

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

کاظم پریور*

نسیم حیاتی*

سحر خرقانی**

چکیده

زمینه و هدف: سلول های بنیادی سلول هایی با پتانسیل تمایزی گسترده، در مراحل مختلف تکوینی هستند که می توانند در ترمیم و بازسازی یک بافت صدمه دیده ایفای نقش کنند. این سلول ها دارای ویژگی خود نوزایی بوده و قادرند برای مدت طولانی سلول های 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 (۵). هدف از این مطالعه بررسی تأثیر عصاره 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 سلول های شبه هپاتوسیتی با مورفولوژی سلول هایی چند وجهی، هسته درشت و سیتوپلاسم

*دانشگاه آزاد اسلامی، تهران واحد علوم تحقیقات، گروه زیست شناسی

**دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست شناسی saharikh83@gmail.com

۱۲ فصلنامه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی/سال اول، شماره ۱، بهار ۹۱

دانه‌دار تبدیل شدند. گلیکوژن در سلول‌های تمایز یافته استفاده شد که نتیجه آن مثبت بود و دانه‌های گلیکوژن در سلول‌های تمایز یافته به رنگ قرمز ظاهر گردیدند. از تست پرئودیک اسید شیف^۱ نیز جهت اثبات این مورد استفاده شد.

در این مطالعه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف جنین موش ماده باردار ۱۷ تا ۱۴ روزه استفاده شد. سلول‌های بند ناف توسط محلول آنزیم تریپسیناز انکوبه گردیدند و به دنبال آن از طریق عمل مکانیکی پیپت کردن، سوسپانسیون سلول‌های حاصله در پلیت‌های 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 سلول‌های مزبور از تست پرئودیک اسید شیف برای شناسایی سلول‌های شبه کبدی استفاده گردید. عصاره کبدی را با دوزهای متفاوت (۵۰λ، ۴۰λ، ۳۰λ، ۱۵λ) برای القای سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده گردید که نهایتاً نتایج در چهار گروه تجربی دسته بندی گردیدند.

نتایج این پژوهش نشان دادند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف موش توانایی تغییر و تبدیل به سلول‌های شبه هپاتوسیتی را دارند که سلول‌های چند وجهی با هسته‌های درشت و هستک‌های واضح مشخص‌اند. و دوز مؤثر عصاره کبدی برای القای سلول‌های بنیادی مزانشیمی در جهت تغییر و تبدیل به سلول‌های کبدی ۱۵ لاند مشخص گردید.

بند ناف جنین موش منبع مناسبی برای به دست آوردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد. که این سلول‌های دارای مورفولوژی دوکی شکل هستند، سلول‌های حاصله از القای آن‌ها توسط عصاره کبدی، سلول‌ها با مورفولوژی چند وجهی و هسته‌های درشت را نشان دادند.

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

in vitro

1 Periodic Acid-schiff

مقدمه

با کشف سلول های بنیادی حدود ۳۰ سال پیش، پیشرفت شگرفی در زیست شناسی و طب تجربی^۱ 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 سلول ها 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^۲) 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 سلول های پیش ساز برای بدن نقش یک سیستم تعمیر کننده را بازی کنند و با جایگزین کردن سلول های تخصص یافته، چرخه ترمیم بافت ها را از جمله خون، پوست، کبد، روده و... را حفظ کنند (۲). سلول های 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 می یابد (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 می دهند (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، و ماهیچه ای اسکلتی، پانکراس، کبد، دندان های شیری، مایع آمینوتیک و خون بند ناف جدا کرده اند که در مقایسه با سلول های مغز استخوان، این منابع در دسترس تر می باشند (۴، ۵).

1 Experimental medicine

2 Self Renewal

مواد و روشها

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

جدا کردن سلول های بنیادی مزانشیمی بافت بند ناف و کشت اولیه آن ها

جنین ها 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 سانترفیوژ یخچالدار تقسیم بندی شدند و پس از سانترفیوژ مایع رویی دور ریخته شد و بر روی سلول های ته نشین شده تریسیسین 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 سانترفیوژ شدند. پس از این مرحله مایع رویی در پلیت های مخصوص کشت سلول در انکوباتور قرار داده شدند. پلیت های کشت در انکوباتوری با رطوبت ۹۵٪ درصد و CO_2 ۵٪ 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 سلول های بنیادی تمایز نیافته استفاده گردید. که پس از ۷ روز سلول های به دست آمده نیز دارای ظاهری دوکی شکل و کشیده به همراه هسته های گرد سلول های مزانشیمی شدند.

