پژوهنده (مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)
سال بیستم، شماره ۱، پی در پی ۱۰۳، صفحات ۱۸ تا ۲۵
فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۴

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۶/۲۰
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۱۲/۱۰

القای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مایع آمنیوتیک به سلول‌های فیبری عدسی چشم

دکتر هما محسنی کوچصفهانی[۱]، دکتر محمد نبیونی[۲]، نسیم اسلامی[۳]، پریسا غیبی[۳]، خدیجه بهره‌بر[۳]*

۱. دانشیار زیست شناسی سلولی تکوینی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
۲. استادیار زیست شناسی سلولی تکوینی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
۳. کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی تکوینی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌هایی تمایز نیافته با قدرت تکثیر بالا هستند که توانایی تمایز به رده‌های مشتق شده از بافت‌های مزانشیمی و غیر مزانشیمی را دارا می‌باشند. هدف از مطالعه‌ی حاضر، جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مایع آمنیوتیک و القای تمایز این سلول‌ها به سمت تشکیل سلول‌های فیبری عدسی است.

مواد و روش‌ها: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، از مایع آمنیوتیک موش‌های ماده باردار، جداسازی و در محیط کشت DMEM به همراه FBS و آنتی‌بیوتیک، کشت داده شد. جهت القای تمایز، سلول‌های پاساژ ۳ در محیط کشت حاوی FBS و آنتی‌بیوتیک و مایع زجاجیه به مدت ۱۴ روز کشت داده شدند. از ارزیابی‌های ایمنوسیتوشیمی و مورفولوژیک، جهت تأیید مزانشیمی بودن سلول‌های جداسازی شده و تمایز سلول‌های تیمار شده، استفاده شد.

یافته‌ها: سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مایع آمنیوتیک، Oct4 را بیان کردند. سلول‌های تیمار شده با مایع زجاجیه، حالت کشیده‌تری نسبت به گروه کنترل پیدا کره و تعداد هستک‌ها در این سلول‌ها، افزایش یافت. آرایش موضعی این سلول‌ها تغییر کرد و به موازات هم قرار گرفتند. بیان کریستالین‌ها به روش ایمنوسیتوشیمی در سلول‌های تیمار شده، مورد تأیید قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مایع آمنیوتیک، توانایی تمایز به سلول‌های فیبری عدسی را دارند. لذا با تمایز کامل می‌توان از این سلول‌ها در درمان بیماری‌های چشمی استفاده کرد.

واژگان کلیدی: مایع آمنیوتیک، سلول‌های فیبری عدسی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:
Mohseni Kouchesfehani H, Nabiuni M, Eslami N, Gheibi P, Bahrebar K. The induction of amniotic fluid mesenchymal stem cells to ocular lens fiber cells. Pejouhandeh 2015;20(1):18-25.

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌های تمایز نیافته با قدرت تکثیر و خودنوزایی بالا هستند که توانایی تمایز به انواعی از سلول‌های بالغ را دارا می‌باشند (۲،۱). این سلول‌ها، منبع مناسبی برای سلول درمانی محسوب می‌شوند (۳). برای این‌که بتوان از این سلول‌ها در درمان بیماری‌های انسانی استفاده کرد، ابتدا باید مطالعات پیش‌کلینیکی روی سایر پستانداران انجام شود. یکی ازشایع‌ترین مدل‌های حیوانی مناسب جهت انجام مطالعات پیش‌کلینیکی، موش می‌باشد. تاکنون منبع اصلی جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، مغز استخوان بوده است، اما جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان، به علت رشد و تکثیر سلول‌های غیرمزانشیمی در طول جداسازی و پاساژ این سلول‌ها مشکلاتی را ایجاد می‌کند (۷-۴). به همین علت، دانشمندان روی جداسازی سلول‌های مزانشیمی از منابع دیگر، متمرکز شده‌اند.

مایع آمنیوتیک، یکی از منابعی است که می‌تواند برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مورد استفاده قرار گیرد. مایع آمنیوتیک، لایه‌ی محافظتی احاطه کننده جنین در حال تکوین است که حفاظت مکانیکی و مواد غذایی لازم جهت رشد جنین را فراهم آورده و محتوی سلول‌های مشتق از

*نویسنده مسؤول مکاتبات: نسیم اسلامی؛ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه خوارزمی، خیابان مفتح جنوبی، تهران، ایران؛ صندوق پستی: ۱۵۷۱۹-۱۴۹۱۱؛ تلفن: ۰۹۱۸۳۷۶۷۴۹۲؛ نمابر: ۸۸۸۴۸۹۴۰ (۰۲۱)؛ پست الکترونیک: Nasim_eslami1@yahoo.com

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2025-12-15]

