

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 زیست‌شناسی سلولی تکوینی جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۲. استادیار زیست‌شناسی سلولی تکوینی جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۳. کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی تکوینی جانوری، گروه زیست‌شناسی، 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, Nabiyuni 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 (۲۰۱). 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 از شایع‌ترین 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 (۴-۷). 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 احاطه‌کننده جنین در حال تکوین است که حفاظت مکانیکی و مواد غذایی لازم جهت رشد جنین را فراهم آورده و محتوی سلول‌های مشتق از

*نویسنده مسؤوّل مکاتبات: نسیم اسلامی؛ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه خوارزمی، خیابان مفتوح جنوبی، تهران، ایران؛ صندوق پستی: ۱۴۹۱۱-۱۵۷۱۹؛ تلفن: ۰۹۱۸۳۷۶۷۴۹۲؛ نامبر: ۸۸۸۴۸۹۴۰ (۰۲۱)؛ پست الکترونیک: Nasim_eslami1@yahoo.com

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. β کریستالین‌ها، فراوان‌ترین نوع کریستالین‌ها در سلول‌های فیبری عدسی هستند. α کریستالین‌ها وزن مولکولی بالاتری دارند. γ کریستالین‌ها، کوچکترین هستند و نسبت به سایر کریستالین‌ها، غلظت کمتری دارند (۲۰). در سلول‌های فیبری عدسی، ابتدا α کریستالین 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. αA کریستالین نیز در روز E10-E10.5 جنینی در مرحله‌ی جام عدسی قابل تشخیص است (۲۱).

در مطالعه‌ی حاضر، سلول‌های بنیادی مایع آمینوتیک، 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 آمینوتیک 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)، FBS ۲۰٪ (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

بافت‌های جنینی و خارج جنینی است (۹،۸). از این مایع برای تشخیص ناهنجاری‌های جنینی قبل از تولد استفاده می‌شود. مایع آمینوتیک 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، میوزنیک، استخوانی، اندوتلیالی، عصبی و کبدی، تمایز یابند (۱۲-۱۰). اولین شواهد مبنی بر وجود جمعیتی ویژه از سلول‌ها در مایع آمینوتیک، توسط دو گروه تحقیقاتی در سال ۲۰۰۲ و ۲۰۰۳ به‌دست آمد (۱۳-۱۵). این سلول‌ها، OCT4 mRNA را بیان کردند (۱۴)، برای مارکرهای مزانشیمی مانند CD105، D90، 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 آمینوتیک، توموروزنیک نبوده و توانایی دو برابر شدن تا بیش از ۲۵۰ بار را با حفظ کاربوتیپ نرمال، دارا هستند (۱۰). این سلول‌ها در محیط کشت قدرت گسترش زیادی دارند (۱۲). بر اساس همین ویژگی‌های سلول‌های بنیادی مایع آمینوتیک 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

مرحله‌ی اول، برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، از خاصیت چسبندگی این سلول‌ها به کف فلاسک استفاده شد. پس از آن که تراکم سلول‌ها افزایش یافت، سلول‌ها پاساژ داده شدند. بدین ترتیب که با تریپسین-EDTA جدا شده و به ۲ عدد فلاسک 25 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.

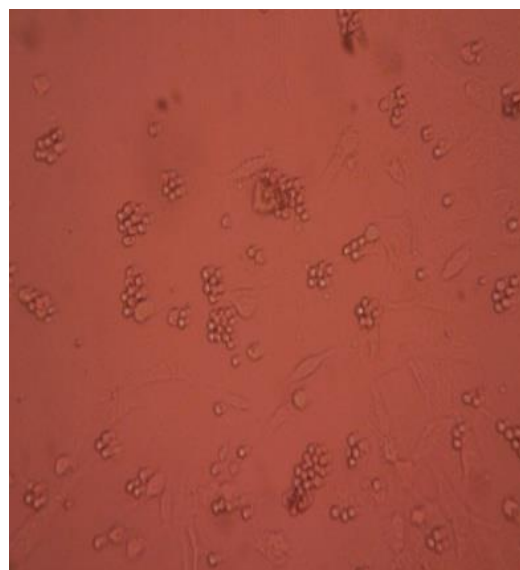
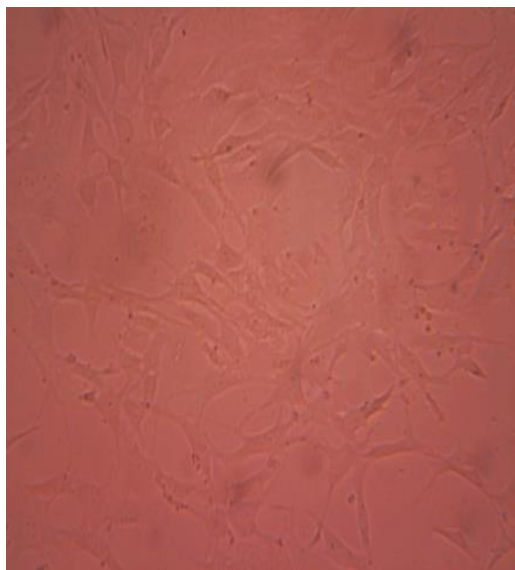
مرحله‌ی دوم، انجام پروسه ایمنوسیتوشیمی به شرح زیر بود: سلول‌های پاساژ اول در ظروف کشت ۴ خانه‌ای ریخته شدند. پس از آن که سلول‌ها به کف ظرف چسبیدند، محیط کشت سلول‌ها خارج گردید و با استفاده از PBS شستشو داده شدند. سپس به سلول‌های پاساژ اول، سلول‌های گروه تجربی و گروه کنترل و بافر فیکس کننده (پارافمالدهید 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 X100 به مدت ۱۰ دقیقه به آنها اضافه گردید. سلول‌ها با PBS شسته شده و Goat Serum ۵٪ 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، آنتی‌بادی اولیه Anti- $\alpha A, \alpha B$ 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-Rabbit IgG (AF8035, Razi) کانژوگه به FITC رقیق شده در PBS/BSA 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 α کریستالین در سلول‌های مزانشیمی مایع آمیوتیک و سلول‌های تمایز یافته، با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

