مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۲، شماره ۴، زمستان ۹۱، صفحات ۲۵۹ تا ۲۶۵

Original Article

القای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی به سلول های فیبری عدسی چشم

هما محسنی کوچصفهانی[۱]، محمد نبیونی[۲]، پریسا غیبی[۳]، نسیم اسلامی[۳]، خدیجه بهره بر[۳]

[۱] دانشیار، دکتری زیست شناسی تکوینی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم تهران
[۲] استادیار، دکتری زیست شناسی تکوینی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم تهران
[۳] دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی تکوینی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم تهران

چکیده

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

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

یافته‌ها: *سلول‌های بنیادی چربی موش نسبت به مارکر OCT4 پاسخ مثبت نشان دادند. بررسی‌های مورفولوژیکی پس از تیمار نشان داد که سلول‌هایی که با دوز۴۰ ٪ از مایع زجاجیه نسبت به محیط کشت تیمار شدند از لحاظ شکل ظاهری نسبت به سلول‌های گروه کنترل کشیده‌تر و به صورت موضعی به موازات هم آرایش یافتند (ویژگی تمایز به فیبرهای عدسی)، به علاوه در داخل هسته آنها تعداد هستک‌ها افزایش یافت که بیانگر افزایش پروتئین سازی در آنهاست. بیان مثبت مارکر کریستالین در دوز ۴۰٪ در نمونه‌های تجربی با توجه به آزمون آماری ANOVA اثباتی بر تمایز این سلول‌ها به سمت سلول‌های شبه فیبری عدسی در این دوز بود.*

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

واژگان کلیدی: *کاتاراکت، سلول‌های بنیادی، مایع زجاجیه.*

مقدمه

در بدن موجودات زنده پرسلول، برخی از سلول‌ها ضامن بقای موجود می‌باشند که از آن جمله می‌توان به سلول‌های بنیادی اشاره کرد. سلول‌های بنیادی، سلول‌های سوماتیکی تمایز نیافته‌ای هستند که قادرند تحت شرایط خاص به یکی از انواع سلول‌های بالغ یا کاملاً تمایز یافته تبدیل شوند (۱). از ویژگی-های آنها می‌توان به توانایی خود تجدیدی، تقسیم میتوزی بالا، خاصیت کلونی‌زایی و همچنین تمایز به انواع سلول‌های تخصص یافته (۲) و ایجاد یک جمعیت سلولی ترمیمی اشاره کرد (۴،۳). 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

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه تربیت معلم ، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، دکتر هما محسنی کوچصفهانی (**email**: kouchesfehani@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۹۰/۱۱/۲۰
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۱/۶/۱۹

اکثرمحققین را به خود جلب کرده است، می‌توان به سلول‌های بنیادی مزانشیمی اشاره کرد (۵).

این سلول‌ها به طور مشخص چند توان بوده و سلول‌های حاصل از تقسیم آنها اگر تحت القائات اختصاصی قرار بگیرند به انواع مختلف دودمانی سلول‌های دیگر تبدیل می‌شوند. اخیراً از میان سلول‌های بنیادی بالغ، سلول‌های بافت چربی گزینه‌ای مناسب در جهت تحقیقات به حساب می‌آید، زیرا برداشت بافت چربی در مقایسه با سایر بافت‌های بالغ از جمله مغز استخوان آسان‌تر بوده و در این برداشت تعداد سلول بنیادی بیشتری به دست می‌آید. اولین بار تخلیص مجموعه سلول‌های بنیادی از بافت چربی در سال ۱۹۶۴ توسط Rodbell توضیح داده شد (۶).

مایع زجاجیه به عنوان عامل القایی این تحقیق حاوی فاکتورهای رشد فیبروبلاستی (FGF) از جمله FGF-1 و FGF-۲ است که باعث القا و تمایز سلول‌ها بنیادی به سلول‌های فیبری عدسی می‌شود و این روند به جهت بیان ژن‌های کریستالین آلفا که عمده‌ترین پروتئین محلول در سلول‌های عدسی هستند صورت می‌گیرد (۷). از عمده‌ترین رویدادهای مورفولوژیکی در سلول‌های فیبری عدسی پس از بیان کریستالین‌ها می‌توان به از دست دادن هسته و سایر اندامک‌ها و طویل شدن و تخصص‌یابی ساختاری در سلولهای فیبری و در نهایت شفافیت آنها اشاره کرد (۸).

