جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان- جلد ۱۱، شماره ٤ (پیاپی ۳۶)، تابستان ۱۳۸۹

مقایسه پتانسیل تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان و چند گونه حیوانی

مهدی کدیور [۱*](Ph.D)، فاطمه پیریایی [۲](M.Sc)، مینا رمضانی [۳](Ph.D)

۱- *انستیتو پاستور ایران، گروه بیوشیمی*

۲- *دانشگاه پیام نور مرکز تهران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی*

۳- *دانشگاه آزاد اسلامی واحد آشتیان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی*

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به استفاده روزافزون از سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از منابع گوناگون در کلینیک، لازم است تا مطالعات پایه‌ای جهت بررسی تکثیر، تمایز و نیز دیگر ویژگی‌های بیولوژیک آن‌ها صورت پذیرد. در مطالعه حاضر، بازده و یا توان تمایز در پنج رده مختلف سلول‌های بنیادی مزانشیمی با یکدیگر مقایسه گردیده است.

مواد و روش‌ها: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان خرگوش، رت، موش نژاد C57، جوجه و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت سینوویوم زانوی انسان با تراکم ۵۰۰۰ سلول در سانتی‌متر مربع در ظروف ۱۲ خانه‌ای کشت داده شد. پس از رسیدن سلول‌ها به سطح رشد مناسب با استفاده از القا کننده‌های اختصاصی، تمایز به آدیپوسیت، استئوسیت، و کندروسیت، در همه رده‌ها ایجاد شد. ۲۱ روز پس از القا پتانسیل تمایز،با رنگ آمیزی اختصاصی سلولی وضعیت تمایز در همه رده‌های سلولی بررسی شد.

یافته‌ها: بر طبق یافته‌های حاضر، بیش‌ترین پتانسیل تمایز به آدیپوسیت و استئوسیت در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان جوجه و بیش‌ترین پتانسیل تمایز به کندروسیت در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از سینوویوم زانوی انسان مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه، اختلافاتی در پتانسیل تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از گونه‌ها و نیز بافت‌های مختلف مشاهده گردید که می‌تواند ناشی از اختلاف در ریز محیط آن‌ها در حالت in vivo باشد. درک این اختلافات می‌تواند در نهایت منجر به استفاده موثرتر از این سلول‌ها در کلینیک گردد.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تمایز سلولی.

مقدمه

سلول بنیادی نوعی سلول سوماتیک تمایز نیافته است که می‌تواند در محیط کشت، تکثیر یافته و توانایی تکثیر خود را برای دوره‌ای نامحدود حفظ کند [۱]. هم‌چنین می‌تواند تحت شرایط خاص به سلول‌های تخصص یافته تبدیل شده و به انواع سلول‌های سازنده بدن موجود زنده تمایز یابد [۳،۲]. به علاوه می‌توان از آن‌ها در تولید سلول‌ها و در نهایت، بافت‌های مختلف، در بدن موجود زنده استفاده کرد [۴]. سلول بنیادی همه منظوره و بسیار توان‌مند است و این توانایی، محور اصلی توجه به سلول‌های بنیادی است. اولین مسئله در به کارگیری این توانایی شگفت‌انگیز، منبع به دست آوردن آن‌ها است. به طور کلی سلول‌های بنیادی بر اساس این‌که از چه

* نویسنده مسئول، تلفن: ۶۶۹۶۹۲۹۸-۰۲۱ نمابر: ۶۶۴۰۲۷۷۰-۰۲۱
Email: kadivar@pasteur.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۹/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱/۲۴

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بافتی جدا می‌شوند به سه گروه سلول‌های بنیادی جنینی (Embryonic stem cells)، سلول‌های بنیادی بند ناف (Cord blood stem cells) و سلول‌های بنیادی بالغ (Adult stem cells) تقسیم می‌شوند [۶،۵]. محدودیت‌های اخلاقی در زمینه استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی، دانشمندان را بر این داشت که تحقیقات بیش‌تری پیرامون سلول‌های بنیادی بالغ داشته باشند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC_s) سلول‌های بنیادی بالغ و چند توان با پتانسیل بالا در تزاید هستند که اکثراً این سلول‌ها نه تنها خاصیت خود تجدیدی با مورفولوژی فیبروبلاستی را تا حدود ۲۰ تا ۳۰ پاساژ حفظ می‌کنند بلکه هم‌چنان پتانسیل تمایز به انواع بافت‌های هم‌بندی مثل ماهیچه، استخوان، غضروف، تاندون، چربی، بافت‌های کبدی و عصبی را تا تقسیمات بالا حفظ می‌کنند [۸،۷]. یکی دیگر از ویژگی‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی این است که پتانسیل انجماد و ذوب مجدد داشته و به دنبال خروج از این شرایط، قادر به تکثیر و تمایز به سلول‌های مزانشیمی هستند [۱۰،۹]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل دارا بودن خاصیت خودبازسازی و توان تمایز به بافت‌های مزانشیمی به عنوان یک منبع مناسب برای استراتژی‌های سلول درمانی، مهندسی بافت و ژن درمانی محسوب می‌شوند [۱۱]. کاربرد متداول کلینیکی آن‌ها در موارد مختلف از جمله درمان استئوژنز ناقص، آسیب مغزی، پارکینسون، انفارکتوس قلبی، التیام شکستگی، پاره شدن تاندون، درمان بیماری‌های مفصلی، درمان بیماری‌های کبد و اختلالات ایجاد شده دیگر در بدن به خوبی نشان داده شده است [۱۲].