بافت‌های جنینی و خارج جنینی است (۹،۸). از این مایع برای تشخیص ناهنجاری‌های جنینی قبل از تولد استفاده می‌شود. مایع آمنیوتیک سرشار از سلول‌های بنیادی مزانشیمی است که دارای پتانسیل تکثیری بالایی بوده، فاکتور OCT4 را بیان می‌کنند و می‌توانند به انواع سلول‌های هر سه لایه‌ی زاینده مانند سلول‌های چربی، میوژنیک، استخوانی، اندوتلیالی، عصبی و کبدی، تمایز یابند (۱۲-۱۰). اولین شواهد مبنی بر وجود جمعیتی ویژه از سلول‌ها در مایع آمنیوتیک، توسط دو گروه تحقیقاتی در سال ۲۰۰۲ و ۲۰۰۳ به‌دست آمد (۱۵-۱۳). این سلول‌ها، mRNA OCT4 را بیان کردند (۱۴)، برای مارکرهای مزانشیمی مانند D90، CD105، CD73، CD166 مثبت و برای مارکرهای خون‌ساز مانند CD45، CD34 و CD14، منفی بودند (۱۵). مطالعات دیگری که در سال‌های ۲۰۰۴ (۱۶) و ۲۰۰۷ (۱۰) توسط محققین دیگر انجام گرفت، یافته‌های قبلی تأیید و نشان داده شد که سلول‌های بنیادی مایع آمنیوتیک، تومورزنیک نبوده و توانایی دو برابر شدن تا بیش از ۲۵۰ بار را با حفظ کاریوتیپ نرمال، دارا هستند (۱۰). این سلول‌ها در محیط کشت قدرت گسترش زیادی دارند (۱۲). بر اساس همین ویژگی‌های سلول‌های بنیادی مایع آمنیوتیک و روش آسان به دست آوردن آنها در مقایسه با سایر منابع سلول‌های بنیادی، این سلول‌ها را کاندید مناسبی جهت استفاده در درمان بیماری‌ها کرده است.

آب مروارید (cataract) یکی از بیماری‌های شایع چشمی است که به علت کدر شدن عدسی چشم اتفاق می‌افتد (۱۷). به نظر می‌رسد استفاده از سلول‌های بنیادی برای جایگزینی سلول‌های عدسی، راهکار مناسبی باشد. عدسی چشم، از دو جمعیت سلولی تشکیل شده است. یک لایه از سلول‌های مکعبی اپیتلیالی که بخش قدامی را می‌پوشاند و سلول‌های فیبری کشیده انتهایی تمایز یافته که بخش عمده‌ی بافت را شامل می‌شوند. سلول‌های اپیتلیالی تکثیر می‌یابند و تحت القای فاکتورهای خارج از لنز، به سلول‌های فیبری تمایز می‌یابند (۱۸). از عوامل القایی مؤثر بر تمایز سلول‌های فیبری عدسی چشم، مایع زجاجیه است. در نیمه‌ی خلفی، عدسی چشم با مایع زجاجیه در تماس است. این مایع، نقش القایی بر تمایز سلول‌های نیمه‌ی خلفی حباب عدسی را داشته و باعث ایجاد قطبیت عدسی چشم می‌شود. مهمترین فاکتور موجود در مایع زجاجیه، فاکتور رشد فیبروبلاستی (Fibroblast Growth Factor- FGF) به‌ویژه FGF1 و FGF2 است که موجب القای بیان ژن‌های کریستالین، طویل شدن و تخصص‌یابی ساختاری در سلول‌های فیبری عدسی می‌گردند (۱۹). کریستالین‌ها، پروتئین‌های عمده‌ی عدسی بوده و نقش مهمی در شفافیت و خاصیت انکساری عدسی برعهده دارند. کریستالین‌ها به ۳ گروه عمده شامل α، β و γ تقسیم می‌شوند. βکریستالین‌ها، فراوان‌ترین نوع کریستالین‌ها در سلول‌های فیبری عدسی هستند. αکریستالین‌ها وزن مولکولی بالاتری دارند. γکریستالین‌ها، کوچکترین هستند و نسبت به سایر کریستالین‌ها، غلظت کمتری دارند (۲۰). در سلول‌های فیبری عدسی، ابتدا αکریستالین بیان می‌شوند که دو نوع هستند: αA و αB کریستالین که هر دو، متعلق به خانواده‌ی پروتئین‌های شوک حرارتی می‌باشند. αB کریستالین در موش در روز E9.5 در مرحله‌ی پلاک عدسی بیان می‌شود. αAکریستالین نیز در روز E10-E10.5 جنینی در مرحله‌ی جام عدسی قابل تشخیص است (۲۱).

در مطالعه‌ی حاضر، سلول‌های بنیادی مایع آمنیوتیک، پس از جداسازی، تحت القای مایع زجاجیه قرار داده شده و روند تشکیل سلول‌های فیبری عدسی، تحت القای فاکتورهای موجود در مایع زجاجیه، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه‌ی تجربی، موش‌های NMRI از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات دانشگاه خوارزمی تهیه شدند. موش‌های نر و ماده‌ی ۶ تا ۸ هفته‌ای کنار هم قرار داده شدند و روز بعد، موش‌های ماده جهت مشاهده‌ی واژینال پلاک، مورد بررسی قرار گرفتند. موش‌های ماده‌ای که واژینال پلاک در آنها مشاهده شد، جدا و در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و رطوبت ۴۰ تا ۴۵ درصد، نگهداری شدند. در هفته‌ی دوم بارداری، ۱۰ عدد موش ماده‌ی باردار به روش در رفتگی گردنی کشته و پس از خارج کردن جنین‌های آنها، در ظرف حاوی HBSS قرار داده شدند. مایع آمنیوتیک احاطه‌کننده‌ی جنین‌ها به کمک پیپت پاستور، کشیده شد. کلیه‌ی این مراحل در محیط استریل انجام شد. این مایع به همراه ۵ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium) شرکت Gibco (USA)، ۲۰٪ FBS (Sigma, USA) و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین (Sigma, USA) به نسبت ۱ به ۱۰۰ در فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مکعب در شرایط عادی کشت سلولی در داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد و فشار CO_2 ۵٪، کشت داده شد. اولین تعویض محیط در روز دوم و پس از آن تعویض محیط، هر سه روز یک‌بار انجام می‌شد. در

