فصلنامه میکروبیولوژی کاربردی و بیوتکنولوژی
شماره پیاپی ۱، جلد ۱، شماره ۱، زمستان ۹۱، صفحه ۹ تا ۱۴

بررسی تأثیر عصارهٔ کبدی جنینی بر سلول های بنیادی مزانشیمی بند ناف به سلول های کبد

کاظم پریور[۱]، نسیم حیاتی[۱]، **سحر خرقانی**[۲]
۱- دانشگاه آزاد اسلامی، تهران واحد علوم تحقیقات، گروه زیست شناسی
۲-دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست شناسی ***saharirkh83@gmail.com***

تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۱۸تاریخ پذیرش:۹۱/ ۷/۳۰

چکیده

سلول های بنیادی سلول هایی با پتانسیل تمایزی گسترده شمال، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست شناسی، در مراحل مختلف تکوینی هستند که می‌توانند در ترمیم و بازسازی یک بافت صدمه دیده ایفای نقش کنند. این سلول ها دارای ویژگی خود نوزایی بوده و قادرند برای مدت طولانی سلول‌های مشابه خود را تولید کنند، این خصوصیات سلول های بنیادی را کاندید مناسبی در درمان بیماری هایی نظیر بیماری های مزمن کبدی، پارکینسون، آلزایمر و ... نموده است. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر عصارهٔ کبد بر روی تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی بافت بند ناف جنین موش NMRI به سلول های کبدی بوده که در این مسیر تمایزی سلول های شبه هپاتوسیتی حاصل شدند. در مسیر تمایز سلول های مزانشیمی با مورفولوژی دوکی شکل به سلول‌های شبه هپاتوسیتی با مورفولوژی سلول هایی چند وجهی، هستهٔ درشت و سیتو پلاسم دانه‌دار تبدیل شدند.گلیکوژن در سلول های تمایز یافته استفاده شد که نتیجهٔ آن مثبت بود و دانه‌های گلیکوژن در سلول های تمایز یافته به رنگ قرمز ظاهر گردیدند. از تست پریودیک اسید شیف نیز جهت اثبات این مورد استفاده شد.

در این مطالعه از سلول های بنیادی مزانشیمی بند ناف جنین موش مادهٔ باردار ۱۴تا ۱۷ روزه استفاده شد. سلول های بند ناف توسط محلول آنزیم تریپسیناز انکوبه گردیدند و به دنبال آن از طریق عمل مکانیکی پیپت کردن، سوسپانسیون سلول های حاصله در پلیت های کشت سلولی ۱۲ خانه کشت داده شدند. از کیت تشخیص آلکالین فسفاتاز نیز جهت شناسایی سلول‌های بنیادی تمایز نیافته استفاده گردید. پس از گذشت ۳۰ روز از کشت سلول های مزبور از تست پریودیک اسید شیف برای شناسایی سلول‌های شبه کبدی استفاده گردید. عصارهٔ کبدی را با دوز های متفاوت (۱۵، ۳۰، ۴۰، ۵۰ لاندا) برای القای سلول های بنیادی مزانشیمی استفاده گردید که نهایتاً نتایج در چهار گروه تجربی دسته بندی گردیدند.

نتایج این پژوهش نشان دادند که سلول های بنیادی مزانشیمی بند ناف موش توانایی تغییر و تبدیل به سلول های شبه هپاتوسیتی را دارند که سلول های چند وجهی با هسته های درشت و هستک‌های واضح مشخص اند. و دوز مؤثر عصارهٔ کبدی برای القای سلول های بنیادی مزانشیمی در جهت تغییر و تبدیل به سلول های کبدی ۱۵ لاندا مشخص گردید.

بند ناف جنین موش منبع مناسبی برای به دست آوردن سلول های بنیادی مزانشیمی می‌باشد. که این سلول های دارای مورفولوژی دوکی شکل هستند، سلول های حاصله از القای آن ها توسط عصارهٔ کبدی، سلول ها با مورفولوژی چند وجهی و هسته های درشت را نشان دادند.