تحقیقات نشان می‌دهد که آلفاکریستالین‌ها در عدسی چشم پستانداران بر دو نوع αA وαB - کریستالین می‌باشند و رونویسی از ژن‌های آنها در مراحل ابتدایی رشد و نمو انجام می‌گیرد، به طوری که در پلاک عدسی موش در مرحله αB-crystalin ،E9.5 و در مرحلهE10 تا E10.5 در جام عدسی، αA-crystalin قابل تشخیص است (۹).

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

مواد و روشها

نحوه گرفتن مایع زجاجیه

چشم‌های گاو گرفته شده ازکشتارگاه کرج در PBS به آزمایشگاه منتقل شد و با آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و استرپتومایسین همراه با PBS استریل گردید. با فروکردن سر سرنگ 16g از ناحیه پشتی چشم، مایع زجاجیه بیرون کشیده شد و در دستگاه سانتریفیوژ با دور rpm ۱۴۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. مایع رویی فیلتر گردید و در فریزر ۴۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جداسازی بافت چربی و سلول‌های بنیادی

در این تحقیق تجربی، از موش‌های NMRI نگهداری شده در شرایط آزمایشگاهی استاندارد از نظر نور و غذا و دما استفاده شد. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ساعت روشنایی درون قفس‌های مخصوص با درب فلزی نگهداری می‌شدند. بافت چربی از ناحیه پشت کشاله ران شش موش NMRI که بین ۴ تا ۶ هفته سن داشتند، جدا شده و در محلول استریل phosphate-buffered saline (PBS) تحت شستشو قرار گرفت. سپس قطعات چربی به صورت مکانیکی با قیچی از هم جدا شدند و به قطعات دو میلیمتری درآمدند. تمامی مراحل بالا بر روی یخ انجام گرفت. سپس تمامی PBS محیط کشیده شد و تکه های چربی تحت تاثیر۰/۰۷۵کلاژناز نوع I (Merck,Germany) در PBS به مدت چهل و پنج دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۲ Co ۵٪ قرار گرفتند، با این توصیف که هر پنج دقیقه یک بار مواد داخل فالکون پیپتاژ شد. سپس کلاژناز با PBS خنثی گردید و فالکون داخل سانتریفیوژ به مدت ۱۰دقیقه با دور 1200g قرار گرفت (۱۲). پس از اتمام سانتریفیوژ، مایع رویی که حاوی تکه‌های چربی بود دور ریخته شد و Pellet با PBS شستشو داده شد و دوباره در سانتریفیوژ با دور 1500rpm به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت و پس از اینکه دوباره مایع رویی حذف شد، محیط کشتDMEM (Dulbeco´s Modified Eagle Medium) (Gibco USA) به همراه FBS ۱۵٪ (Sigma USA) و آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین به نسبت ۱ به ۱۰۰به Pellet اضافه شد و در فلاسک $25\ cm^2$ بدون پوشش با درب فیلتردار کشت داده شد و هر ۲ روز یک بار تعویض محیط صورت گرفت. اولین پاساژ پس از شش روز انجام شد و سلول‌ها برای رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی ابتدا شمارش شده معادل ۳×۱۰^{۴} ، در پلیت ۹۶ خانه‌ای قرار داده شدند. پس از

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

ایمونوسیتوشیمی

خانه‌های پلیت با PBS شست وشو داده شدند، سپس با فرمالین ۴٪ سرد برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد و سپس ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند و بعد از آن خانه ها دو بار با PBS شست و شو داده شدند. سلول‌ها به مدت ۱۵دقیقه تحت تاثیر تریتون X۱۰۰ با غلظت ۰/۴ ٪در دمای اتاق قرار گرفتند و سپس با PBS شسته شدند. سرم بز ۵٪ به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق به آن اضافه گردید و پس از مدت معین بدون شست وشو برداشته شد و آنتی بادی اولیه Anti -OCT4 (ab 18976) را که در BSA/PBS ۲/.٪ حل شده به سلول‌ها اضافه گردید و ۱۲ ساعت بدین صورت در دمای ۴ درجه قرار گرفت. خانه های پلیت سه بار با PBS-Tween ۰/۱ ٪ ، هر بار به مدت ۵ دقیقه شسته شدند سپس در BSA/PBS ۰/۱ ٪ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد و بدون شست و شو برداشته شد و در تاریکی به خانه‌ها آنتی بادی ثانویه (IgG-fITC(anti-rabbit- AF8035 که در BSA/PBS ۰/۲٪ حل شده بود به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق اضافه گردید. خانه‌های پلیت سه بار با PBS-Tween ۰/۱٪، هر بار به مدت ۵ دقیقه شست و شو داده شدند و در آخرین مرحله در تاریکی به خانه‌ها Hoechst اضافه گردید و پس از ۱۰ دقیقه با PBS شست و شو داده و در زیر میکروسکوپ فلورسانس سلول‌ها مشاهده شدند.