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2025-12-15]

مرحله‌ی اول، برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، از خاصیت چسبندگی این سلول‌ها به کف فلاسک استفاده شد.

پس از آن‌که تراکم سلول‌ها افزایش یافت، سلول‌ها پاساژ داده شدند. بدین ترتیب که با تریپسین-EDTA جدا شده و به ۲ عدد فلاسک ۲۵ cm^2 انتقال یافتند. سلول‌های پاساژ اول، جهت ارزیابی بیان فاکتور OCT4، به عنوان مارکر سلول‌های بنیادی پرتوان، به روش ایمنوسیتوشیمی مورد مطالعه قرار گرفتند. پس از اینکه سلول‌ها ۷۰ تا ۸۰ درصد کف فلاسک را پر کردند، به‌وسیله‌ی تریپسین ۰/۰۵٪ پاساژ داده شدند. برای پاساژ دادن سلول‌ها، ابتدا محیط کشت خارج گردید و سلول‌ها دو بار با PBS شستشو داده شدند. سپس مقدار ۵۰۰ میکرولیتر تریپسین-EDTA به فلاسک اضافه شد و فلاسک به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور قرار گرفت. پس از ۱۰ دقیقه، فلاسک از انکوباتور خارج و مشاهده گردید که سلول‌ها کنده و شناور شدند. جهت خنثی کردن تریپسین، به فلاسک، محیط کشت اضافه و محتوی فلاسک بین دو فلاسک جدید تقسیم شد. برای کاهش استرس وارد آمده به سلول‌ها، سانتریفوژ انجام نشد.

ده عدد چشم گاو از کشتارگاه تهیه و داخل PBS محتوی آنتی‌بیوتیک به همراه یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. مایع زجاجیه به کمک سرنگ ۱۶ guage استریل، کشیده و هموژنیزه شد. مایع زجاجیه به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس، مایع رویی فیلتر شد. مایع فیلتر شده، الیکوت شد و در فریزر ۴۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از پاساژ ۳، سلول‌ها تریپسینه شده و با تراکم $۲×۱۰^۴$ سلول در ۵ خانه از یک ظرف ۲۴ خانه‌ای، کشت داده شدند. پس از آن‌که این سلول‌ها به کف ظرف چسبیدند، سلول‌های گروه تجربی، تحت تیمار با درصدهای ۲۰، ۳۰ و ۴۰ زجاجیه به همراه محیط کشت DMEM، FBS ۱۵٪ و آنتی‌بیوتیک قرار گرفتند. دو خانه به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. محیط گروه کنترل شامل محیط کشت DMEM، FBS ۱۵٪ و آنتی‌بیوتیک بود. این خانه‌ها به مدت ۱۴ روز تحت تیمار قرار گرفتند. تعویض محیط، هر سه روز یک‌بار انجام شد.

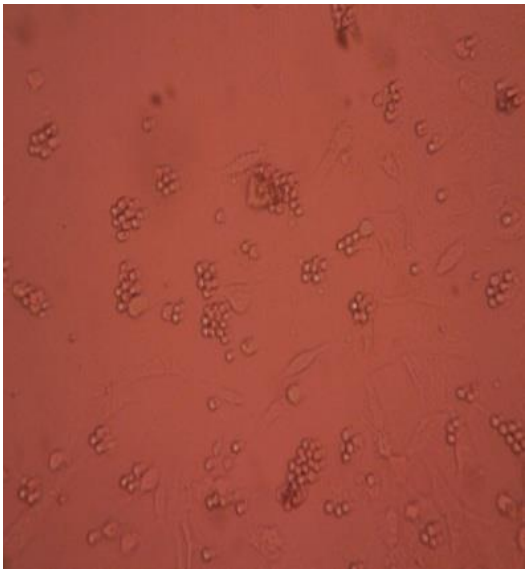
۱۴ روز پس از شروع تیمار، این سلول‌ها جهت بررسی بیان پروتئین کریستالین به روش ایمنوسیتوشیمی مورد مطالعه قرار گرفتند. برای تعیین هویت سلول‌های بنیادی و سلول‌های تمایز یافته، از روش ایمنوسیتوشیمی استفاده شد. برای این منظور و به جهت بررسی بنیادی بودن سلول‌ها، از سلول‌های پاساژ اول استفاده شد و با بهره‌گیری از آنتی‌بادی اولیه Anti-Oct4 (ab18976,Abcam)، کار ارزیابی انجام گرفت. بررسی تمایز سلول‌ها درسلول‌های تحت تیمار پس از ۱۴ روز، با آنتی‌بادی اولیه Anti-αA,αB Crystallin (ab28163,Abcam) انجام شد.