واژه های کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف، تمایز، هپاتوسیت، تولید گلیکوژن،invitro

مقدمه

با کشف سلول های بنیادی حدود ۳۰ سال پیش، پیشرفت شگرفی در زیست شناسی و طب تجربی به وقوع پیوست، این سلول ها به عنوان منبع جدیدی از سلول های قابل تبدیل و جایگزین در درمان های سلولی مطرح شدند(۳). سلول های بنیادی سلول هایی با پتانسیل تمایزی بالا هستند که در مراحل مختلف تکوین خود، می توانند در ترمیم و بازسازی یک

بافت صدمه دیده ایفای نقش کنند. در شرایط مناسب نیز این سلول ها توانایی تمایز به سایر سلول‌ها و بافت ها را دارند(۳،۴). سلول های بنیادی دارای دو ویژگی اساسی یعنی توانایی تقسیم و تولید سلول هایی با خواص یکسان (خودنوزایی) و ایجاد انواع سلول های تمایز یافته هستند(۳). سلول های بنیادی در پستانداران دو گروه هستند: سلول های بنیادی جنینی که در بلاستوسیست و سلول های بنیادی بالغ که در بافت های بالغ یافت می شوند. در جنین در حال تکوین، سلول های بنیادی می توانند به تمام بافت های تخصص یافته جنین و سلول‌های پیش ساز برای بدن نقش یک سیستم تعمیر کننده را بازی کنند و با جایگزین کردن سلول‌های تخصص یافته، چرخه ترمیم بافت ها را از جمله خون، پوست، کبد، روده و غیره را حفظ کنند(۲). سلول‌های بنیادی را بر اساس توان تمایز برگشت پذیری آن ها به سلول های بنیادی همه توان، پرتوان،چند توان و تک توان تقسیم بندی می کنند. که به ترتیب، توان تمایزیشان کاهش می‌یابد(۲). مارکر های سلول های بنیادی شامل *OCT4, SSEAs* و نیز فعالیت آلکلین فسفاتازی هستند که سلول های تمایز نیافته جنینی میزان بالایی از فعالیت آلکلین فسفاتازی را هم در سطح خود و هم در سیتوپلاسم نشان می‌دهند(۲). از منابع سلول های مزانشیمی غیر از مغز استخوان، که به راحتی جدا و کشت داده می شوند، اخیراً سلول های مزانشیمی را از منابع فرعی دیگری مانند بافت چربی، بافت جفت و بند ناف، خون محیطی، بافت پیوندی، ماهیچه‌ی اسکلتی، پانکراس، کبد، دندان های شیری، مایع آمینوتیک و خون بند ناف جدا کرده‌اند که در مقایسه با سلول های مغز استخوان، این منابع در دسترس‌تر می باشند (۵،۴).

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از موش های سوری نژاد *NMRI* تهیه شده از انستیتو پاستور تهران استفاده گردید و روز مشاهدهٔ پلاک واژینالی روز صفر بارداری موش های ماده در نظر گرفته شد و برای گرفتن بند ناف از موش های حاملهٔ ۱۴ الی ۱۷ روزه استفاده گردید.

جدا کردن سلول های بنیادی مزانشیمی بافت بند ناف و کشت اولیه آن هاجنین‌ها پس از جدا شدن از رحم مادر در ظرف استریل حاوی محلول بافر سالین و بتادین قرار داده شدند و در زیر هود لامینار بافت بند ناف از جفت جدا گردید و درون ظرف استریل دیگری حاوی محیط کشت قرار داده شدند و تا حد امکان به قطعات ریزتری تقسیم شدند. این قطعات ریز به همراه محلول محیط کشت درون اپندروف های ویژه سانتریفیوژ یخچالدار تقسیم بندی شدند و پس از سانتریوفیوژ مایع رویی دور ریخته شد و بر روی سلول های ته-نشین شده ترپیسین ۰/۲ درصد ریخته شد تا سلول ها و بافت ها از هم جدا شوند و پس از عمل پیپت کردن مجدداً روی آن ها محیط کشت ریخته شد و دوباره سانتریفیوژ شدند. پس از این مرحله مایع رویی در پلیت های مخصوص کشت سلول در انکوباتور قرار داده شدند. پلیت‌های کشت در انکوباتوری با رطوبت ۹۵ درصد و دی اکسید کربن ۵ درصد همچنین دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

شناسایی سلول های بنیادی مزانشیمی در محیط کشت

در این مطالعه بعد از ۷ روز از کیت شناسایی فعالیت آلکلین فسفاتازی برای نشان دادن سلول‌های بنیادی تمایز نیافته استفاده گردید. که پس از ۷ روز سلول های به دست آمده نیز دارای ظاهری دوکی شکل و کشیدهٔ به همراه هسته های گرد سلول های مزانشیمی شدند.

