلیالی پس از ۲۱ روز مجاورت دادن با عصاره جفت با اسکالبار 100 µm



تصویر ٦: نتایج نمودار هیستوگرام فلوسایتومتری مجدد برای بیان مارکرهای CD73,CD90,CD105,CD34 سلول های مزانشیمی، پس از طی ۲۱ روز تمایز و همچنین مارکرهای مخصوص سلول های اندوتلیالی CD31 و FLK1 . نمودارها کاهش بیان CD73, CD105 و CD90 و افزایش بیان CD34 و همچنین بیان مثبت مارکرهای CD31 و FLK1 را نشان دادند.

بحث

سلول بنیادی منشا تمام سلول‌ها است و توانایی تبدیل به انواع سلول‌های بدن را دارد. این سلول‌ها توانایی خود نوسازی و تمایز به انواع سلول‌ها از جمله سلول‌های خونی، قلبی، عصبی و غضروفی را دارند [۵]. سلول‌های بنیادی بزرگسال، Adult Stem Cells یا سلول‌های بنیادی سوماتیک، سلول‌های بنیادی‌ای هستند که پس از مراحل رشد جنین و در سرتاسر طول عمر در بافت‌های مختلف بدن حضور دارند و با تقسیم و تمایز سلول‌های مرده را جایگزین و بافت‌های آسیب‌دیده را ترمیم می‌کنند. سلول های بنیادی خون‌ساز، عصبی و مزانشیمی مثال‌هایی از سلول‌های بنیادی بزرگسال هستند. تا کنون مهمترین منبع سلول‌های بنیادی بالغ مزانشیمی، مغز استخوان بوده است. اما این سلول‌های بنیادی را از منابع دیگری مانند بافت چربی، پولپ دندان، خون، بافت امنتوم، خون بند ناف و غیره جدا کردند[۳۲،٤۱]. سلول‌های امنتوم نیز مجموعه ای از سلول‌های فیبروبلاستی است که متشکل از جمعیت سلولی هتروژن می‌باشد و دارای خاصیت نوزایی هستند و می‌توانند در صورت جراحت یا آسیب دیدگی در بدن به صورت طبیعی به انواع سلول‌ها تمایز پیدا کنند. بنابراین این، این سلول‌ها نیز ویژگی القا شدن و تمایز به انواع سلول‌ها را در شرایط آزمایشگاهی خواهند داشت[٤۰،۳٤]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC) سلول‌های پرتوانی هستند که می تواند به انواع مختلفی از سلول‌ها تمایز پیدا کنند و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) یکی از عوامل اصلی شروع و تنظیم رگ‌زایی است که می‌تواند سلول‌های بنیادی مزانشیمی را برای تمایز به سلول‌های اندوتلیالی (ECS)القا کند [۳۷]. در این پژوهش، هدف ما این بود که سلول‌های مزانشیمی امنتوم را در مجاورت با عصاره جفت که منبع سرشاری از فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) و همچنین هورمون‌ها و فاکتورهای رشد است قرار داده و محیط مناسبی را برای القاء آنها به سمت سلول‌های اندوتلیالی فراهم نماییم. پروتئین Placental Growth Factor (PLGF) یا فاکتور رشد جفتی، یکی از مهمترین پروتئین‌ها در تحریک آنژیوژنزیس جفتی است که در مژه‌های ترفوبلاستی جفت و سلول‌های اندوتلیال جنینی بیان می‌شود و طی دوران جنینی باعث تشکیل عروق خونی در بافت جفت می‌گردد[۳]. PLGF در سایر بافت‌ها از جمله قلب، شش، عضله، تیروئید و بافتهای چربی نیز در سلول های آندوتلیال، شناسایی شده است. بیان PLGF در ترفوبلاست‌ها، منوسیت ها و سلول‌های اریتروئید نیز گزارش شده است. این فاکتور در تومورها به عنوان یکی از فاکتورهای رگزایی قوی مطرح می‌باشد. PLGF یکی دیگر از اعضای خانواده VEGF می‌باشد که از فاکتورهای رشد سلول‌های آندوتلیال عروق خونی به حساب می‌آیند. VEGF یک مولکول کلیدی در آنژیوژنز و عروق بافتی است که به طور خاصی در طول دوران جنینی بیان می شود. مهمترین منبع PLGF در دوران بارداری تروفوبلاست جفتی است[۲۳]. فاکتور PLGF علاوه بر خصوصیات ذکر شده، خاصیت دیگری نیز دارد که آن، نقش مهار کنندگی در تبدیل و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به رده استخوانی و غضروفی می‌باشد[۲۱]. سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال موجود در گردش خون محیطی برای اولین بار، توس آساهارا و همکارانش در سال ۱۹۹۷، جداسازی و توصیف شدند. این محققین توانستند سلول‌های $CD34^+$را از خون محیطی انسان با استفاده از میکروبیدهای مغناطیسی جداسازی کنند. این