در روز اول کشت، مایع آمیوتیک 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 فیروبلستی به همراه گروهی از سلول‌های غیر مزانشیمی شناور بودند (شکل ۱-۱A). 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 ۱-۱B).

ده عدد چشم‌گاو از کشتارگاه تهیه و داخل PBS محتوی آنتی‌بیوتیک به همراه یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. مایع زجاجیه به کمک سرنگ ۱۶ gauge 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 2×10^4 سلول در ۵ خانه از یک ظرف ۲۴ خانه‌ای، کشت داده شدند. پس از آن که 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



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 مورفولوژی فیبروبلاست مانند، قابل تشخیص هستند.

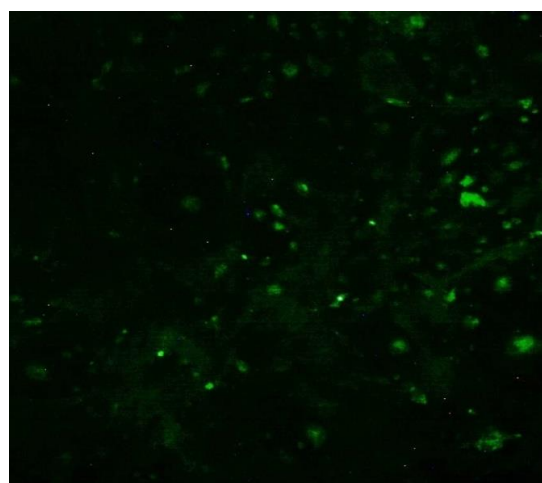
ایمنوسیتوشیمی که روی سلول‌های گروه کنترل و سلول‌های تیمار شده با درصد‌های متفاوت زجاجیه انجام گرفت، نشان داد که α کریستالین‌ها در سلول‌های تیمار شده با ۴۰ درصد مایع زجاجیه، بیان شدند (شکل ۴).