تهیهٔ عصارهٔ کبدی

در این تحقیق از کبد موش های نابالغ استفاده شد که پس از جدا کردن کبد، آن ها را بلافاصله با استفاده از یخ خشک، زیر هود لامینار منتقل کرده تا توسط دستگاه هموژنازیر به عصارهٔ غلیظ کبدی تبدیل گردد، سپس این عصارهٔ غلیظ توسط محلول محیط کشت رقیق تر شد.

نتایج و بحث

پلیت های کشت سلولی در ۴ گروه تجربی تقسیم بندی شدند. که به هر پلیت میزان درصد مشخصی از عصاره و محیط کشت اضافه گردید.که به صورت ذیل دسته بندی شدند:

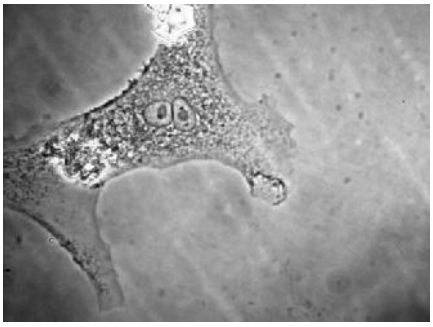
گروه اول : میزان ۱۰درصد سرم گاوی + محلول محیط کشت+ ۵۰ لاندا عصاره کبدی

گروه دوم : میزان ۱۰درصد سرم گاوی + محلول محیط کشت + ۴۰ لاندا عصاره ی کبدی

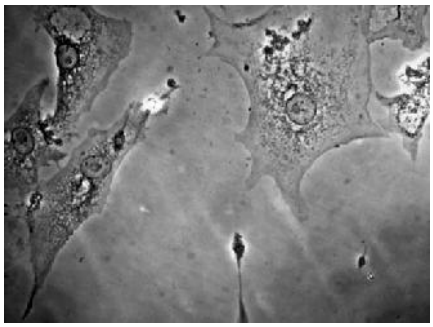
گروه سوم : میزان ۵ درصد سرم گاوی + محلول محیط کشت + ۳۰ لاندا عصاره ی کبدی

گروه چهارم : میزان ۵ درصد سرم گاوی + محلول محیط کشت + ۱۵ لاندا عصاره ی کبدی

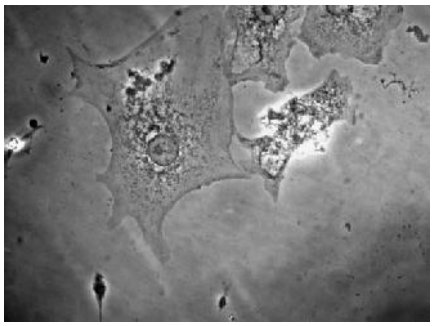
پس از جدا سازی و کشت سلول های بنیادی مزانشیمی بند ناف جنین موش های حاملهٔ ۱۴-۱۷ روزه آن ها با میکروسکوپ اینورت مورد بررسی و مطالعه قرار داده شدند. که سلول‌هایی فیبروبلاستی با مورفولوژی کشیده به همراه هسته های درشت و زوائد سیتوپلاسمی جهت چسبندگی به بستر پلیت کشت سلولی بودند. هر ۴ روز یکبار محیط کشت سلول‌ها تعویض شد و سلول های مرده از محیط حذف شدند و نیز هر چهار روز یک بار عصاره با غلظت‌های گفته شده در دسته بندی فوق به پلیت های کشت اضافه گردید. پلیت‌ها سلول ها در گروه سوم و چهارم میزان سلول های مردهٔ کمتر و تمایز بالاتری را به نسبت دو گروه دیگر از خود نشان دادند. و اما بهترین نتیجه را گروه تجربی ۴ نشان داد که با میزان درصد پایین‌تری از عصارهٔ کبدی و میزان پایین تری از سرم گاوی نتیجهٔ بهتری حاصل گردید. در نهایت در روز ۳۰ پس از تأثیر اولین دوز عصارهٔ کبد، سلول های شبه کبدی با ساختاری مشابه سلول‌های کبدی تمایز یافتند، این سلول ها با مورفولوژی مکعبی و به همراه هسته های درشت در مرکز سیتوپلاسم و سیتوپلاسم دانه دار که از نشانه های سلول های کبدی می باشد از خود نشان دادند. با توجه به اینکه گلیکوژن یکی از شاخص های تمایز سلول های تمایز یافتهٔ کبدی می-باشد، با استفاده از تکنیک رنگ آمیزی پریودیک اسید شیف می توان میزان سنتز گلیکوژن را در سطح سلول های حاصل شده مورد سنجش قرار داد و دانه های گلیکوژن با این تست ظاهر شدند (شکل ۱، ۲و ۳).