تهیه عصاره 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 عصاره غلیظ کبدی تبدیل گردد، سپس این عصاره غلیظ توسط محلول محیط کشت رقیق تر شد.

بررسی تأثیر عصاره کبدی جنینی بر سلول های بنیادی مزانشیمی بند ناف..... ۱۵

نتیجه گیری

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 ۱۰٪ سرم گاوی^۱ + محلول محیط کشت^۲ + ۵۰ لاندا عصاره کبدی

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

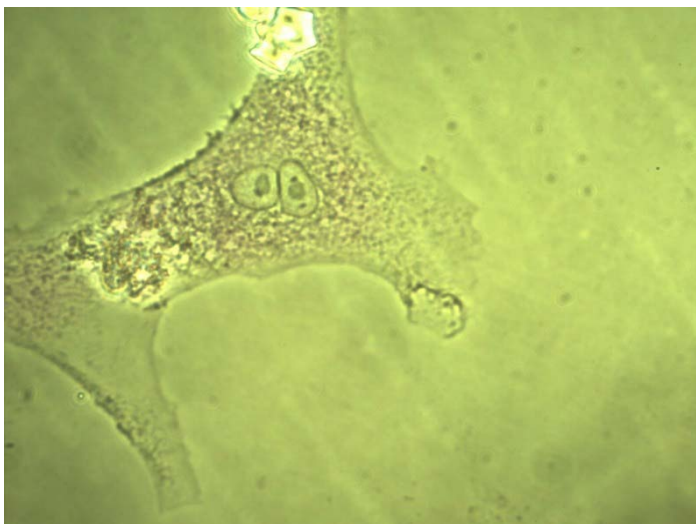
گروه سوم: میزان ۵٪ سرم گاوی + محلول محیط کشت + ۳۰ لاندا عصاره ی کبدی

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

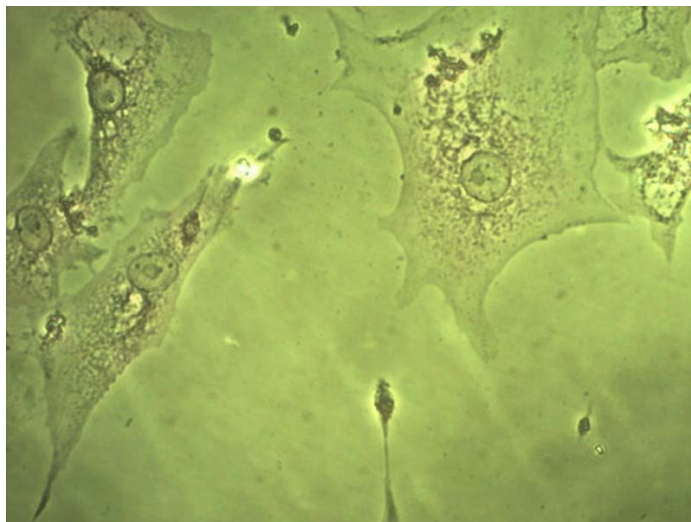
پس از جدا سازی و کشت سلول های بنیادی مزانشیمی بند ناف جنین موش های حامله ۱۴-۱۷ روزه آن ها با میکروسکوپ اینورت مورد بررسی و مطالعه قرار داده شدند. که سلول هایی فیبروبلاستی با مورفولوژی کشیده به همراه هسته های درشت و زوائد سیتوپلاسمی جهت چسبندگی به بستر پلیت کشت سلولی بودند. هر ۴ روز یکبار محیط کشت سلول ها تعویض شد و سلول های مرده از محیط حذف شدند و نیز هر چهار روز یک بار عصاره با غلظت های گفته شده در دسته بندی فوق به پلیت های کشت اضافه گردید. پلیت ها سلول ها در گروه سوم و چهارم میزان سلول های مرده 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 پایین تری از عصاره کبدی و میزان پایین تری از سرم گاوی نتیجه بهتری حاصل گردید. در نهایت در روز ۳۰ پس از تأثیر اولین دوز عصاره کبدی، سلول های شبه کبدی با ساختاری مشابه سلول های 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 یافته کبدی می باشد، با استفاده از تکنیک رنگ آمیزی پرئودیک 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) (شکل ۲) و (شکل ۳).