با وجود اهمیت سلول‌های مزانشیمی در زمینه‌های درمانی به ویژه سلول درمانی هنوز بسیاری از جنبه‌های بیولوژیکی آن از قبیل ماهیت سلولی، پتانسیل تمایز و عمل‌کرد آن‌ها در in vivo ناشناخته باقی مانده است [۱۳]. هر چند امیدهای فراوانی جهت استفاده از سلول‌های بنیادی در تحقیقات کلینیکی و نیز تحقیقات علوم پایه وجود دارد اما مشکلات تکنیکی متعددی در تحقق انتظارات فراوان از سلول‌های بنیادی وجود دارد. از آن‌جا که تحقیقات پیش کلینیکی بر روی مدل‌های حیوانی زمینه پاسخ به بسیاری از ناشناخته‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی و نیز کاربردی کردن این سلول‌ها در درمان بیماری‌های انسان فراهم می‌کند، به همین دلیل، محققین همواره در صدد یافتن منبع مناسبی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی با پتانسیل تمایز بالا به منظور استفاده در زمینه‌های درمانی می‌باشند. از طرفی بررسی پتانسیل تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی در گونه‌های حیوانی به این دلیل نیز اهمیت دارد که در برخی راه‌بردهای سلول درمانی و مهندسی بافت، پیوند سلول‌های تمایز یافته ترجیح داده می‌شود و امکان موفقیت را در این زمینه بیش‌تر می‌سازد [۱۸]. می‌توان گفت تنها در صورت شناخت دو خصیصه تکثیر و تمایز در مورد هر کدام از انواع سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌توان استفاده بهینه کلینیکی را برای آن‌ها متصور شد [۱۷-۱۴].

هدف از مطالعه حاضر بررسی پتانسیل تمایزی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان چهار گونه حیوانی (جوجه نژاد Raf، خرگوش نژاد آلبینو، رت Wistar و موش c57) و مقایسه آن با پتانسیل تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از سینوویوم زانوی انسان بوده است. در همه سلول‌های ذکر شده توان تمایز به سه رده استخوانی، غضروفی و چربی بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

سلول‌ها. سلول‌های مورد استفاده در این پژوهش قبلاً در انستیتو پاستور ایران جداسازی و شناسایی شده و در نیتروژن مایع ۱۹۶- درجه نگهداری شده بودند.

ذوب و کشت مجدد سلول‌ها. پس از آماده کردن بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد، سلول‌ها به سرعت از تانک ازت به داخل بن ماری منتقل شدند. سپس ویال‌ها به زیر هود منتقل شده با کمک پی‌پت استریل میزان ۴ میلی‌لیتر از محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) با درصد گلوکز پایین،۱۰درصد سرم جنین گاوی، پنی‌سیلین

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

۱۰۰ واحد در سی‌سی (Sigma,USA) و ۱۰۰ میکروگرم در سی‌سی استروپتومایسین (Sigma,USA) با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به درون فالکون‌های استریل ریخته شد. محتویات ویال‌ها داخل فالکون‌ها ریخته و سپس سانتریفوژ شدند تا اثرات سمی موجود در محیط انجماد برداشته شود. در نهایت پلیت‌های سلولی حاصل از هر فایکول با ۱ الی ۲ سی‌سی محیط کشت سوسپانسیون گردیده و مجدداً داخل فلاسک‌های کشت سلول، کشت شدند. سپس فلاسک‌ها درون انکوباتور با شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد قرار داده شدند تا رشد کنند. پس از ۱۲-۶ ساعت محیط رویی سلول‌ها که حاوی سلول‌های نچسبیده بود دور ریخته شد و محیط جدید اضافه شد و به منظور تکثیر سلولی، ادامه کشت در همان شرایط انجام شد. هر سه روز یک بار محیط سلول‌ها تعویض شد. پس از چند ساعت بعد از کشت اولیه، اولین سلول‌های فیبروبلاستی مشاهده شدند و بعد از ۸-۶ روز ۸۰-۷۰درصد سطح ظرف کشت را پوشاندند. سپس سلول‌ها از پاساژ سوم با کمک EDTA ۰/۰۲درصد در Trypsin ۰/۲۵درصد جدا و با تراکم ۵۰۰۰ سلول در سانتی‌متر مربع در ظرف‌های ۱۲ خانه‌ای کشت شدند. به این ترتیب از پاساژ ۳ به منظور مراحل بعدی آزمایش یعنی تمایز استفاده شد.

القا سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوسیت در in vitro. بدین منظور از سلول‌های پاساژ ۳ استفاده شد و با دانسیته ۵۰۰۰ سلول بر سانتی‌متر مربع سلول‌ها در ظروف ۱۲ خانه‌ای کشت شدند. پس از مرحله confluency محیط سلول‌ها با محیط تمایز به استئوسیت جایگزین شد که این محیط شامل DMEM، ۱۰FBS درصد (Fetal bovine serum) حاوی L 50 µg/ml- آسکوربیک اسید ۲- فسفات (Sigma,USA)، 10^{-7} M دگزامتازون (Sigma,USA) ۱۰mM و بتا گلیسرول فسفات (Sigma,USA) بود. هر ۳-۲ روز یک‌بار محیط کشت تعویض شد و به مدت ۲۱ روز سلول‌ها تحت تأثیر محیط القاکننده تمایز به استئوسیت قرار گرفتند. به عنوان گروه کنترل، محیط برخی از خانه‌ها با محیط معمولی یعنی DMEM با درصد گلوکز پایین، ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و آنتی‌بیوتیک جایگزین شد.