سلول‌ها بر روی سطوح پوشش داده شده با فیبرونکتین رشد کرده و به سلول‌هایی با ویژگی سلول‌های اندوتلیال تبدیل شدند[۱۶]. چند سال بعد، در طی مطالعات جداگانه، ۳ مارکر کشف شد که قادر به شناسایی سلول‌های پیش ساز اندوتلیال عملکردی می‌باشند. این سلول‌ها انواع مختلفی از مارکرها را با شدت مختلف بیان می کنند که این مارکرها مختص رده سلولی اندوتلیالی می‌باشند، از جمله آن‌ها می‌توان به VE–cadherin, E-selectin, (CD31) PECAM-1, Von-Willbrand factor, eNOS (Endothelial nitric oxide synthase) اشاره کرد[۲۲،۲۰]. همچنین بیان ژن‌های CD31، VE-cadherin، VEGFR-2(KDR) و آنتی ژنهای CD14 وCD34 را در سلول‌های پیش ساز اندوتلیالی می‌توان مشاهده کرد[۳۸]. سلول‌های مزانشیمی در محیط کشت آزمایشگاهی و زمانی که در معرض فاکتور رشد اندوتلیال عروقی VEGF قرار می‌گیرند به سلول اندوتلیالی تمایز پیدا می‌کنند. FLK-1 گیرنده‌ای برای فاکتور رشدVEGF است که در هر دو دسته سلول های هماتوپویتی اولیه و سلول‌های اندوتلیال بیان می‌شود اما بیان آن در سلول‌های هماتوپویتی تمایز یافته از دست می‌رود. +FLK-1 در موش، همان VEGFR-2 است. دانشمندان با تکیه براین واقعیت و در جهت اثبات این فرضیه که خون محیطی حاوی سلول‌هایی است که میتوانند به سلول‌های اندوتلیال تمایز پیدا کنند، اقدام به جداسازی سلول‌های +CD34 و +FLK-1 از خون محیطی موش نموده و پس از کشت آن‌ها در شرایط خاص آزمایشگاهی توانستند آن‌ها را به سلول‌های اندوتلیال تمایز دهند [۳۷]. از این موضوع برای اثبات آزمایشاتمان استفاده کردیم. با توجه به نتایج نمودارهای فلوسایتومتری، بیان FLK-1 و CD34 حاکی از تمایز سلول‌های مزانشیمی مورد آزمایش ما به سلول‌های اندوتلیالی بود. برای اینکه یک بافت آسیب دیده ترمیم شود، به همکاری مولکول‌های بسیاری نیاز دارد و حضور تک تک آنها مانند یک کار تیمی و گروهی ضروری است. با توجه به مولکول-هایی مانند VEGF, HGF, IGF-1, TGF_B, bFGF و غیره باید با همکاری یکدیگر، کار ترمیم رگ و رگزایی را با موفقیت به اتمام برسانند و آزمایش ما، این محیط مناسب را برای تبدیل سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های رگ ساز، فراهم کرد[۳۵،۷]. منبع غنی جفت، می تواند تمام مولکول‌ها و هورمون های مورد نیاز برای یک القاء موفقیت آمیز را فراهم نماید. جفت دادای فاکتور محرک کلونی(CSF) که موجب القاء رشد سلول‌های بنیادی مانند سلول‌های گرانولوسیت وابسته به ایمنی و ماکروفاژها است و همچنین اینترلوکین۱، القاء کننده تولید سلول‌های وابسته به ایمنی، مانندT سل‌ها، B سل‌ها و NK سل‌ها، سلول‌های تیموس، و لنفوسیت ها و اینترلوکین۲ القاء کننده رشد Tسل‌ها و اینترلوکین۳ القاء رشد سلول‌های خونساز، و ماست سل‌ها و در نهایت اینترلوکین٤ که موجب القاء رشد B سل‌ها، و القاء تقسیم سلول‌های تولید کنندۀ آنتی‌بادی را هم دارا می‌باشند[٤٢]. لانه‌گزینی جنین نشان دهنده یک مرحله مهم از روند باروری و یک پدیده بیولوژیکی منحصر به فرد است. تکوین و رشد جنین پستان داران بستگی به توانایی اتصال جنین و سلول‌های تروفوبلاست به سطح رحم مادر و حمله سریع آن دارد که تضمین کننده لانه‌گزینی موفق می‌باشد. بعد از حمله به آندومتر مادر، رشد و نمو جنین با رشد چشمگیر غشاهای عروقی و تشکیل جفت مشخص می‌شود که به طور عمده توسط سیستم VEGFتنظیم می‌شود. توسعه یک شبکه