1 FBS (Fetal Bovine SerumI)

2 DMEM

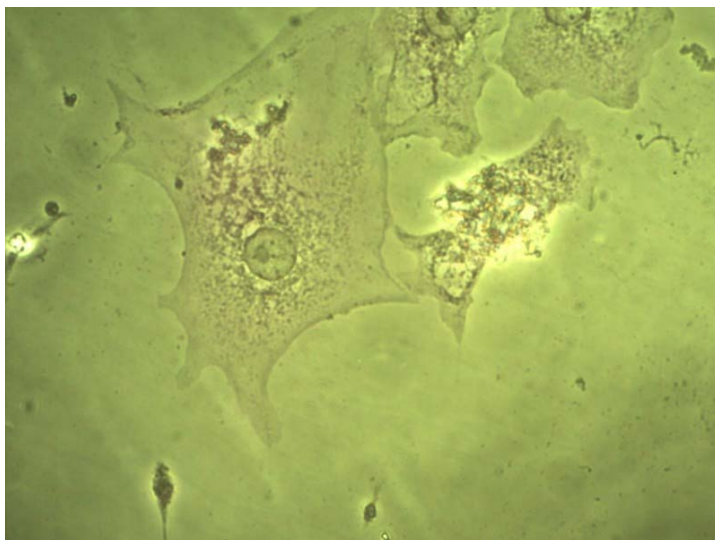


شکل(۱): در این تصویر هسته در حال تقسیم و سیتوپلاسم دانه دار یک سلول چند وجهی شبه کبدی مشخص است، رنگ قرمز در سیتوپلاسم سلول دلیل بر حضور گلیکوژن در سیتوپلاسم سلول بوده که بر اثر واکنش مثبت به تست پرئودیک اسید شیف به رنگ قرمز در آمده است.



شکل(۲): در این تصویر چند سلول شبه کبدی چند وجهی شده به همراه هسته های درشت در مرکز سلول ها مشخص اند، رنگ قرمز نشان دهنده تأثیر مثبت تست پرئودیک اسید شیف دارد.

بررسی تأثیر عصاره کبدی جنینی بر سلول های بنیادی مزانشیمی بند ناف..... ۱۷



شکل (۳) تصویر یک سلول چند وجهی به همراه هسته مرکزی که در این تصویر می توان رنگ قرمز بر اثر تست پرپودیک اسید شیف را تشخیص داد

بحث

سلول های بنیادی سلول هایی هستند که در حدود ۳۰ سال پیش کشف شدند و باعث پیشرفت عظیمی در حوزه ی 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 سلول های تخصص یافته می باشد (۶). از مهم ترین سلول های بنیادی بالغ جنینی می توان به سلول های بنیادی مزانشیمی اشاره کرد (۳). حضور سلول های بنیادی مزانشیمی در مغز استخوان برای اولین بار توسط یک پاتولوژیست آلمانی موسوم به کوهنایم^۱ در حدود ۱۴۰ سال پیش (۱۸۶۷) کشف شد (۳،۲). متعاقب آن سلول های بنیادی مزانشیمی واقع در مغز استخوان برای اولین بار توسط فردنشتین^۲ و پتراکو^۳ در سال ۱۹۶۶ شناسایی شدند اما شواهد

1 Cohnheim
2 Friedenstein
3 Petrakova

۱۸ فصلنامه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی/سال اول، شماره ۱، بهار ۹۱

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 پرایسزما^۱ و همکاران، اون^۲ و همکاران تا سال ۱۹۸۰ ادامه پیدا کرد (۲،۳).

در سال ۲۰۰۴ لی^۳ و همکاران در تجربیات خود برای اولین بار سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان را در محیط کشت به هپاتوسیت تمایز دادند (۳). در مطالعه دیگری که توسط انگ^۴ 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^۵ 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 *JTS* به هپاتوسیت تمایز دهند. در تحقیق دیگری که در حضور القا گر *HGF* و *FGF-4* 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. (۲،۳)

در سال ۲۰۱۱ مطالعه ای انجام شده که در آن از القای مستقیم سلول های بنیادی به سلول های شبه هپاتوسیت با استفاده از فیبروبلاست های دم موش و با تأثیر فاکتور های القایی *Gata4*، *Hnf1a* و *Foxa3* بررسی کرده اند و نتایج آزمایشات آنان سلول های شبه هپاتوسیتی با مورفولوژی اپیتلیالی معمول سلول کبدی، بیان ژن های کبدی و همچنین برخی از اعمال کبدی (۷). در حال حاضر پژوهش هایی در خصوص جدا سازی، تخلیص و شناسایی نیای سلول های کبدی در حال انجام است، اما مشکلاتی نظیر حفظ بقای این سلول ها در مدت زمان طولانی تر 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