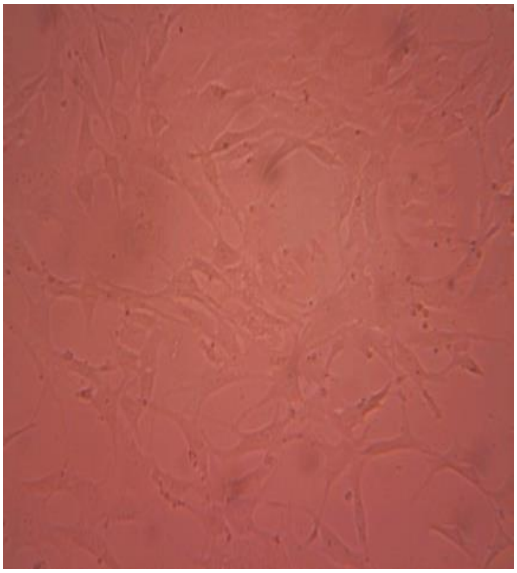
مراحل انجام پروسه ایمنوسیتوشیمی به شرح زیر بود: سلول‌های پاساژ اول در ظروف کشت ۴ خانه‌ای ریخته شدند. پس از آن‌که سلول‌ها به کف ظرف چسبیدند، محیط کشت سلول‌ها خارج گردید و با استفاده از PBS شستشو داده شدند. سپس به سلول‌های پاساژ اول، سلول‌های گروه تجربی و گروه کنترل و بافر فیکس کننده (پارافرمالدهید سرد ۴٪) اضافه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و سپس ۵ دقیقه در دمای اتاق، قرار داده شدند. پس از آن، سلول‌ها ۲ بار با PBS شسته شده و ۴٪ تریتون X۱۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه به آنها اضافه گردید. سلول‌ها با PBS شسته شده و ۵٪ Goat Serum به آنها اضافه گردید. پس از ۴۵ دقیقه، Goat Serum خارج شد و به سلول‌های پاساژ اول، آنتی‌بادی اولیه‌ی Anti-Oct4 رقیق شده در BSA/PBS ۰/۲٪ و به سلول‌های گروه تجربی و گروه کنترل، آنتی بادی اولیه Anti-αA,αB Crystallin به صورت overnight اضافه شد. سلول‌ها با PBS/Tween ۰/۱٪ شسته شده و PBS/BSA ۱٪ به سلول‌ها اضافه گردید. ۳۰ دقیقه بعد، PBS/BSA خارج و آنتی‌بادی ثانویه Anti-Rabit IgG (AF8035, Razi) کانژوگه به FITC رقیق شده در BSA/PBS ۰/۲٪ در تاریکی اضافه شد. از این مرحله به بعد، کلیه مراحل در تاریکی انجام شد. پس از ۳۰ دقیقه، سلول‌ها با PBS/Tween ۰/۱٪ شسته شدند. سپس، PBS به سلول‌ها اضافه گردید و بیان Oct4 و αکریستالین در سلول‌های مزانشیمی مایع آمنیوتیک و سلول‌های تمایز یافته، با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

در روز اول کشت، مایع آمنیوتیک کشت داده شده شامل جمعیت هتروژنی از سلول‌ها بود. در روز دوم، محیط کشت شامل جمعیتی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی چسبیده به کف ظرف با مورفولوژی فیبروبلاستی به همراه گروهی از سلول‌های غیر مزانشیمی شناور بودند (شکل ۱-A). سلول‌های بنیادی مزانشیمی چسبیده به کف ظرف به سرعت تکثیر شدند و ظرف یک هفته به صورت یک تک لایه، کف ظرف را پر کردند (شکل ۱-B).

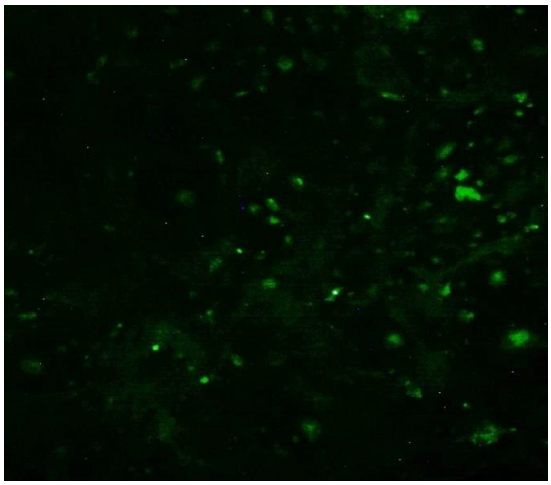
[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2025-12-15]





شکل ۱. A) جمعیت هتروژن سلول‌های کشت داده شده مایع آمنیوتیک در روز دوم. B) سلول‌های کشت داده شده مایع آمنیوتیک در روز هفتم. سلول‌های بنیادی مزانشیمی با موروفولوژی فیبروبلاست مانند، قابل تشخیص هستند.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مایع آمنیوتیک، پس از پاساژ اول، فاکتور Oct4 را کـه مـارکر سـلول‌هـای بنیـادی پرتوان است، بیان کردند (شکل ۲).