بزرگ عروقی جفت برای رشد و نگهداری از جنین در حال رشد و نمو ضروری است. عوامل متعددی در این فرایند نقش دارند و از جمله مهم ترین آنها در این فرایند رگزایی، VEGF یا فاکتور رشد اندوتلیال عروقی و PDGF فاکتور رشد مشتق از پلاکت یا همان عامل فعال کننده پلاکت میباشند[۲۵]. VEGF باعث آنژیوژنز شده و نفوذپذیر کردن عروق خونی را افزایش می‌دهد. VEGF و گیرنده‌های آن هم در آندومتر و هم در سلول‌های تروفوبلاستیک بیان می‌شود. بیان VEGF mRNA را می توان به راحتی در بلاستوسیست شناسایی کرد. با توسعه جفت، یکی دیگر از عوامل رگزایی، یعنی، PLGF (فاکتور رشد جفت) عامل رگ زایی می‌شود و بیان آن به شدت بالا می‌رود. نمایش شماتیکی از بلاستوسیست لانه گزین شده است که به طور برجسته، تعامل بین تروفوبلاست و سلول‌های آندومتر، از جمله اینتگرین، فاکتورهای رشد و سایتوکاین‌ها، هورمون‌ها و آنزیم پروتئاز را نشان می‌دهد [۳۱]. نتایج تحقیق حاضر حاکی از آن است که سلول‌های مزانشیمی امنتوم نیز مجموعه‌ای از سلول‌های فیبروبلاستی هستند که متشکل از جمعیت سلولی هتروژن بوده و دارای خاصیت نوزایی هستند و می توانند در صورت جراحت یا آسیب دیدگی در بدن به صورت طبیعی به انواع سلول‌ها تمایز پیدا کنند. بنابراین این، این سلول ها نیز ویژگی القا شدن و تمایز به انواع سلول‌ها را در شرایط آزمایشگاهی خواهند داشت[۳٤،٤۰]. در این پژوهش، نشان داده شد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از امنتوم، در مجاورت با عصاره جفت که یک منبع سرشار از VEGF به حساب می‌آید، به سمت سلول‌های اجدادی اندوتلیالی القا شده و تمایز پیدا می‌کنند و در نتیجه عصاره جفت با دارا بودن VEGF فراوان، می‌تواند منبع مناسبی برای القاء تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سمت سلول‌های اندوتلیالی به حساب بیاید. جفت به علت دارا بودن هورمون‌ها و فاکورهای رشد فراوان، پتانسیل زیادی برای کاربردهای پزشکی، درمان و ترمیم خواهد داشت.

منابع

[1] Arechabala, B., Coiffard, C., Rivalland, P., Coiffard, LJ., de, Roeck-Holtzhauer Y. 1999. Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release. J ApplToxicol; 19(3): 163-165.

[2] Ataie nejad, N., Amidi, F., Agha Hoseini, M., Nayer Nia, K., Habibi, M, Kajbafzadeh, A., *et.al*. 2014. Male germ-like cell differentiation potential of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in co-culture with human placenta cells in presence of BMP4 and retinoic acid. Iranian Journal of Basic Medical Sciences ijbms.mums.ac.ir.

[3] Athanassiades, A., Lala, PK. 1998. Role of placenta growth factor (PIGF) in human extravillous trophoblast proliferation,migration and invasiveness. Placenta; 19: 465-73.