پاساژ دادن سلول‌ها

سلول‌های گرفته شده از چربی موش در طی هشت روز سه بار پاساژ داده شدند. برای هر فلاسک ۲۵ cm^2 که به مقدار ۷۰ تا ۸۰ درصد از پرشدگی فلاسک رسیده بود از تریپسین ۰/۰۵٪ استفاده شد. برای پاساژ دادن آنها و تقسیم سلول‌ها در دو فلاسک، ابتدا محیط کشت خارج گردید و سلول‌ها دو بار با PBS شست و شو داده شدند، سپس مقدار ۵۰۰ µl از تریپسین به فلاسک اضافه شد و پس از ماندن در انکوباتور به مدت ده دقیقه، سلول‌ها از کف فلاسک کنده شدند و به صورت شناور درآمدند. سپس با محیط کشت خنثی شده و در فلاسک‌های جدید قرار گرفتند. در این روش از سانتریفیوژ استفاده نشد تا استرس کمتری به سلول‌ها وارد شود و در ضمن نسبت تریپسین و محیط کشت داخل فلاسک حدود یک به ده در نظر گرفته شد تا آسیبی به سلول‌ها وارد نشود.

تیمار سلول‌های جداشده با مایع زجاجیه

پس از آخرین پاساژ سلول‌ها و بعد از شمارش آنها، تعداد ۲۶×۱۰^۴ سلول در هفت خانه از پلیت ۲۴ خانه‌ای کشت داده شدند و پس از چسبیدن سلول‌ها به کف ظرف، پنج خانه با درصدهای ۱۰ ٪- ۲۰٪-۳۰ ٪-۴۰ ٪ از مایع زجاجیه به نسبت DMEM و FBS ۱۵٪ و آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان نمونه‌های تجربی مورد بررسی قرار گرفتند. بدین صورت که در خانه اول که نسبت زجاجیه به محیط کشت ۱۰ به ۹۰ بود ۱۰۰ مایکرولیتر از مایع زجاجیه به همراه ۹۰۰ مایکرولیتر از محیط کشت به همراه FBS ریخته شد و در خانه های بعدی نیز به ترتیب ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ مایکرولیتر مایع زجاجیه ریخته شد و به ترتیب ۸۰۰، ۷۰۰ و ۶۰۰ مایکرولیتر از محیط کشت به همراه FBS اضافه شد. دو خانه به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند که در آنها تیمار با مایع زجاجیه صورت نگرفت و صرفاً با DMEM و FBS ۱۵٪ و آنتی‌بیوتیک‌ها کشت داده شدند. این خانه‌ها به مدت ۱۴ روز تحت تیمار و کشت قرار گرفتند.