شکل ۲. رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مایع آمنیوتیک با آنتی Oct4 پس از پاساژ اول.

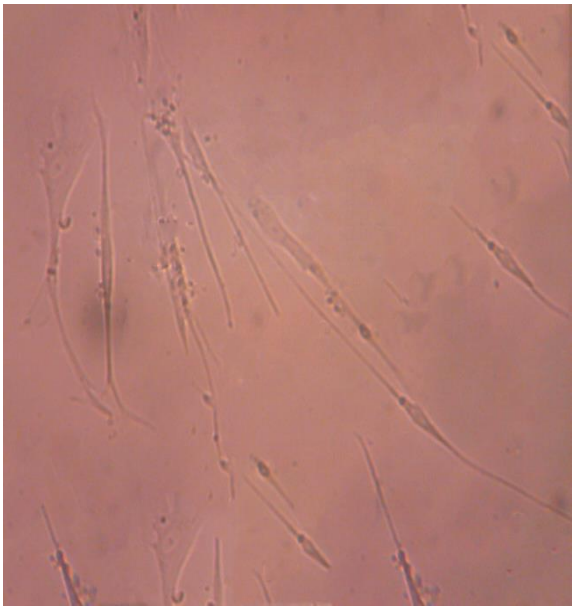
سلول‌های گروه تجربی که در مجاورت ۲۰ و ۳۰ درصـد مـایع زجاجیه قرار گرفته بودند، تفاوت قابل ملاحظه‌ای با سلول‌های گروه کنترل نداشته و هماننـد آنهـا مورفولـوژی فیبروبلاسـتی داشتند. سلول‌های تیمـار شـده بـا ۴۰ درصـد مـایع زجاجیـه (شکل ۳-A) نسبت به سلول‌های گـروه کنتـرل (شـکل ۳-B) کشیده‌تر بوده و هسته‌ی آنها حاوی تعداد هستک‌های بیشتری بود. همچنین، آرایش موضعی این سلول‌ها تغییـر کـرد و ایـن سـلول‌هـا بـه مـوازات هـم قـرار گرفتنـد. نتـایج بررسـی‌هـای ایمنوسیتوشیمی که روی سلول‌های گروه کنترل و سلول‌هـای تیمار شده با درصدهای متفاوت زجاجیه انجـام گرفـت، نشـان داد که α کریستالین‌ها در سلول‌های تیمار شده بـا ۴۰ درصـد مایع زجاجیه، بیان شدند (شکل ۴).

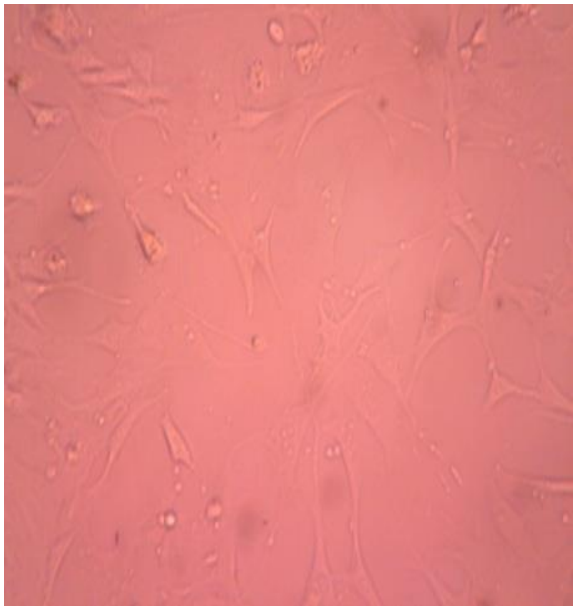
بحث

سلول‌های بنیادی مزانشیمی به علت ویژگی‌های خاص خـود مانند قدرت تکثیر و تمایز بالا و امکان جداسازی از بافـت‌هـای مختلف، از جایگاه خاصی برخوردارند. یکـی از منـابعی کـه در سال‌های اخیر توجه دانشمندان را به خود جلـب کـرده، مـایع آمنیوتیک است. به دست آوردن سلول‌های بنیادی مزانشـیمی از این مایع، برخلاف سایر منابع مانند مغـز اسـتخوان، آسـانتر است. همچنین، در مطالعاتی که در سال‌هـای ۲۰۰۷ و ۲۰۰۸ انجـام شـد مشـخص گردیـد کـه سـلول‌هـای بنیـادی مـایع آمنیوتیک در مقایسه بـا سـلول‌هـای بنیـادی مغـز اسـتخوان، قـدرت تکثیـر و خودنـوزایی بـالاتری دارنـد (۲۲،۱۲). ایـن ویژگی‌های مایع آمنیوتیـک، ایـن مـایع را بـه عنـوان منبعـی بی‌بدیل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی معرفی می‌کند.