شکل۱- در این تصویر هستهٔ در حال تقسیم و سیتوپلاسم دانه دار یک سلول چند وجهی شبه کبدی مشخص است، رنگ قرمز در سیتوپلاسم سلول دلیل بر حضور گلیکوژن در سیتوپلاسم سلول بوده که بر اثر واکنش مثبت به تست پریودیک اسید شیف به رنگ قرمز در آمده است.



شکل۲- در این تصویر چند سلول شبه کبدی چند وجهی شده به همراه هسته های درشت در مرکز سلول ها مشخص‌اند، رنگ قرمز نشان دهندهٔ تأثیر مثبت تست پریودیک اسید شیف دارد.



شکل۳- تصویر یک سلول چند وجهی به همراه هسته مرکزی که در این تصویر می توان رنگ قرمز بر اثر تست پریودیک اسید شیف را تشخیص داد

سلول‌های بنیادی سلول هایی هستند که در حدود ۳۰ سال پیش کشف شدند و باعث پیشرفت عظیمی در حوزه‌ی زیست شناسی و طب تجربی شدند (۲)، که از ویژگی های آن‌ها داشتن توان خود نوسازی و قدرت تقسیم میتوزی بالا و قدرت تمایز بالای آنان به انواع سلول‌های تخصص یافته می باشد (۶). از مهم ترین سلول های بنیادی بالغ جنینی می توان به سلول‌های بنیادی مزانشیمی اشاره کرد (۳). حضور سلول های بنیادی مزانشیمی در مغز استخوان برای اولین بار توسط یک پاتولوژیست آلمانی موسوم به *کوهنایم* در حدود ۱۴۰ سال پیش(۱۸۶۷) کشف شد (۳،۲). متعاقب آن سلول‌های بنیادی مزانشیمی واقع در مغز استخوان برای اولین بار توسط فردنشتینو پتراکوا در سال ۱۹۶۶ شناسایی شدند اما شواهد قطعی وجود این سلول ها توسط*فردنشتین* در اواسط سال ۱۹۷۰ ارائه شد. بعد از این کشف، این مطالعات توسط چندین محقق دیگر به ویژه پرایسزماو همکاران ، اون و همکاران تا سال ۱۹۸۰ ادامه پیدا کرد(۳،۲).

در سال ۲۰۰۴ لیو همکاران در تجربیات خود برای اولین بار سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان را در محیط کشت به هپاتوسیت تمایز دادند(۳). در مطالعهٔ دیگری که توسط *انگ* و همکاران صورت پذیرفت، تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان را در شرایط سه بعدی و در حضور فاکتور های رشد بررسی کردند(۲).*هنگ*و همکاران در سال ۲۰۰۵ نیز پس از جدا سازی و تخلیص سلول های بنیادی مزانشیمی از خون بند ناف انسان توانستند این سلول ها را با استفاده از*HGF* و*OSM* و دگزامتازون و *ITS*، به هپاتوسیت تمایز دهند.در تحقیق دیگری که در حضور القا گر*FGF-4* و *HGF* صورت پذیرفت پس از ۸ روز از تیمار با این القا گر ها تمایزی نشان ندادند ولی پس از روز ۲۸ نزدیک به ۶۳/۶ درصد سلول ها به صورت گرد و کوچک ظاهر شدند و از حالت فیبروبلاستی خود خارج گشتند. که همانند سلول های اپیتلیالی ظاهر گشتند.(۳،۲)

در سال ۲۰۱۱ مطالعه ای انجام شده که در آن از القای مستقیم سلول‌های بنیادی به سلول‌هایشبه هپاتوسیت با استفاده از فیبروبلاست های دم موش و با تأثیر فاکتور های القایی *Gata4*، *Hnf1α* و *Foxa3* بررسی کرده‌اند و نتایج آزمایشات آنان سلول‌های شبه هپاتوسیتی با مورفولوژی اپتلیالی معمول سلول کبدی، بیان ژن‌های کبدی و همچنین برخی از اعمال کبدی است (۷).