القا سلول‌های بنیادی مزانشیمی به آدیپوسیت در in vitro. سلول‌های پاساژ ۳ با دانسیته ۵۰۰۰ سلول بر سانتی‌متر مربع در ظرف‌های ۱۲ خانه‌ای کشت شدند و پس از این که سلول‌ها به سطح پوشانندگی رسیدند، محیط آن‌ها با محیط القاکننده تمایز به آدیپوسیت جایگزین شد. این محیط شامل DMEM-LG، ۱۰درصد FBS محتوی M 10^{-7} دگزامتازون (Sigma,USA) ۳۰/۵mM-ایزوبوتیل ۱-متیل‌گزانتین (Sigma,USA) ، ۱ واحد از ترکیب انسولین- ترانسفرین- سلنیت سدیم (Gibco) و ۱۰mM ایندومتاسین (Sigma,USA) بود که سلول‌ها به مدت ۲۱ روز تحت تأثیر القا قرار گرفتند. هر سه روز یک‌بار تعویض محیط صورت گرفت. به عنوان گروه کنترل، محیط برخی از خانه‌ها با محیط معمولی یعنی DMEM با درصد گلوکز پایین، ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و آنتی‌بیوتیک جایگزین شد.

القا سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کندروسیت در in vitro. سلول‌ها از فلاسک کشت با دانسیته ۲۰۰۰۰۰ سلول بر سانتی‌متر مربع به تیوب ۱۵ میلی‌لیتری از جنس پروپیلن منتقل و در دور ۲۰۰۰ rpm و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند و توده کوچک سلولی در ته تیوب تشکیل شد و بعد، محیط القاکننده تمایز به غضروف که شامل محیط کشت DMEM-LG، ۱۰درصدFBS محتوی 10^{-6} دگزامتازون(Sigma,USA)، ۵۰µg/m L- آسکوربیک اسید ۲- فسفات (Sigma,USA)، ۱۰ng/mlفاکتور رشد ترانسفورمینگ بتا (Sigma,USA) و۱ واحد از ترکیب انسولین- ترانسفرین- سلنیت سدیم (Gibco) بود به مدت چهار هفته به سلول‌ها اضافه شد. در این مدت هر سه روز یک‌بار محیط سلول‌ها تعویض شد. به عنوان گروه کنترل، محیط برخی از کشت‌ها با محیط معمولی یعنی DMEM با درصد گلوکز پایین، ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و آنتی‌بیوتیک جایگزین شد.

ارزیابی تمایز استئوسیت. در تمایز استئوژنیک، سلول‌ها دو بار با محلول PBS (Phosphate buffered saline) شستشو شدند. سپس در پارافرمالدئید ۴درصد برای مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفته و فیکس شدند. پس از اتمام زمان ذکر شده، سلول‌ها مجدداً با محلول PBS کاملاً شستشو داده شدند. سپس سلول‌ها با رنگ آلیزارین رد s ۲درصد با PH=۱/۴ به مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند و در انتها رنگ اضافی با آب مقطر خارج شد. پس از رنگ‌آمیزی، رسوبات کلسیم که محصول سلول‌های استخوانی هستند در ظرف کشت ۱۲ خانه‌ای مورد بررسی قرار گرفتند و از هر چاهک، ۶ فیلد به طور تصادفی انتخاب و با استفاده از میکروسکوپ چشمی (Eyepiece micrometer) درصد مناطق رنگی (معدنی شده) در ۵ رده سلولی تعیین شد و میانگین آن‌ها از نظر آماری مورد مقایسه قرار گرفت.

ارزیابی تمایز آدیپوسیت. سلول‌ها بعد از دو بار شستشو با محلول PBS و تثبیت شدن با پارافرمالدهید ۴درصد به کمک رنگ اویل رد (با غلظت ۰/۳ درصد ایزوپروپانول ۶۰درصد) به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق، رنگ‌آمیزی و سپس با آب مقطر شستسشو شد. واکوئل‌های چربی در سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. پس از رنگ‌آمیزی با اویل رد در ظرف کشت ۱۲ خانه‌ای، از هر چاهک، ۶ فیلد به طور تصادفی انتخاب و با استفاده از میکروسکوپ چشمی (Eyepiece micrometer)درصد مناطق رنگی (قطره چربی) در ۵ رده سلولی تعیین شد و میانگین آن‌ها از نظر آماری مورد مقایسه قرار گرفت.

ارزیابی تمایز کندروژنیک. نمونه‌ها به روش روتین بافتی پردازش و برش‌های ۵ میکرومتری از آن‌ها تهیه شد. به این ترتیب که پلیت سلولی موجود در انتهای تیوپ پلی‌پروپیلن به مدت ۲ ساعت در پارافرمالدهید۱۰درصد فیکس شد، سپس با استفاده از الکل و گزیلل به ترتیب آب‌گیری و شفاف‌سازی شد و در پارافین قالب‌گیری شده، با استفاده از میکروتوم، برش‌های ۵ میکرومتری تهیه گردید. سپس رنگ تولوئیدن بلو با غلظت ۰/۱درصد به مدت ۲ دقیقه به مقاطع بافتی افزوده شد. در انتها رنگ اضافی با آب مقطر شسته شد. هسته، اسید موکوپلی ساکاریدها و موکوپلی ساکاریدهای سولفاته مترشحه از سلول‌های غضروفی به وسیله میکروسکوپ نوری و نرم‌افزار mutic، در واحد سطح، تحت بررسی قرار گرفت. در مشاهدات میکروسکوپی به وسیله روش شمارش سلولی (cell counting) در ۵ رده سلولی انجام شد و میانگین آن‌ها از نظر آماری مورد مقایسه قرار گرفت.