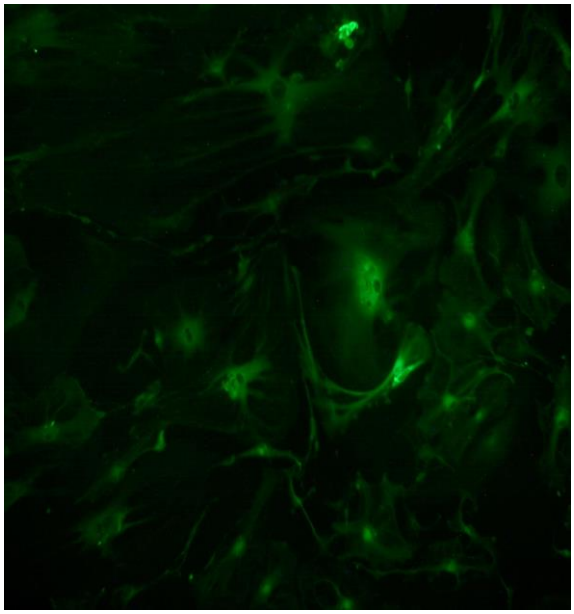
مطالعات مورفولوژیک نشان دادنـد کـه سـلول‌هـای بنیـادی مزانشـیمی جداشـده از مـایع آمنیوتیـک موشـی، شـکل فیبروبلاستی دارند. این یافته، در تأیید تحقیقـات انجـام شـده طـی سـال‌هـای ۲۰۰۷ تـا ۲۰۰۹ روی سـلول‌هـای بنیـادی مزانشـیمی مـایع آمنیوتیـک انسـانی و موشـی بـوده و تشـابه ساختاری سلول‌های بنیادی مایع آمنیوتیک انسانی و موشی را

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2025-12-15]





شکل ۳. A) سلول‌های گروه تجربی که به مدت ۱۴ روز در معرض محیط القا با ۴۰٪ مایع زجاجیه قرار داشتند. سلول‌ها کشیده‌تر شده و آرایش موازی پیدا کرده‌اند. B) سلول‌های گروه کنترل منفی که به مدت ۱۴ روز در محیط فاقد القا قرار داشتند.



شکل ۴. بیان کریستالین‌ها در سلول‌های گروه تجربی تیمار شده با ۴۰ درصد مایع زجاجیه پس از ۱۴ روز با رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی نشان داده شده است.

به اثبات رسانید (۲۲، ۲۶-۱۰). این سلول‌ها همانند سلول‌های بنیادی مغز استخوان به کف ظرف پلاستیکی چسبیدند و مارکرهای مشابهی را بیان کردند. چسبیدن به کف ظروف پلاستیکی، یکی از علایم مزانشیمی بودن سلول‌هاست. در راستای مطالعات قبلی در این تحقیق نیز مشاهده گردید که سلول‌های جدا شده از مایع آمنیوتیک پس از ۲۴ ساعت، با مورفولوژی فیبروبلاستی به کف ظرف چسبیدند.

در سال ۲۰۰۷، Decoppi و همکارانش اظهار داشتند که سلول‌های بنیادی مایع آمنیوتیک، فنوتیپ هر دو نوع سلول‌های بنیادی بالغ و جنینی را بیان می‌کنند (۱۰). در سال ۲۰۰۹، Liu و همکارانش سلول‌های بنیادی مزانشیمی مایع آمنیوتیک را در مرحله‌ای حد واسط بین سلول‌های بنیادی بالغ و جنینی، در نظر گرفتند. Prusa و همکارانش در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که سلول‌های بنیادی مایع آمنیوتیک انسانی، Oct4 را بیان می‌کنند (۲۵،۱۴). در این مطالعه، بررسی‌های ایمنوسیتوشیمی، بیان Oct4 را در سلول‌های بنیادی مایع آمنیوتیک موشی، مشابه آنچه که در سلول‌های بنیادی مایع آمنیوتیک انسانی بیان می‌شود، تأیید کرد. این یافته، نشان‌دهنده‌ی توان بالای این سلول‌ها در حفظ خودبازسازی و امکان تمایز آنها به انواعی از سلول‌های تمایز یافته بافت‌های مختلف است. تأیید بیان Oct4 به عنوان مارکر سلول‌های بنیادی پرتوان جنین در این مطالعه و توجه به این موضوع که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مایع آمنیوتیک از یک بافت بالغ جدا شده‌اند، همسو با یافته‌های مطالعات قبلی بوده و نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مایع آمنیوتیک حد واسط سلول‌های بنیادی بالغ و جنینی هستند.