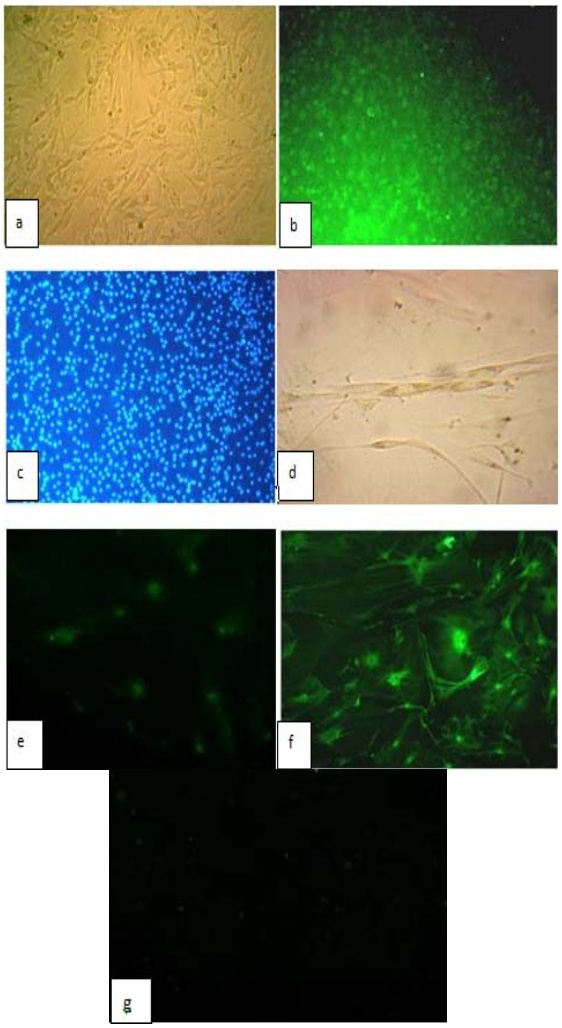
رنگ‌آمیزی سلول‌ها با مارکر کریستالین

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

یافته‌ها

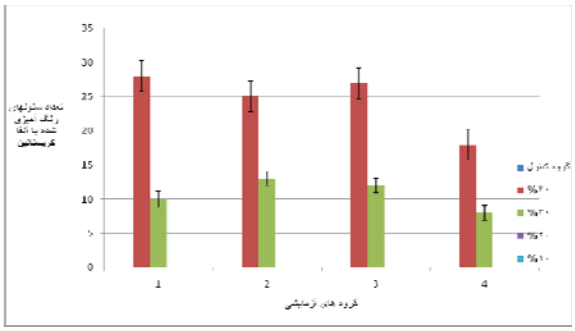
سلول‌های بنیادی مزانشیمی گرفته شده از بافت چربی پس از بیست‌و چهار ساعت به کف فلاسک چسبیدند و سلول‌ها در روزهای آتی به فرم فیبروبلاستی درآمدند (شکل 1a). در این مرحله از ویژگی چسبندگی به کف ظروف پلاستیکی که شاخص سلول‌های بنیادی مزانشیمی است برای جداسازی آنها استفاده شد. سپس سلول‌های جدا شده برای اثبات بنیادی بودن قبل از اولین پاساژ توسط مارکر OCT4 که مارکر سلول-های بنیادی پرتوان است، با روش ایمونوسیتوشیمی رنگ-آمیزی شدند و چنان چه در شکل 1b و 1c مشاهده می‌شود به این مارکر پاسخ مثبت نشان دادند. پس از پاساژ سوم سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت چربی تحت القاء درصدهای مختلف (۴۰-۱۰ ٪) مایع زجاجیه نسبت به محیط کشت، به مدت چهارده روز قرار گرفتند. پس از بررسی‌های مورفولوژیکی، تمامی گروه‌ها توسط مارکر کریستالین آلفا (مارکر سلول های فیبری عدسی) رنگ‌آمیزی شدند. نتایج

بررسی های ایمونوسیتوشیمی کـه بـر روی سـلول‌هـای گـروه کنترل و سلول‌های تیمار شده با درصدهای مختلـف زجاجیـه انجام شد در شکل ۱ آورده شده است.



شکل ۱– بررسی‌های ایمونوسیتوشیمی بر روی سلول‌های گروه کنتـرل و سلول‌های تیمار شده با درصدهای مختلف زجاجیه. **a**: سـلول‌هـای بنیـادی مزانشیمی بافت چربـی در روز هفـتم کشـت کـه فـرم فیبروبلاسـتی و چسـبنده داشتند. بزرگنمایی 200X . **b**: سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی پس از اولین پاساژ که با مارکر OCT4 رنگ شده‌انـد و در زیـر میکروسـکوپ معکـوس فلورسانس با رنگ FiTc سبز دیده می شـوند، بـا بزرگنمـایی200X. **c**: هسـته سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی که بـا رنـگ‌آمیـزی Hoechst در زیـر میکروسکوپ معکوس فلورسـانس آبـی دیـده مـی‌شـوند. بزرگنمـایی200X. **d**: سلول‌های گروه‌های تجربی پس از چهارده روز تیمار با غلظت ۴۰ ٪ مایع زجاجیـه که سلول‌ها کشیده و کاملاً به موازات هم آرایش یافتـه‌انـد. بزرگنمـایی ۴۰۰x. **e**: سلول‌های تیمار شده با غلظت ۳۰٪ از مایع زجاجیه که با مـارکر کریسـتالین آلفـا رنگ‌آمیزی شده اند و سبز دیده می‌شوند. با بزرگنمایی400X **f**: سلول‌های تیمار شده با غلظت ٪۴۰ از مایع زجاجیه که با مارکر کریستالین آلفا رنگ‌آمیـزی شـده اند و سبز دیده می‌شوند. با بزرگنمایی400X. **g**: سـلولهای گـروه کنتـرل کـه بـا مارکر کریستالین الفا رنگ آمیزی شده اند و هیچ گونه رنگی را نشان نمی دهند. با بزرگنمایی 400X