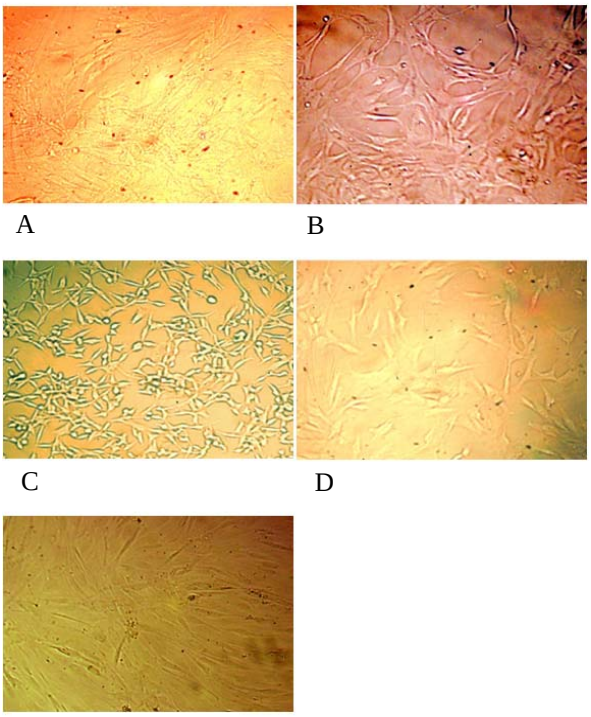
آنالیز آماری. آزمایش‌ها حداقل در ۵ تکرار انجام شد و داده‌های به دست آمده در برنامه آماری SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تمام نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است. تفاوت آماری بین مقادیر میانگین توسط آزمون One Way ANOVA بررسی شد و اختلاف P<۰/۰۵ معنی‌دار گزارش شد.

نتایج

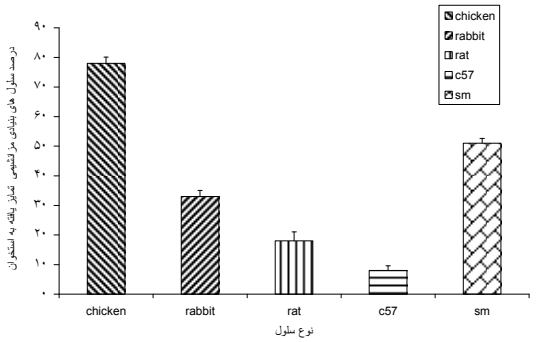
کشت سلولی. به دنبال ذوب سلولی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر اساس قابلیت چسبندگی به ظرف کشت پلاستیکی و بدون هیچ تغییری در سرعت رشد، مورفولوژی سلولی و پتانسیل تزاید شروع به تکثیر نمودند. سیکل سلولی و تکثیر سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان خرگوش، رت، جوجه، موش C57 و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت سینوویوم زانوی انسان تقریباً شبیه بودند. بعد از ۸-۶ روز confluency سلول‌ها به ۸۰-۷۰درصد رسید. سلول‌های فیبروبلاستی مغز استخوان با انجام ۳ پاساژ متوالی تکثیر شدند. این سلول‌ها، ریخت‌شناسی فیبروبلاستی خود را در طی دوره کشت حفظ کردند (شکل ۱).

تمایز به استخوان. در پایان دوره تمایز، تمایز سلولی با روش رنگ‌آمیزی آلیزارین رد مورد ارزیابی قرار گرفت. نتیجه رنگ‌آمیزی قرمز شدن مواد خارج سلولی معدنی شده در کشت تمایز به استخوان بود. در این کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان جوجه (۲/۷۰±۵۸/۱۶) قرمز شدند، در حالی که به ترتیب سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت سینوویوم زانوی انسان (۱/۶۰±۵۱/۵۰)،

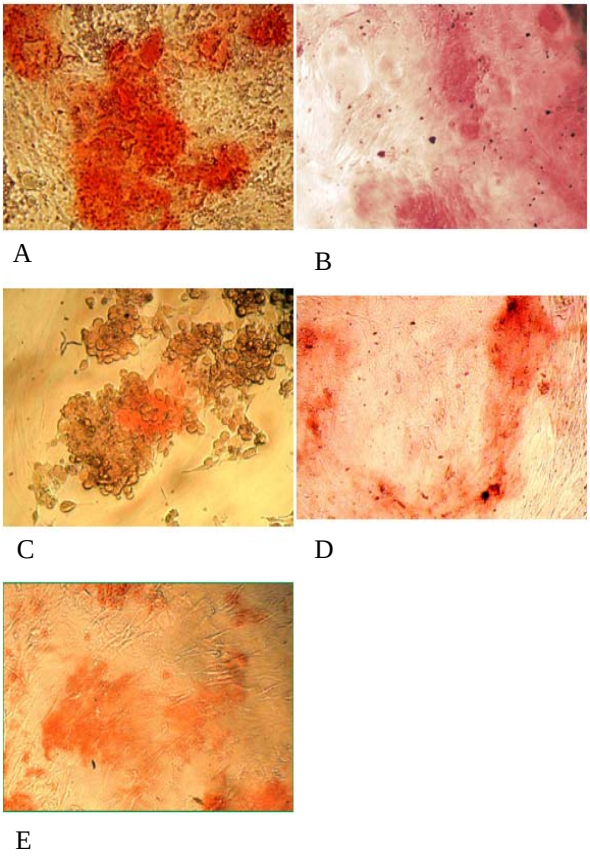
سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان خرگوش (۳۳/۵۰±۲/۷۰)، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان رت (۱۸/۵۰±۳/۰۸)، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش C57 (۸/۵۰±۱/۶۰) رنگ گرفتند که این تفاوت ها از لحاظ آماری معنی‌دار بود (P<۰/۵۰) (شکل ۲ و ۳).