[4] Aurich, H., Sgodda, M., Kaltwasser, P., Vetter, M., Weise, A., Liehr, T., *et.al*. 2007. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from rat peritoneal adipose tissue in vitro and in vivo. Exp Cell Res; 313:2875-86.

[5] Baksh, D., Song, L., Tuan, RS. 2004. Adult mesenchymal stem cells. Characterization, differentiation and application in cell therapy. Mol Med; 8: 301-136.

[6] Bruder, SP., Jaiswal, N., Haynesworth, SE. 1997. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. J Cell Biochem. Feb;64(2):278-94.

[7] Cai, L., Johnstone, BH., Cook, TG., Tan, J., Fishbein, MC., Chen, PS., March, KL. 2009. Ifats collection: human adipose

tissue-derived stem cells induce angiogenesis and nerve sprouting following myocardial infarction, in conjunction with potent preservation of cardiac function. Stem Cells;27:230-7.

[8] Calder, A., Roth-Albin, I., Bhatia, S., Pilquil, C., Hee Lee, J., Bhatia, M., *et.al*. 2012. Lengthened G1 Phase Indicates Differentiation Status in Human Embryonic Stem Cells. Draper. Stem Cells and Development. July, 22(2): 279-295.

[9] Cole, RJ., Edwards, RC., Poul, j. 1964. Cytodifferentiation in cell colonies and cell strains derived from cleaving ova and blastocysts of the rabbit. J Exp Cell Res ;1: 501-4.

[10] Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, FC., Krause, DS., *et.al*. 2006. POSITION PAPER. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Vol. 8, No. 4, 315_ 317.

[11] Fischer, Ch., Mazzone, M., Jonckx, B., Carmeliet, P. 2008. Nature Reviews Cancer 8, 942-956.

[12] Friedenstein, AJ., Deriglasova, UF., Kulagina, NN., Panasuk, AF., Rudakowa, SF., Luriá, EA., *et.al*. 1974. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay methods.Exp Hematol; 2: 83-92.

[13] Friedenstein, AJ., Petrakova, KV. 1966. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. J Embryol Exp. Morph 16(3): 581 -390.

[14] Gerstenfeld, LC., Barnes, GL., Shea, CM., Einhorn TA. 003. Osteogenic differentiation is selectively promoted by morphogenetic signals from chondrocytes and synergized by a nutrient rich growth environment. Connect Tissue Res. 44 Suppl 1:85-91.

[15] Hill, JA. 2001. Maternal-Embryonic Cross-Talk. Ann N Y Acad Sci, 943:17-25.

[16] Histov, M., Er, W., Weber, PC. 2003. Endothelial Progenitor cells, isolation and characterization. Trends Cardiovasc Med. Jul;13(5):201-6.

[17] Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, MS., Wildiers, H., Van Oosterom, AT., De Bruijn, EA. 2004. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. Pharmacol Rev; 56: 549-80.

[18] Jiang, Y., Jahagirdar, BN., Reinhardt, RL., Schwartz, RE., Keene, CD., Ortiz-Gonzalez, XR., *et.al*. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature. Jul 4;418(6893):41-9.

[19] Johansson, CB., Momma, S., Clarke, DL., Risling, M., Lendahl, U., Frisén, J. 1999. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. Cell. Jan 8;96(1):25-34.

[20] Kalka, C., Masuda, H., Takabashi, T., Kalka-Moll, WM., Silver, M., Kearney, M., *et.al*. 2000. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. Proc Natl Acad Sci USA; 97: 3422-3427.

[21] Karantalis, V., Joshua, M. 2015. Hare Use of Mesenchymal Stem Cells for Therapy of Cardiac Disease. Circ Res. 116:1413-1430. DOI:10.1161/CIRCRESAHA. 116.303614.

[22] Kaushal, S., Amicl, GE., Gulescrian, KJ., Shapira, OM., Perry, T., Sutherland, FW., *et.al*. 2001. Functional smalldiameter neovesscls crcated using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. Nat Med; 7:1035-1040.

[23] Khalil, A., Muttukrishna, S., Harrington, K., Jauniaux, E. 2008. Lumbiganon, Pisake, ed. "Effect of antihypertensive therapy with alpha methyldopa on levels of angiogenic factors in pregnancies with hypertensive disorders". PLoS ONE. 3 (7): e2766. doi:10.1371/journal. pone.0002766. PMC 2447877- PMID 18648513.