در درصـدهای ۱۰ و۲۰ درصـد هـیچ گونـه بیـان کریسـتالین مشاهده نشد، ولی در درصدهای ۳۰ و ۴۰ درصـد بیـان ایـن مارکر رویت شد که با مقایسـه آمـاری صـورت گرفتـه توسـط Insat3 با اسـتفاده از تسـت ANOVA بهتـرین پاسـخ در دوز ۴۰٪ از مایع زجاجیه مشـاهده شـد (نمـودار ۱). در ایـن دوز، سلول‌های گـروه تجربـی از لحـاظ شـکل ظـاهری نسـبت بـه سلول‌های گروه کنتـرل کشـیده‌تـر و بـه صـورت موضـعی بـه موازات هم آرایش یافتند (ویژگی تمایز به سلول هـای فیبـری عدسی) (شـکل 1f). بـه عـلاوه در داخـل هسـته آنهـا تعـداد هستک‌ها افزایش یافت که بیانگر افـزایش پـروتئین سـازی در آنها بـود (شـکل 1d). سـلول‌هـای گـروه‌هـای تجربـی کـه بـا درصدهای کمتـر مـایع زجاجیـه تیمـار شـدند، تفـاوت قابـل ملاحظه‌ای با سلول‌های گروه کنترل نداشتند، شـکل ظـاهری آنها فیبروبلاستی و یا با کشیدگی خفیف بـدون جهـت گیـری موازی باهم بودند. در دوز ۳۰ درصـد هماننـد دوز ۴۰ درصـد بیان صورت گرفت، اما میزان این بیان در دوز ۳۰ درصد بسیار کم بود (شکل 1e).



نمودار ۱– مورفومتری تعداد سلول‌های رنگ آمیزی شده بـا آلفـا کریسـتالین در گروه کنترل و گروه‌های تیمار شده بـا ۱۰٪، ۲۰٪، ۳۰٪ و۴۰٪ از مـایع زجاجیـه نسبت به محیط کشت (در هر گروه n=۴). در گروه‌های تیمار شده با ۳۰٪ و ۴۰٪ از مایع زجاجیه افزایش معنی‌داری به صورت P<۰/۰۰۱ ***در تعداد سلول‌های رنگ آمیزی شده با آلفا کریستالین نسبت به گروه کنترل و گروه‌های تیمار شده با ۱۰٪ و ۲۰٪ از مایع زجاجیه مشاهده شد. در مقایسه بین گروه‌های تیمار شـده بـا ۴۰٪ نیز این افزایش معنی‌دار به صورت P<۰/۰۰۱ ***در تعداد سلول‌های رنگ آمیزی شده با آلفا کریستالین نسبت به گروه تیمار شده با ۳۰٪ مشاهده شد. روش آماری انجام شده ANOVA بود.

بحث

سلول‌های بنیادی مشـتق شـده از بافـت چربـی، سـلول‌هـایی هستند که چند توان بوده و از نـوع بنیـادین بـالغ مـی‌باشـند (۱۰). این سلول‌ها به جهت میزان زیاد و همچنین جداسـازی آسان از بدن فرد بدون در خطر انداختن حیات موجود، منابعی

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

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

جهت تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی بافت چربی به سلول‌های فیبری عدسی چشم، از مایع زجاجیه استخراج شده از چشم گاو استفاده شد. مایع زجاجیه با دارا بودن فاکتورهای رشد متعدد به ویژه FGF_1 و FGF_2 منابع مناسبی جهت القای تمایز این سلول‌ها به سمت سلول‌های فیبری عدسی محسوب می‌شود. در این رابطه O`Connor و Mc Avoy در سال ۲۰۰۷ دو بافت اپیتلیومی از دو عدسی مجزا را بر روی هم در محیط کشت مخلوط با زجاجیه گاوی (۱:۱) کشت دادند و علاوه بر بررسی های میکروسکوپی و تعیین میزان توانایی این ساختار عدسی مانند نشان دادند که در این شرایط این سلول‌ها بعد از ۳۰ روز کشت شکل کروی پیدا کرده و شفاف شده‌اند و قادر به متمرکز کردن نور گردیده‌اند. در نتیجه مایع زجاجیه گاوی فاکتورهای مناسب برای تمایز به سمت سلول-های عدسی را داراست (۱۶).