در مطالعه‌ای که توسط Blakely و همکارانش (۲۰۰۰) روی رشد و تمایز سلول‌های اپیتلیومی عدسی انسانی صورت

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2025-12-15]

گرفت، مشاهده شد که این سلول‌ها پس از جدا شدن و کشت در محیط دارای FGF-2 به مدت ۱۵ روز، مورفولوژی آنها تغییر یافته و اجسام لنتوئیدی (مجموعه دسته‌های چند سلولی گرد و دارای خاصیت انکساری بسیار زیاد) را تشکیل دادند (۲۷). در یک مطالعه دیگر، Ooto و همکارانش (۲۰۰۳) توانستند سلول‌های بنیادی جنینی یک گونه میمون را تحت القای Stromal cell-derived inducing activity (SDIA) و FGF-2، به ساختارهای لنتوئیدی تمایز دهند (۲۸). به این ترتیب مشخص شد که یکی از عوامل القای تمایز، FGF می‌باشد. مایع زجاجیه به جهت دارا بودن فاکتورهای رشد مناسب به ویژه FGF1 و FGF2، محیطی مناسب جهت القای تمایز به سمت تشکیل سلول‌های فیبری عدسی محسوب می‌شود. در سال ۲۰۰۷، Oconnor و همکارانش با تکیه بر این ویژگی، مایع زجاجیه‌ی دو بافت اپیتلیومی از ۲ عدسی مجزا را روی هم در محیط کشت مخلوط با زجاجیه‌ی گاوی کشت داده و نشان دادند که در این شرایط سلول‌ها پس از ۳۰ روز کشت ، شکل کروی پیدا کرده، شفاف شده و قادر به متمرکز کردن نور شده‌اند (۲۹). در مطالعه‌ای دیگر که در سال ۲۰۱۰ توسط ملکی و همکارانش انجام شد، سلول‌های بنیادی بند ناف، تحت القای زجاجیه، به سلول‌های فیبری عدسی چشم تمایز پیدا کردند (۳۰). در تحقیق حاضر، سلول‌های بنیادی مایع آمنیوتیک که شبه فیبروبلاستی و دارای زواید متعدد و به اطراف کشیده بودند، تحت تأثیر القا کننده‌ی اختصاصی سلول‌های فیبری عدسی (مایع زجاجیه) قرار گرفتند. سلول‌های تیمار شده با ۴۰ درصد مایع زجاجیه، به طور موضعی کشیده‌تر شده و به موازات هم آرایش یافتندکه این مسیر مطابق با مسیر تمایزی در سلول‌های فیبری چشم است. به این ترتیب، نتایج این مطالعه در راستای تحقیقات قبلی پیش رفته است. کشیدگی و آرایش موازی سلول‌های تحت القای مایع زجاجیه نشان می‌دهد که این سلول‌ها در ابتدای مسیر تمایزی خود، شروع به ساخت و ترشح ماتریکس خارج سلولی در اطراف خود کرده‌اند که عامل آرایش خاص آنها بوده است. همچنین، افزایش تعداد هستک‌ها در سلول‌های تحت القا، دلیلی بر افزایش فعالیت پروتئین‌سازی است که می‌تواند هم به پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی و هم به پروتئین‌های سیتوپلاسمی مربوط باشد. پس از بررسی میزان تمایز در سلول‌های تحت تیمار با درصدهای مختلف مایع زجاجیه، غلظت ۴۰٪ به عنوان بهترین دوز تمایزی در نظر گرفته شد. جهت تعیین تمایز، از ارزیابی مورفولوژیکی و بیان پروتئین کریستالین که مارکر تمایزی سلول‌های فیبری عدسی است استفاده شد. آلفا کریستالین‌ها که متعلق به خانواده‌ی پروتئین‌های شوک حرارتی هستند، تحت شرایط استرس، در سایر سلول‌ها به میزان بالایی بیان می‌شوند. در این مطالعه، سلول‌های گروه کنترل و سلول‌های گروه تجربی، در شرایط یکسانی کشت داده شدند. بیان آلفا-کریستالین‌ها در سلول‌های گروه تجربی و عدم بیان آنها در سلول‌های گروه کنترل نشان می‌دهد که بیان آلفا-کریستالین‌ها در این سلول‌ها، فقط به علت سیگنال‌های القایی ناشی از حضور مایع زجاجیه بوده است. با بررسی بیان پروتئین‌های کریستالین در روز چهاردهم پس از تیمار و مقایسه‌ی گروه‌های تجربی در دوزهای مختلف مایع زجاجیه، مشخص شد که سلول‌های القا شده توسط دوز ۴۰٪ مایع زجاجیه، پروتئین‌های کریستالین را بیان کردند که با مشاهدات حاصل از تغییرات مورفولوژیک در این دوز، کاملاً مطابقت دارد. با استناد به مطالعات انجام شده در گذشته و شرایطی که بر کشت‌های سلولی گروه تجربی اعمال شد، این سلول‌ها در شرایط بدون استرس رشد داده شدند و مسیر تمایزی سلول‌های فیبری عدسی چشم را شروع کردند. بیان کریستالین‌ها در این سلول‌ها نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مایع آمنیوتیک موش، با موفقیت تا مرحله‌ی تمایزی مشابه با سلول‌های جام عدسی، پیش رفته‌اند. در این مرحله هنوز هسته و اندامک‌ها حضور داشته و سلول‌ها شفاف نشده‌اند.