[24] Mark Skehel, J. 2004. Preparation of Extracts From Animal Tissues. From: Methods in Molecular Biology, vol. 244: Protein Purification Protocols: Second Edition Edited by: P. Cutler, Humana Press Inc., Totowa, NJ.

[25] Meirelles Lda, S., Fontes, AM., Covas, DT., Caplan, AI. 2009. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. Cytokine Growth Factor. Rev;20:419–27.

[26] Morrison, SJ., White, PM., Zock, C., Anderson, DJ. 1999. Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent

mammalian neural crest stem cells. Cell. Mar 5;96(5):737-49.
[27] Musina, RA., Eqorov, EE., Beliavski, AV. 2004. Stem cells: properties and perspectives of therapeutic use. Mol Biol(mosk); 38: 563-77.
[28] Nauth, A., Miclau, T., Li, R., Schemitsch, EH. 2010. Gene therapy for fracture healing. J Orthop Trauma. 24(Suppl 1):S17–24.
[29] Pusztaszeri, MP., Seelentag, W., Bosman, FT. 2006. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. J Histochem Cytochem. Apr; 54(4):385-95.
[30] Rezanejad Keshteli, F., Parivar, K., Joghatayi, M., Ali Beik, H. 2014. Study of the differentiation of rat omentum stem cells to nerve cells using brain tissue extract of Wistar rats. Volume 2014; Article ID ijcmb-00009.
[31] Roberts, J.M., Gammill, H.S., Maglione, D., Guerriero, V., Viglietto, G., Delli-Bovi, P., *et.al*. 2009. The biochemistry and role of placental growth factor (PlGF). 1244-9917-01.
[32] Schipani, E., Kronenberg, H.M. 2009. Adult mesenchymal stem cells. January 31, StemBook, ed. The Stem Cell Research Community, StemBook, doi:10.3824:stembook.1.38.1.
[33] Shokrzadeh, M., Ebrahimnejad, P., Omidi, M ., Shadboorestan, A., Zaalzar, Z. 2012. Cytotoxity Evaluation of Docetaxel Nanoparticles by Culturing HepG2 Carcinoma Cell Lines .Volume 22, J Mazandaran Univ Med Sci 2012, 22(90): 2-10.
[34] Scholer, HR., Ruppert, S., Suzuki, N., Chowdhury, K., Gruss, P. 1990. New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. Nature. Mar 29;344(6265):435-9.
[35] Sohni, A., Verfaillie, 2013. CM. Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. Stem Cells Int. Volume 2013, Article ID 130763, 8 pages. 130763:20132013.
[36] Solati Sarvandi, S., Taghi Joghataei, M., Parivar, K., Khosravi, M., Sarveazad,A., Sanadgol, N. 2014. In vitro differentiation of rat mesenchymal stem cells to hepatocyte lineage. Iranian Journal of Basic Medical Sciences ijbms.mums.ac.ir
[37] Son, BR., Marquez-Curtis, LA., Kucia, M. 2006. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. Stem Cells. 24:1254–1264.
[38] Wang, N., Zhang, R., Wang, SJ., Zhang, CL., Mao, LB., Zhuang, CY., *et.al*. 2013. Vascular endothelial growth factor stimulates endothelial differentiation from mesenchymal stem cells via Rho/myocardin-related transcription factor a signaling pathway. Int J Biochem Cell Biol. Jul;45(7):1447-56. doi: 10.1016/j.biocel.2013.04.021.
[39] Williams, RL., Hilton, DJ., Pease, S., willson, TA. 1988. Myeloid leukemia inhibitory factor maintans the development potential of embryonic stem cells. Neture; 336:684-7.
[40] Witowski, J., Jorres, A. 2006. Technological Advances in peritoneal Dialysis research peritoneal cell .culture, fibroblast, 26, 292-299.
[41] Xi, J., Yan, X., Zhou, J., Yue, W., Pei, X. 2013. Mesenchymal stem cells in tissue repairing and regeneration: Progress and Future. Burns and Trauma; 1(1): 13-20.
[42] Yoshida, K. 2001. Director of the Yoshida Clinic. Placenta Power: For Health and Beauty A useful guide for those seeking placenta-based remedies. Director of the Yoshida Clinic.