در سال ۲۰۰۰، Blakely و همکارانش بر روی رشد و تمایز سلول‌های اپیتلیومی عدسی انسان مطالعه کردند. آنها این سلول‌های اپیتلیومی را جدا کرده و بمدت ۱۵ روز در محیط دارای FGF-2کشت دادند. در نهایت مشاهده کردند که مورفولوژی آنها تغییر یافته و اجسام لونتوئیدی(lentoid) (مجموعه دستجات چند سلولی گرد و دارای خاصیت انکسار بسیار) ظاهر شدند. آنها برای اثبات ادعای خود در مورد تمایز این سلول‌ها به عدسی چشم از مارکر آلفا کریستالین نوع A و B با روش RT-PCR استفاده کردند (۱۷).

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

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

آلفا کریستالین‌ها که عمده‌ترین پروتئین‌های محلول در آب در سلول‌های عدسی چشم هستند که به دو گروه αACrystallin و αB-Crystallin تقسیم می‌شوند. αB -Crystallin در مرحله E_9 در پلاک عدسی موش بیان می‌شود (۹) و یک پروتئین کوچک شوک حرارتی است (۱۴). αACrystallin در مرحله E10 تا E10.5 در جام عدسی بیان می‌شوند (۹). هر دوی این کریستالین‌ها دارای فعالیت چاپرونی بوده و عملکرد آنها با اعمال پروتئین‌های دیگر از جمله Hsp70 و GroE که وابسته به ATP و جزو پروتئین‌های شوک حرارتی هستند مشترک می‌باشد (۱۵).

بررسی بیان پروتئین‌های کریستالین در گروه کنترل برای نشان دادن میزان استرس وارده به محیط بدین صورت انجام شد که تمامی سلول‌های تحت تیمار همراه با نمونه کنترل در یک پلیت ۲۴ خانه‌ای و در داخل انکوباتور با شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت کافی و ۵٪ CO_2 قرار گرفتند. این

عوامل خود حافظ سلول‌ها در برابر استرس بود، چنان چه در بررسی‌های ایمونوفلورسانت هیچ بیانی از αA-Crystallin و αB-Crystallin در نمونه‌های کنترل مشاهده نشد. بدین وسیله فعالیت چپرونی پروتئین‌ها در چنین شرایطی ظهور نکرده و می‌توان به داده‌های حاصله از نمونه‌های تجربی اطمینان کرد (شکل 1f).

در بررسی میزان بیان دو نوع پروتئین کریستالین آلفا در روز چهاردهم پس از تیمار و مقایسه گروه‌های تجربی در دوزهای مختلف مایع زجاجیه، مشاهده شد که سلول‌های القا شده توسط دوز ۴۰ ٪ میزان بالایی از پروتئین های آلفا کریستالین را بیان کردند که با مشاهدات حاصل از تغییرات مورفولوژیکی این سلول ها در این دوز، کاملاً مطابقت دارد.

از یافته‌های این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌های بنیادی گرفته شده از بافت چربی تحت القا زجاجیه با غلظت ۴۰ ٪ نسبت به محیط کشت قابلیت بیان ژن‌های کریستالین آلفا را دارند و نسبت به غلظت‌های دیگر بهترین نتیجه را هم از نظر مولکولی و هم از لحاظ مورفولوژیکی نشان می‌دهند. افزایش تعداد هستک‌ها، تغییر شکل سلول‌ها و طویل شدن آنها، و به موازات هم در یک راستا قرار گرفتن سلول‌ها که حاکی از تمایز آنها به سمت سلول های فیبری عدسی چشم است و بیان آلفا کریستالین های A و B با نتایج محققان دیگر مطابقت دارد (۱۸-۱۶).

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

REFERENCES

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

16. O'Connor MD, McAvoy JW. In vitro generation of functional lens-like structures with relevance to age-related nuclear cataract. Invest Ophthalmol Vis Sci 2007; 48:1245-52.

17. Blakely EA, Bjornstad KA, Chang PY, McNamara MP, Chang E, Aragon G, et al. Growth and differentiation of human lens epithelial cells in vitro on matrix. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000; 41:3898-907.

18. Maleki M, Parivar K, Nabiyouni M, Yaghmaei P, Naji M. Induction of Alpha-Crystallins Expression in Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells. Iranian Journal of Ophthalmology 2010; 2:67-71.