در حال حاضر پژوهش هایی در خصوص جدا سازی، تخلیص و شناسایی نیای سلول‌های کبدی در حال انجام است، اما مشکلاتی نظیرحفظ بقای این سلول ها در مدت زمان طولانی‌تر و نیز تکثیر و ازدیاد نیای این سلول ها مانع از پیشرفت اینگونه مطالعات شده است (۸).

در این مطالعه، نتایج نشان داد که سلول های بنیادی مزانشیمی تحت تأثیر القای عصاره‌ی کبدی، قادرند به سلول های شبه هپاتوسیتی تبدیل شوند. در گروه های ۱ و۲ مورد مطالعه در این تحقیق، سلول‌های مورد استفاده، میان فاز مورفولوژی سلول هپاتوسیتی و مورفولوژی دوکی شکل و کشیده ی مختص به سلول های فیبروبلاستی قرار گرفتند. و

با گذشت زمان دچار پیری و آپوپتوزیس گشتند. اما در گروه ۴ که با میزان دوز رقیق تری از عصاره بر سلول‌های فیبروبلاستی پلیت های کشت اعمال شده بود و این پلیت ها بعد از گذشت بیست روز از زمان تأثیر عصاره ی کبدی، توانایی تکثیرخود را از دست داده و دیگر تقسیم نشدند و این نشان از تأثیر عصاره داشته است و القا انجام شده است. از طرف دیگر نیز میزان تناسب اندازه‌ی نوکلئوپلاسم به هسته آن ها کاهش یافته بود بدین معنی که اندازه‌ی هسته ی سلول به نسبت اندازه‌ی سیتوپلاسم افزایش یافته بود. همچنین در روز ۲۵ تمایز (E۲۵ پس از اعمال عصاره)، تعداد کمی از سلول ها دارای هسته تقسیم شده و متوازن گشتند. این تقسیم سلولی در واقع نشانه‌ی انجام تمایز در سطح سلول شبه هپاتوسیتی بوده است. این روند تمایزی در روز ۲۸ متوقف شد و سلول ها دارای سیتوپلاسمی وسیع گشتند، که در حقیقت این تغییرات شباهت زیادی با مورفولوژی یک سلول کبدی را نشان می داد.

بر خلاف تحقیقات پیشین، درمطالعه حاضرکه در غیاب عوامل القایی نظیر(*OSM، FGF، HGF، DEX* و..) انجام گردید (۹). با توجه به روشی که در این مطالعه از آن استفاده شد، تمایز سلول‌های فیبروبلاستی بنیادی بند ناف موش *NMRI* در محدوده ی زمانی ۳۰ روز به سلول‌های شبه هپاتوسیتی انجام پذیرفت. ودر این تحقیق سلول های بنیادی مزانشیمی را با عصاره ی کبدی در رقت های ۱۵، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ لاندا ، تیمار کرده و سلول‌های فیبروبلاستی مزانشیمی در فاز القا قرار گرفتند و سپس در برابر تست پریودیک اسید شیف از خود واکنش مثبت نشان دادند. تست پریودیک اسید شیف برای اثبات حضور گلیکوژن به کار برده می‌شود و سلول های شبه کبدی حاصل شده در این مطالعه نیز به دلیل سنتز گلیکوژن در برخی نواحی سلول در اثرواکنش به تست پریودیک اسید شیف به رنگ قرمز در آمدند.

در این مطالعه میزان دوز مؤثر عصاره کبدی در القای سلول های بنیادی مزانشیمی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده گویای تأثیر عصاره ی کبد روی سلول های بنیادی مزانشیمی در غیاب فاکتور های رشد و القایی معمول بوده است. میزان دوز عصاره ی مؤثر در این تغییر ۱۵ لاندا بوده که در نهایت با گذشت تقریباً ۳۰ روز تعداد سلول ها کم اما سلول‌های باقی مانده مورفولوژی سلول های کبدی (سلول های چند وجهی، هسته‌ی درشت و سیتوپلاسم دانه دار) را نشان دادند. با تست ذخیره ی گلیکوژن (تست پریودیک اسید شیف) ذرات گلیکوژن به رنگ قرمز در سطح سیتوپلاسم سلول ظاهر گشتند.

نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره های طبیعی بافت-های بدن از جمله عصاره کبد جنین می‌توانند سبب القاء تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف به سلول‌های شبه کبدی شوند

منابع

۱- بهاروند، ح.سلول های بنیادی، تمایز به هپاتوسیت و درمان بیماری های کبدی.جلد ۳.انتشارات خانه زیست شناسی;۱۳۸۹،ص ۱۲-۵۴.

۲- پور نصر، ب.، بهاروند، ح.سلول های بنیادی مزانشیمی انسان: ویژگی های زیست شناختی، کاربرد های درمانی و روش های جدا سازی.جلد ۲. انتشارات خانه زیست شناسی;۱۳۸۹،ص ۲۸-۶۷.

۳- باغبان اسلامی، م. ۱۳۸۹. سلول های بنیادی مزانشیمی.انتشارات خانه ی زیست شناسی.جلد ۲. ص ۱۳-۲۴.

۴- بهاروند، ح.، کاظمی آشتیانی، س.۱۳۸۵. سلول های بنیادی جنینی(مفاهیم و پتانسیل).انتشارات خانه زیست شناسی . ج۱. ص ۱۱-۱۷.

۵- پور نصر، ب. فرزانه،ز.، شاهسونی، م.، بهاروند، ح. ۱۳۸۸. تکوین کبد و تمایز آزمایشگاهی سلول های بنیادی جنینی به سلول های کبدی.مجله سلولی(یاخته) . سال یازدهم. شماره ۴.پیاپی ۴۴

6- Banas, A., Yamamoto, Y., Teratani, T., Ochiya, T. (2007). Stem cell Plasticity

:learning from hepatogenic DifferentiationStrategies. Wiley – liss, Inc, 3228-3233

7- Baharvand, H., Hashemi, SM., Shahsavani, M. (2008).Differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatocyte-like cells in a serum-free adherent culture condition. Differentiation, 76, 465–477.

8- Baharvand, H., Hashemi, S.M., Kazemi Ashtiani, S., Farrokhi, A. (2006).Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro. Int J Dev Biol, 50, 645–652.

9- Cho, C.H., Parashurama, N., Park, E.Y., et al. (2008). Homogeneous differentiation of hepatocyte-like cells from embryonic stem cells: applications for the treatment of liver failure. FASEB J, 22, 898–909.

10- Hay, D.C., Zhao, D., Fletcher, J., Hewitt, Z.A., McLean, D., Urruticoechea-Uriguen, A., et al. (2008). Efficient differentiation of hepatocytes from human embryonic stem cells exhibiting markers recapitulating liver development in vivo. Stem Cells, 26, 894–902.

11- Ma, X., Duan, Y., Jung, C.J., Wu, J., VandeVoort, CA., Zern, MA.(2007). The differentiation of hepatocyte-like cells from monkey Embryonic Stem cells. Cloning and Stem Cells, 32 , 485-492.

12- Peng, L., Zhu, H.p., Zheng, Y.b., Xie, Ch., Chong,Y.T and Gao,Z.l. (2011).Mesenchymal stem cells differentiate into hepatocyte –like cells under different induction systems in hepatitis B patients with liver failure. African Journal of Biotechnology., 840-847

13- Ramirez, JM., Bai, Q., Dijon-Grinand, M., Assou, S., Gerbal-Chaloin, S., Hamamah, S., De Vos, J. (2011). Human Pluripotent stem cells: from biology to cell therapy. World Journal of Stem Cells, 12,24-29

14- Song, L., Wang, H., Gao, X., Shen, K., Niu, W., Qin, X. (2010). Proliferation and differentiation potential of mouse adult hepatic progenitor cells cultured in vitro. Acta Biochin Biophys Sin(ABBS), 234, 122 -123

15- Waring, J.F., Ciurlionis, R., Jolly, R.A., Heindel, M., Gagne, G., Fagerland, J.A., et al(2003). Isolated human hepatocytes in culture display markedly different gene expression patterns depending on attachment status. Toxicol In Vitro, 17, 693–701.