شکل ۱. سلول‌های پاساژ سوم: A) سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان جوجه. B) سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت. C) سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش C57. D) سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان خرگوش. E) سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از سینوویوم زانوی انسان (درشت نمایی x100).



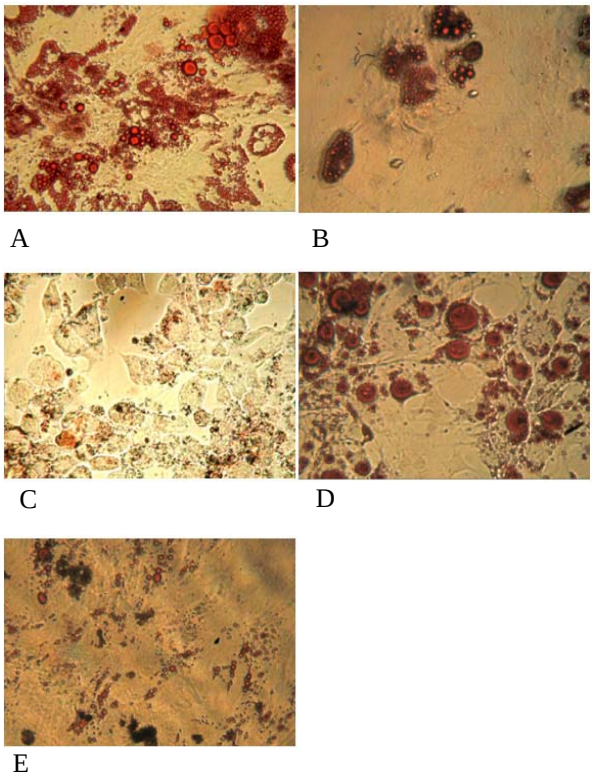
شکل ۲. بازده سلول‌های بنیادی مزانشیمی در تمایز به استئوسیت



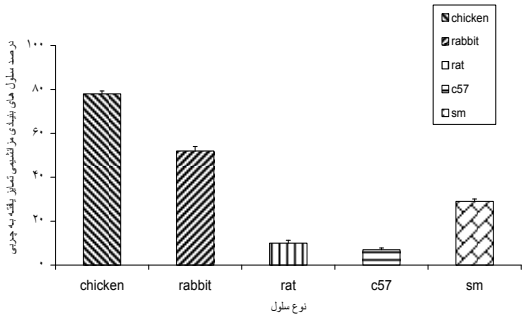
شکل ۳. تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استخوان که به مدت ۲۱ روز در معرض محیط تمایز به استخوان قرار گرفته‌اند و با آلیزارین رد رنگ آمیزی شدند. A) سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان جوجه (درشت نمایی ۲۵۰x). B) سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت (درشت نمایی ۱۰۰x). C) سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش C57 (درشت نمایی ۱۰۰x). D) سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان خرگوش (درشت نمایی ۲۵۰x). E) سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت سینوویوم زانوی انسان (درشت نمایی ۲۵۰x). در مقایسه با سلول‌های کنترل منفی (شکل۱) که به مدت ۲۱ روز در محیط فاقد القا قرار داشتند.

تمایز به آدیپوسیت. در پایان دوره تمایز برای نشان دادن قطرات چربی در سیتوپلاسم سلول‌ها، از رنگ‌آمیزی اویل رد استفاده شد. در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان جوجه تعداد سلول‌های چربی به طور معنی‌داری (۷۵/۵۰±۱/۳۳)، بیش از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان خرگوش (۵۲/۵۰± ۲/۰۴)، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت سینوویوم زانوی انسان (۲۹/۳۳±۱/۱۱)، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان رت (۱۰/۳۳±۱/۳۵)، سلول‌های بنیادی مزانشیمی

مشتق از مغز استخوان موش C57 (۷/۳۳±۰/۷۷) بود که این تفاوت‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰ ۵) (شکل۴و ۵).

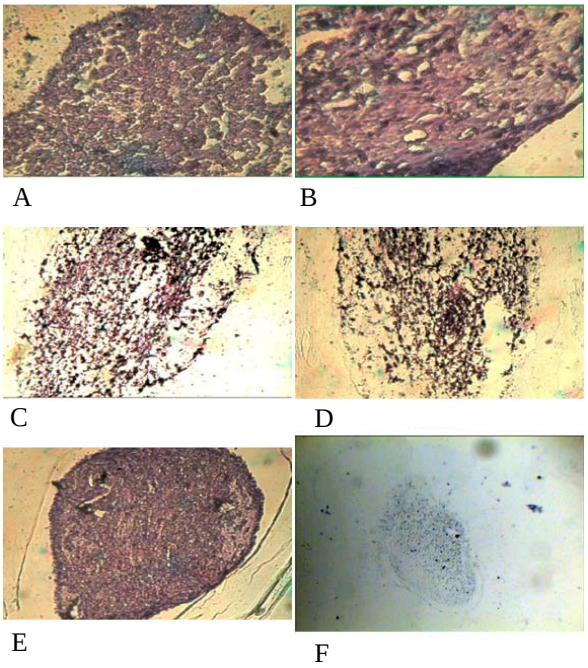


شکل ۴. تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به چربی که بـه مـدت ۲۱ روز در معرض محیط تمایز به چربی قرار گرفته‌اند و با اویل رد او رنگ آمیزی شده اند: A) سلول‌هـای بنیـادی مزانـشیمی مغـز اسـتخوان جوجـه. B) سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز اسـتخوان رت. C) سـلول‌هـای بنیـادی مزانشیمی مغز استخوان موش C57. D) سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغـز استخوان خرگوش. E) سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت سینویوم زانوی انسان. در مقایسه با سلول‌های کنترل منفی (شکل ۱) که بـه مـدت ۲۱ روز در محیط فاقد القا قرار داشتند.