1 Piersma
2 Owen
3 Lee
4 Ong
5 Hong

بررسی تأثیر عصاره کبدی جنینی بر سلول های بنیادی مزانشیمی بند ناف..... ۱۹

کبدی، قادرند به سلول های شبه هپاتوسیتی تبدیل شوند. در گروه های ۱ و ۲ مورد مطالعه در این تحقیق، سلول های 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 سلول های فیبروبلاستی پلیت های کشت اعمال شده بود و این پلیت ها بعد از گذشت بیست روز از زمان تأثیر عصاره ی کبدی، توانایی تکثیر خود 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 اندازه ی نوکلئوپلاسم به هسته آن ها کاهش یافته بود بدین معنی که اندازه ی هسته ی سلول به نسبت اندازه ی 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 نشانه ی 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، در مطالعه حاضر که در غیاب عوامل القایی نظیر (*FGF, OSM, DEX HGF* و...) انجام گردید (۹). با توجه به روشی که در این مطالعه از آن استفاده شد، تمایز سلول های فیبروبلاستی بنیادی بند ناف موش *NMRI* در محدوده ی زمانی ۳۰ روز به سلول های شبه هپاتوسیتی انجام پذیرفت. و در این تحقیق سلول های بنیادی مزانشیمی را با عصاره ی کبدی در رقت های ۵۰λ، ۴۰λ، ۳۰λ و در نهایت ۱۵λ، تیمار کرده و سلول های فیبروبلاستی مزانشیمی در فاز القا قرار گرفتند و سپس در برابر تست پرئودیک اسید شیف از خود واکنش مثبت نشان دادند. تست پرئودیک اسید شیف برای اثبات حضور گلیکوژن به کار برده می شود و سلول های شبه کبدی حاصل شده در این مطالعه نیز به دلیل سنتز گلیکوژن در برخی نواحی سلول در اثر واکنش به تست پرئودیک اسید شیف به رنگ قرمز در آمدند.

نتیجه گیری

در این مطالعه میزان دوز مؤثر عصاره کبدی در القای سلول های بنیادی مزانشیمی مورد

۲۰ فصلنامه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی/سال اول، شماره ۱، بهار ۹۱

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 لاند بوده که در نهایت با گذشت تقریباً ۳۰ روز تعداد سلول ها کم اما سلول های باقی مانده مورفولوژی سلول های کبدی (سلول های چند وجهی، هسته ی درشت و سیتوپلاسم دانه دار) را نشان دادند. با تست ذخیره ی گلیکوژن (تست پرئودیک 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 می توانند سبب القاء تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی بند ناف به سلول های شبه کبدی شوند.

منابع

- ۱-انتشارات خانه زیست شناسی، بهاروند و همکاران ۱۳۸۹، سلول های بنیادی، تمایز به هپاتوسیت و درمان بیماری های کبدی، ۱۳۸۹. - جلد ۳. - ص. ۱۲-۵۴.
- ۲-انتشارات خانه زیست شناسی پور نصر، ب، بهاروند، ح، سلول های بنیادی مزانشیمی انسان: ویژگی های زیست شناختی، کاربرد های درمانی و روش های جدا سازی: ۱۳۸۹. - جلد ۲. - ص. ۲۸-۶۷.
- ۳-انتشارات خانه ی زیست شناسی، باغبان اسلامی، م. سلول های بنیادی مزانشیمی، ۱۳۸۹. - جلد ۲. - ص. ۱۳-۲۴.
- ۴-انتشارات خانه زیست شناسی بهاروند، ح، کاظمی آشتیانی، س، سلول های بنیادی جنینی (مفاهیم و پتانسیل)، ۱۳۸۵، ج ۱، ص ۱۱-۱۷.
- ۵-پژوهشکده رویان، مقاله مروری، بهشاد پور نصر و همکاران، تکوین کبد و تمایز آزمایشگاهی سلول های بنیادی جنینی به سلول های کبدی ۱۳۸۸.

6-Agnieszka Banas (2007) "Stem cell Plasticity :learning from Hepatogenic Differentiation Strategies". Wiley – liss, Inc. 3228-3233

7-Philippe Bourin (2011) "Human Pluripotent stem cells: from biology to cell therapy", World Journal of Stem Cells. 12,24-29

8-Lujun Song, (2010). "Proliferation and differentiation potential of mouse adult hepatic progenitor cells cultured in vitro" , Acta

بررسی تأثیر عصاره کبدی جنینی بر سلول های بنیادی مزانشیمی بند ناف..... ۲۱

Biochin Biophys Sin(ABBS), 234, 122 -123

9-Liang Peng (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

10-Xiaocui, et al., (2007). “The differentiation of Hepatocyte-like cells from monkey Embryonic Stem cells”. Cloning and Stem Cells. 32 , 485-492.