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

بحث

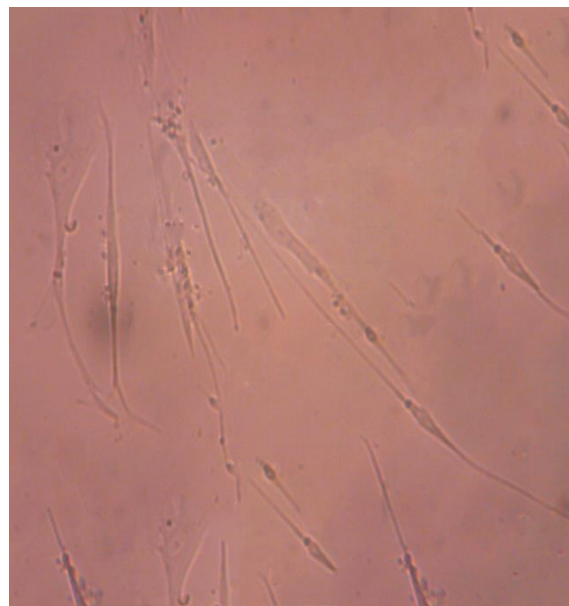
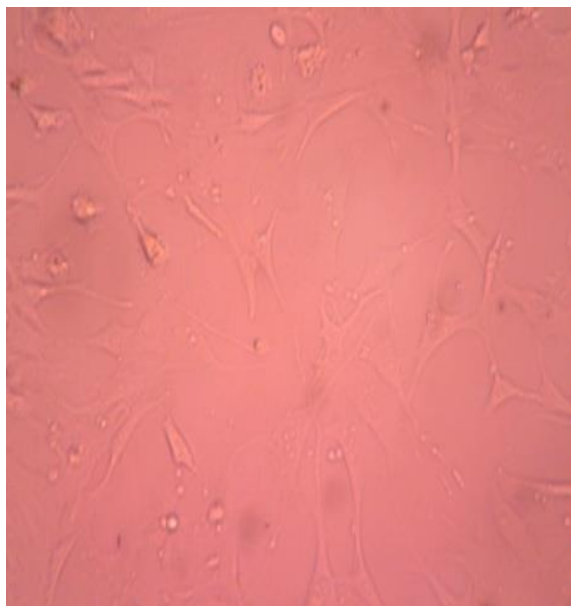
سلول‌های بنیادی مزانشیمی به علت ویژگی‌های خاص خود مانند قدرت تکثیر و تمایز بالا و امکان جداسازی از بافت‌های مختلف، از جایگاه خاصی برخوردارند. یکی از منابعی که در سال‌های اخیر توجه دانشمندان را به خود جلب کرده، مایع آمنیوتیک است. به دست آوردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی از این مایع، برخلاف سایر منابع مانند مغز استخوان، آسانتر است. همچنین، در مطالعاتی که در سال‌های ۲۰۰۷ و ۲۰۰۸ انجام شد مشخص گردید که سلول‌های بنیادی مایع آمنیوتیک در مقایسه با سلول‌های بنیادی مغز استخوان، قدرت تکثیر و خودنوزایی بالاتری دارند (۱۲، ۲۲). این ویژگی‌های مایع آمنیوتیک، این مایع را به عنوان منبعی بی‌بدیل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی معرفی می‌کند.

مطالعات مورفولوژیک نشان دادند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مایع آمنیوتیک موشی، شکل فیبروبلاستی دارند. این یافته، در تأیید تحقیقات انجام شده طی سال‌های ۲۰۰۷ تا ۲۰۰۹ روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مایع آمنیوتیک انسانی و موشی بوده و تشابه ساختاری سلول‌های بنیادی مایع آمنیوتیک انسانی و موشی را



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

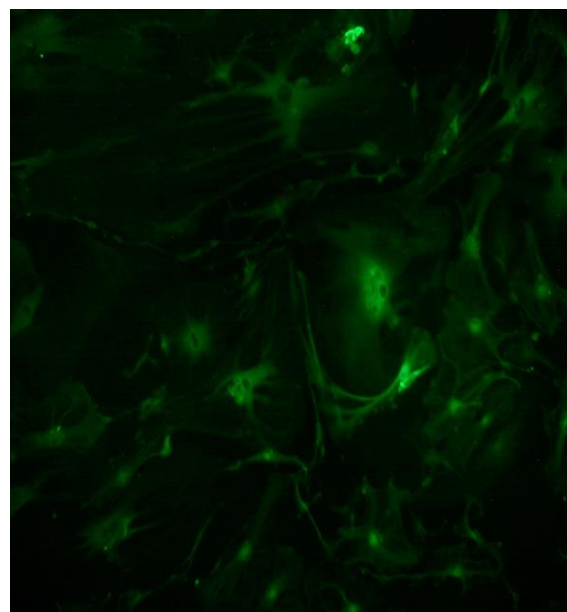
سلول‌های گروه تجربی که در مجاورت ۲۰ و ۳۰ درصد مایع زجاجیه قرار گرفته بودند، تفاوت قابل ملاحظه‌ای با سلول‌های گروه کنترل نداشته و همانند آنها مورفولوژی فیبروبلاستی داشتند. سلول‌های تیمار شده با ۴۰ درصد مایع زجاجیه (شکل ۳-A) نسبت به سلول‌های گروه کنترل (شکل ۳-B) کشیده‌تر بوده و هسته‌ی آنها حاوی تعداد هستک‌های بیشتری بود. همچنین، آرایش موضعی این سلول‌ها تغییر کرد و این سلول‌ها به موازات هم قرار گرفتند. نتایج بررسی‌های



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.

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



شکل ۴. بیان کریستالین‌ها در سلول‌های گروه تجربی تیمار شده با ۴۰ درصد مایع زجاجیه پس از ۱۴ روز با رنگ آمیزی 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 علائم 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

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 آمینوتیک 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 آمینوتیک به سمت تشکیل سلول‌های شبه فیبر عدسی چشم بود.

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 مطالعه‌ی 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 آمینوتیک 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 یافتند که 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

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.

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 mesenchymal 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 Hematol* 2009; 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.

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.