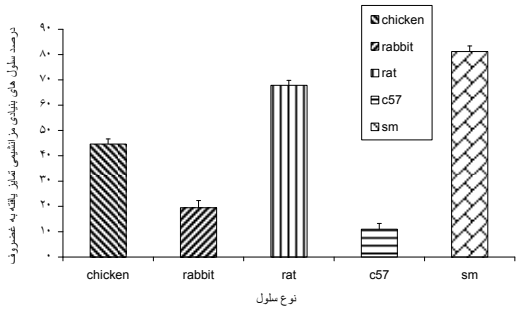


شکل ۵. بازده سلول‌های بنیادی مزانشیمی در تمایز به آدیپوسیت.

تمایز به غضروف. در پایان دوره تمایز، تمایز برای هسته، اسید موکوپلی ساکاریدها و موکوپلی ساکاریدهای سولفاته مترشحه از سلول‌های غضروفی با رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو مورد ارزیابی قرار گرفت. تعداد سلول‌های متمایز شده به غضروف در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت سینوویوم زانوی انسان به طور معنی‌داری (۸۱/۱۶±۲/۲۴) به ترتیب بیش از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان رت (۶۷/۸۳±۱/۹۲)، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان جوجه (۴۴/۶۶±۱/۹۹)، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان خرگوش (۱۹/۵۰±۱/۸۳)، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش C57 (۱۱/۰۰±۲/۲۶) بود که این تفاوت‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰ ۵) (شکل ۶ و ۷).



شکل ۶. تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به غـضروف در حـضور القـأ کننده ها: A) سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز اسـتخوان جوجـه (درشـت نمایی ۴۰۰x). B) سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت (درشت نمایی ۴۰۰x). C) سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان مـوش C57 (درشت نمایی ۱۰۰x). D) سلول‌هـای بنیـادی مزانـشیمی مغـز اسـتخوان خرگوش (درشت نمایی ۱۰۰x). E) سلول‌های بنیادی مزانشیمی مـشتق از بافت سینویوم زانوی انسان (درشت نمایی ۱۰۰x). F) سلول‌هـای بنیـادی مزانشیمی که به مدت ۴ هفته در محیط فاقد القا قرار داشتند و با تولوئیـدن بلو رنگ آمیزی شده اند. سلولهای کنترل منفی (درشت نمایی ۱۰۰x).



شکل ۷. بازده سلول‌های بنیادی مزانشیمی در تمایز به کندروسیت

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه‌ی حاضر با کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان جدا شده از استخوان درشت نی و نازک نی رت، خرگوش، جوجه، موش C57 و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت سینوویوم زانوی انسان، پتانسیل آن‌ها در تمایز به سه رده استخوانی، چربی و غضروفی ارزیابی گردید. یکی از جنبه‌هایی که در ارتباط با سلول بنیادی مزانشیمی وجود دارد این است که یک شناساگر مشخص و یا ترکیبی از شناساگرهای ویژه بافتی به منظور شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط خارج و یا داخل بدن وجود ندارد و این یکی از مشکلاتی است که در ارتباط با سلول‌های بنیادی مزانشیمی هم‌چنان حل نشده باقی‌مانده است. اهمیت این شناساگرها، در بازشناسی سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از جداسازی آن‌ها از مغز استخوان و تکثیر آن‌ها در محیط کشت می‌باشد [۱۹]. آن‌چه امروزه در شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی اهمیت دارد، این است که چنان‌چه این سلول‌ها مورفولوژی فیبروبلاستی شکل داشته باشند و از نظر شناساگرهای سلول‌های بنیادی خون‌ساز منفی باشند و حداقل گروهی از مهم‌ترین شناساگرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی را هم‌چون SH_2, SH_3, SH_4 بیان کنند می‌توانند به عنوان سلول‌های بنیادی مزانشیمی مطرح شوند که مختص سلول‌های انسانی بوده و در گونه‌های حیوانی بیان نمی‌شوند [۲۰،۱۹]. آن‌چه به طور یقین هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی را ثابت می‌کند پتانسیل تمایز آن‌ها، حداقل به سه نوع سلول استخوان، غضروف و چربی می‌باشد [۲۳-۲۱]. مطابق شکل ۱ سلول‌های مورد نظر به دنبال ذوب پس از مرحله انجماد مجدداً به ظروف کشت چسبیده و بدون هیچ تغییری در سرعت رشد، مورفولوژی سلولی و پتانسیل تزاید شروع به تکثیر نموده و قدرت تمایزی خود را حفظ کرده بودند. هر چند پتانسیل تمایزی به استئوسیت، آدیپوسیت و کندروسیت در مورد همه سلول‌های به کار رفته در این تحقیق به صورت جداگانه و البته به صورت کیفی مشخص و ثابت شده است [۲۸-۲۵] اما تا کنون در هیچ مطالعه‌ای، پتانسیل تمایزی سلول‌های مذکور به صورت کمی با هم مقایسه نشده است. لذا در تحقیق حاضر بر آن شدیم تا ضمن بررسی بازده تمایزی سلول‌های یاد شده به سه رده استخوانی، چربی و غضروفی، این پتانسیل را در آن‌ها به صورت کمی مقایسه کنیم. نتایج حاصل نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی در ۴ گونه حیوانی و بافت سینوویوم زانوی انسان (SM)، قادرند با فراهم شدن شرایط کشت آزمایشگاهی مناسب به سه رده استخوانی، چربی و غضروفی تمایز یابند. بیش‌ترین پتانسیل تمایز به آدیپوسیت و استئوسیت در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان جوجه و بیش‌ترین پتانسیل تمایز به کندروسیت در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از سینوویوم زانوی انسان مشاهده گردید. محققان در آزمایشگاه‌ها سعی در کشف راه‌هایی جهت رشد و تغییر سلول‌های بنیادی بالغ برای درمان بیماری و آسیب دارند. برخی از مثال‌های درمانی احتمالی این سلول‌ها شامل تعویض سلول‌های دوپامین‌ساز در مغز افراد مبتلا به پارکینسون، ایجاد سلول‌های انسولین‌ساز برای دیابت نوع یک، ترمیم سلول‌های ماهیچه کاردیاک پس از حملات قلبی و درمان استئوژنز ناقص می‌باشد. چندین نوع آزمایش حیوانی و کلینیکی با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در مهندسی بافت، تحقیقات سلولی و ژن‌درمانی در حال انجام است [۲۳،۱۲]. در مطالعه حاضر سلول‌های مغز استخوان جوجه، خرگوش، رت، موش C57 و سلول‌های مشتق از بافت سینوویوم انسان کشت شدند. سلول‌های چسبیده به سطح ظرف کشت حاصل از پاساژ سوم،