نتیجه‌گیری

در مقایسه با مطالعات قبلی که دوز ۲۵٪ مایع زجاجیه به عنوان دوز تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف معرفی شده است (۳۰) و با استناد به نتایج تحقیق حاضر، می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌های بنیادی مزانشیمی با منشأهای مختلف، پاسخ‌های متفاوتی به دوزهای مختلف دارند که در مطالعه‌ی حاضر بهترین دوز تمایزی، دوز ۴۰٪ مایع زجاجیه جهت القای تمایز سلول‌های بنیادی مایع آمنیوتیک به سمت تشکیل سلول‌های شبه فیبر عدسی چشم بود.

REFERENCES

1. Majumdar MK, Thiede MA, Mosa JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. J Cell Physiol 1998;176: 57-66.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2025-12-15]

2. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, *et al*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 248: 143-7.

3. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation and application in cell therapy. Mol Med 2004; 8: 301-36.

4. Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. J Cell Biochem 1999; 72: 570-85.

5. Meirelles LS, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. Br J Haematol 2003; 123: 702-11.

6. Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. Blood 2004; 103: 1662-8.

7. Eslaminejad MB, Nikmahzar A, Taghiyar L, Nadri S, Massumi M. Murine mesenchymal stem cells isolated by low density primary culture system. Dev Growth Differ 2006; 48: 361-70.

8. Gosden CM. Amniotic fluid cell types and culture. Br Med Bull 1983; 39: 348-54.

9. Fauza D. Amniotic fluid and placental stem cells. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2004; 18(6): 877-91.

10. De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, *et al*. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. Nat Biotechnol 2007; 25: 100-6.

11. You Q, Cai L, Zheng J, Tong X, Zhang D, Zhang Y. Isolation of human mesenchymal stem cells from third-trimester amniotic fluid. Int J Gynaecol Obstet 2008; 103: 149-52.

12. Zheng YB, Gao ZL, Xie C, Zhu HP, Peng L, Chen JH, *et al*. Characterization and hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human amniotic fluid and human bone marrow: a comparative study. Cell Biol Int 2008; 32: 1439-48.

13. Prusa AR, Hengstschlager M. Amniotic fluid cells and human stem cell research: a new connection. Med Sci Monit 2002; 8: 253-7.

14. Prusa AR, Marton E, Rosner M, Bernaschek G, Hengstschlager M. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? Hum Reprod 2003; 18: 1489-93.

15. In't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FH, Willemze R, *et al*. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. Blood. 2003; 102(4): 1548-9.

16. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. Hum Reprod 2004; 19: 1450-6.

17. Rai DV, Koli KS. Effects of cataract formation on electrical properties of goat eye lens. Pol J Med Phy Eng 2006; 12(1): 1-12.

18. Coulombre JL, Coulombre AJ. Lens development: fiber elongation and lens orientation. Science 1963; 142: 1489-90.

19. Lovicu FJ, Mcavoy JW. Growth factor regulation of lens development. Dev Biol 2005; 280: 1-14.

20. Bloemendal H, De Jong W, Jaenicke R, Lubsen NH, Slingsby C, Tardieu A. Aging and vision: structure, stability and function of lens crystallins. Prog Biophys Mol Biol 2004; 86: 407-85.

21. Robinson ML, Overbeek PA. Differential expression of alpha A- and alpha B-crystallin during murine ocular development. Invest Ophthalmol Vis Sci 1996; 11: 2276-84.

22. Nadri S, Soleimani M. Comparative analysis of mesenchymal stromal cells from murine bone marrow and amniotic fluid. Cytotherapy 2007; 8: 729-37.

23. Kim J, Lee Y, Kim H, Hwang KJ, Kwon HC, Kim SK, *et al*. Human amniotic fluid-derived stem cells have of characteristics multipotent stem cells. Cell Prolif 2007; 40: 75-90

24. Steigman SA, Armant M, Bayer-Zwirello L, Kao GS, Silberstein L, Ritz J, *et al*. Preclinical regulatory validation of a 3-stage amniotic mesenshymal stem cell manufacturing protocol. J Pediatr Surg 2008; 43: 1164-9.

25. Liu ZS, Xu YF, Feng SW, Li Y, Yao XL, Lu XL, *et al*. Baculovirus-transduced mouse amniotic fluid-derived stem cells maintain differentiation potential. Ann Hematol2009; 88(6): 565-72.

26. Gucciardo L, Lories R, Ochesnbein-Kolble N, Done E, Zwijsen A, Deprest J. Fetal mesenchymal stem cells: isolation, properties and potential use in perinatology and regenerative medicine. Int J Obstet Gynaecol 2008; 10: 166-72.

27. 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.

28. Ooto S, Haruta M, Honda Y, Kawasaki H, Sasai Y, Takahashi M. Introduction of the differentiation of lentoids from primate embryonic stem cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 2003; 44: 2689-93.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2025-12-15]

29. Oconnor MD, McAvoy JW. In vitro generation of function lens-like structures with relevance to age-related nuclear cataract. Invest Ophthalmol Vis Sci 2007; 48: 1245-52.

30. Maleki M, Parivar K, Nabiyouni M, Yaghmaei P, Naji M. Induction of alpha-crystallins expression in umbilical cord mesenchymal stem cells. Iran J Ophthalmol 2010; 2:67-71.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2025-12-15]