از لحاظ مورفولوژی، تمایز به استخوان، چربی و غضروف مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج ما اولین گزارش مبنی بر وجود برخی تفاوت‌های معنی‌دار بین پتانسیل تمایز در همه انواع سلول‌های به کار رفته در این تحقیق می‌باشد. سلول‌های استخوانی از حالت نامتمایز (دوکی شکل و کشیده) به صورت سلول‌های گرد، تغییر شکل داده و توسط ماده زمینه (ماتریکس) احاطه شده و مطابق شکل ۲ رسوبات کلسیم که نشانه مینرالیزاسیون در سلول‌های استخوانی است در سلو ل‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان جوجه بیش از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت، خرگوش، C57 و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت سینوویوم زانوی انسان مشاهده گردید. علاوه بر این، در مرحله القای آدیپوژنیک، قطرات طبیعی لیپید در سیتوپلاسم سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان جوجه در هفته اول ظاهر شده و حجم قطرات لیپید به تدریج افزایش پیدا کرد، در حالی که این واکوئل‌ها در سلول‌های جدا شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت، خرگوش، C57 و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت سینوویوم زانوی انسان در هفته دوم مشاهده گردید و بدین ترتیب مطابق شکل ۳ پتانسیل بیش‌تر سلول‌های مغز استخوان جوجه در تمایز به سلول‌های چربی در مقایسه با سلول‌های جدا شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت، خرگوش، C57 و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت سینوویوم زانوی انسان تأیید شد. مطالعات پیشین نشان داده شده است که یکی از شرایط مهم برای غضروف‌سازی، ایجاد تراکم سلولی در سلول‌های پیش‌ساز غضروفی است [۲۴]. در این تحقیق با عمل سانتریفوژ، این تراکم برای ۵ نوع سلول مورد مطالعه با شرایط یکسان (دور سانتریفوژ) به طور مصنوعی ایجاد شد و نتیجه پتانسیل تمایز در سلول‌های مورد نظر متفاوت بود. به طوری که مطابق شکل ۴ درصد بیش‌تری از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت سینوویوم زانوی انسان به غضروف تمایز یافتند می‌توان امیدوار بود که در آینده بتوان از این سلول‌ها برای مقاصد سلول درمانی ضایعات غضروفی استفاده کرد.

نتایج حاضر حاکی از آن است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان جوجه بهترین پتانسیل برای تمایز به آدیپوسیت و استئوسیت را دارا بوده در حالی‌که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت سینوویوم زانوی انسان واجد بالاترین پتانیسل تمایز به کندروسیت می‌باشند. در مجموع می‌توان گفت توانایی تمایز سه گانه به لاین‌های سلولی استخوان، چربی و غضروف در هر پنج رده سلولی تأیید شد ولی بازده پتانسیل تمایز در آن‌ها متفاوت می‌باشد. این تفاوت می‌تواند ناشی از تغییرات گونه‌ای و یا تفاوت‌های ریز محیط اطراف سلول‌ها در حالت in vivo باشد. درک این اختلافات می‌تواند در نهایت منجر به استفاده موثرتر از این سلول‌ها در کلینیک گردد. به علاوه نتایج این تحقیقات می‌تواند در پیش‌برد تحقیقات انسانی و پرورش حیوانات برای پیوند عضو به انسان موثر باشد.

تشکر و قدردانی

از همکاری صمیمانه اعضای گروه بیوشیمی انستیتو پاستور ایران که در انجام این تحقیق نهایت همکاری را داشته‌اند، تشکر و قدردانی می‌نماییم.

منابع

[1] Kadivar M, Khatami S, Mortazavi Y, Soleimani M, Taghikhani M. and Shokrgozar MA. Isolation, cultuture and charachterization of postnatal human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells. DARU 2005; 13: 170-176.

[2] Kadivar M, Khatami S, Mortazavi Y, Taghikhani M, Shokrgozar MA. Multilineage differentiation activity by the human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells. Iranian Biomed J 2006; 10: 175-184.

[3] Jäger M, Wild A, Lensing-Ho¨hn S. and Krauspe R. Influence of different culture solutions on osteoblastic differentiation in cord blood and bone marrow derived progenitor cells. Biomed Tech 2003; 48: 241-244.

[4] Watt FM. and Hogan BL.Out of Eden: Stem cells and their niches. Science 2000; 287: 1427-1430.

[5] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R. Mosca JD. and et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cell. Science 1999; 284: 143-147.

[6] Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U. and et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. Exp Hematol 2005; 33: 1402-1416.

[7] Kogler G, Sensken S. and Wernet P. Comparative generation and characterization of pluripotent unrestricted somatic

[18] Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. Science 2000; 287: 1442-1446.

[19] Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, Murphy JM. and Zaia J.The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). Bioch Biophys Res Commun 1999; 265: 134-139.

[20] Haynesworth SE, Baber MA. and Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. Bone 1992; 13: 69-80.

[21] Kadiyala S, Young RG, Thiede MA. and Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. Cell Transplant 1997; 6: 125-134.

[22] Fialkov JA, Holy CE, Shoichet MS. and Davies JE. In vivo bone engineering in a rabbit femur. J Craniofac Surg 2003; 14: 324-332.

[23] Gong Z. and Niklason LE. Small-diameter human vessel wall engineered from bone marrow derived mesenchymal stem cell (hMSCs). Faseb J 2008; 22: 1635-1648.

[24] Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM. And Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. Exp Cell Res 1998; 238: 265-272.

[25] Kadivar M, Piryaei F. and Ramezani M. Isolation, culture and differentiation of chicken bone marrow mesenchymal stem cells. Armaghane Danesh 2009; 14: 1-11.(Persian).

[26] Kadivar M, Darvishi M. and Salehi Moghadam M. Isolation, culture and characterization of human synovium derived mesenchymal stem cells. Yakhteh 2009; 11: 160-167. (Persian).

[27] Wang X, Hisha H, Taketani S, Adachi Y, Li Q, Cui W. and et al. Charactrisation of mesenchymal stem cells isolated from mouse fetal bone marrow. Stem cells 2006; 24: 482-493.

[28] Arrigoni E, Lopa S, de Girolamo L, Stanco D. and Brini AT. Isolation, characterization and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells: from small to large animal models. Cell Tissue Res 2009; 338: 401-411.

stem cells with mesenchymal stem cells from human cord blood. Exp Hematol 2006; 34: 1589-1595.

[8] Jones E, Gonagle Mc. Human bone marrow mesenchymal Stem cell in vivo. Rheumatology 2007; 28: 6-10.

[9] Izad Panah R, Kaushal D, Kriedt C, Tsien F, Patel B,Dufour J. and Bunnell A. Long-term in vitro expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cell. Caner Res 2008; 68: 4229-4238.

[10] Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. Exp Hematol 2002; 30: 896-904.

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

[12] Hung SC, Chen NJ, Hsieh SL, Li H, Ma HL. and Lo WH. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. Stem Cells 2002; 20: 249-258.

[13] Bianco P, Riminucci M, Gronthos S. and Robey PG. Bone marrow stromal stem cells. Nature,Biology, and potential applications. Stem cells 2001; 19: 180-192.

[14] Eslaminejad MB, Mirzadeh H, Mohamadi Y. and Aghbibi N. Bone differentiation of the marrow-derived mesenchymal stem cells using β-tricalcium phosphate/alginate/gelatin hybrid scaffolds. J Tiss Eng Reg Med 2007; 1: 417- 424.

[15] Shao X, Goh JC, Hutmacher DW, Lee EH.and Zigang G. Repair of large articular osteochondral defects using hybrid scaffolds and bone marrow-derivedmesenchymal stem cells in rabbit model. Tissue Eng 2006; 12: 1539-1551.

[16] Ringe J, Kaps C, Schmitt B, Buscher K, Bartel J, Smolian H. and et al. Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. Cell Tissue Res 2002; 307: 321-327.

[17] Abdallah BM. and Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. Gene Ther 2008; 15: 109-116.

Comparison of the differentiation potential of human mesenchymal stem cells and several animal species

Mehdi Kadivar (Ph.D) [*1], Fatemeh Piryaei (M.Sc)[2], Mina Ramezani (Ph.D) [3]
1- Dept. of Biochemistry, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
2- Dept. of Biology, Faculty of Science, Payame Noor University, Center of Tehran, Tehran, Iran
3- Dept. of Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Ashtian Branch, Ashtian, Iran

(Received: 7 Dec 2009 Accepted: 13 Apr 2010)

Introduction: Considering the increasing use of mesenchymal stem cells isolated from various sources in the clinic, the basic studies needed to evaluate proliferation, differentiation and other biological characteristics of them done. In the present study, efficiency and power differentiation in five different categories mesenchymal stem cells are compared with each other.

Materials and Methods: Bone marrow mesenchymal stem cells from rabbits, rats, C57 mice , chicken and mesenchymal stem cells derived from human knee synovium tissue were cultured with a density of 5000 cells/cm2 in 12-chamber dishes. After the cells reached the appropriate level of growth, specific differentiation inducers were added. 21 days later, differentiation of all stem cells to adipocyte, osteocyte and chondrocyte were evaluated and compared using specific staining methods.

Results: Our results indicated that all five mesenchymal stem cells were able to differentiate into osteocyte, adipocyte and chondrocyte. Moreover, the highest potentials for differentiation to adipocyte and osteocyte and chondrocyte were seen in mesenchymal stem cells derived from chicken bone marrow and human synovium, respectively.

Conclusion: In this study, differences in the differentiation potential of mesenchymal stem cells isolated from different tissues and species were observed that could be caused by small differences in their environment in vivo. Understanding these differences can lead to more effective use of these cells in the clinic.

Keywords: Stem cells, Mesenchymal stem cells, Cell differentiation

***** Corresponding author: Fax: +98 21 66402770; Tel: +98 21 66969298
kadivar@pasteur.ac.ir