مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۱۹، شماره ۵، آذر و دی ۱۳۹۰
صفحه: ۵۷۷-۵۶۸

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 19, No. 5, Nov-Dec 2011
Pages: 568-577

القای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان به سلول‌های شبه فیبر عدسی

هما محسنی کوچصفهانی*[۱]، محمد نبیونی[۲]، حمداله دلاویز[۳]، خدیجه بهره بر[۴]، پریسا غیبی[۵]، نسیم اسلامی[۶]

۱- دانشیار زیست شناسی تکوینی، دانشگاه تربیت معلم تهران، گروه زیست شناسی
۲- استادیار زیست شناسی تکوینی، دانشگاه تربیت معلم تهران، گروه زیست شناسی
۳- استادیار آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، دانشکده پزشکی، گروه علوم پایه پزشکی
۴،۵،۶- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی تکوینی، دانشگاه تربیت معلم تهران، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۴/۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۷/۷

چکیده

مقدمه: در این مطالعه، اثر تمایزی مایع زجاجیه بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان به سلول‌های فیبر عدسی چشم مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی: در این کار تجربی سلول‌های مغز استخوان از استخوان‌های ران و درشت نی موش‌های NMRI جدا شد. بنیادی بودن این سلول‌ها با مارکر oct4 به روش ایمونوسیتوشیمی مورد بررسی قرار گرفت. جهت اثبات مزانشیمی بودن سلول‌ها علاوه بر خاصیت چسبندگی آنها، مارکرهای سطحی CD44 و CD31 با روش فلوسیتومتری بررسی شد. در گروه‌های تجربی سلول‌های مزانشیمی با مایع زجاجیه و DMEM همراه با مکمل‌ها کشت داده شدند. سپس توانایی‌آنها جهت تمایز به سلول‌های فیبر عدسی چشم با سنجش کریستالین α -crystallin به روش ایمونوسیتوشیمی مورد بررسی قرارگرفت.

نتایج: در کشت اولیه، جمعیت سلولی هتروژن بود و سلول‌ها پهن، دوکی و چند وجهی بودند. بیان oct4 در سلول‌ها، بنیادی بودن سلول‌ها را تایید کرد. آنالیز فلوسایتومتری مارکرهای سطحی نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان مارکر CD44 را به میزان بالا و مارکرهای CD31 را به میزان کم بیان می‌کنند. بررسی‌های مورفولوژیکی نشان داد که اکثر سلول‌های گروه‌های تجربی از لحاظ شکل ظاهری نسبت به سلول‌های گروه کنترل کشیده‌تر و به صورت موضعی به موازات هم آرایش یافتند. بیان الفا کریستالین در سلول‌های گروه‌های تجربی، تشکیل سلول‌های شبه فیبر عدسی را تایید کرد.

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های این مطالعه، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان در اثر عمل القایی مایع زجاجیه می‌توانند به سلول‌های فیبر عدسی چشم تمایز یابند.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، کریستالین، زجاجیه، کاتاراکت

*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۲۱-۸۸۳۲۹۲۲۰، نمابر: ۰۲۱-۸۸۸۴۸۹۴۰، پست الکترونیکی: kouchesefehani@saba.tmu.ac.ir

مقدمه

عدسی یکی از اجزای چشم است که ساختاری شفاف و الاستیک دارد و عمل آن تطابق و متمرکز کردن نور بر روی شبکیه است(۱). تجدید و تکثیر سلول های عدسی و شبکیه چشم در پستانداران بسیار محدود است و فقط در برخی از دوزیستان وجود دارد(۲). در طی دو دهه گذشته، تلاش‌های گسترده‌ای انجام گردیده است تا با شناسایی ژن‌های کلیدی در عدسی، امکان ترمیم و تجدید را در این سلول‌ها امکان‌پذیر کنند(۳).

با افزایش سن مشکلات و بیماری‌های چشمی به ویژه پیر چشمی و کاتاراکت در جوامع مختلف رو به افزایش است. آب مروارید(کاتاراکت) که یکی از شایع‌ترین بیماری‌های چشم می‌باشد به علت کدر شدن عدسی چشم اتفاق می‌افتد(۴)، بنابراین امروزه استفاده از سلول‌های بنیادی به عنوان یک راهکار برای ترمیم و یا جایگزینی سلول‌های عدسی و شبکیه ضروری به نظر می‌رسد.

سلول‌های بنیادی، سلول‌های تمایز نیافته‌ای هستند که توانایی تبدیل و تمایز به انواع مختلف سلول‌ها را دارند(۵). مغز استخوان منبع اصلی دو نوع از سلول‌های بنیادی به نام سلول‌های بنیادی خونساز (HSCs:(Hematopoietic Stem Cell) و سلول‌های بنیادی مزانشیمی(MSCs:Mesenchymal Stem Cell) می‌باشد(۶).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی را از منابع دیگر مثل بافت چربی، پولپ دندان، بافت سینوویال، بندناف، خون محیطی، بافت پریوست و ماهیچه اسکلتی جدا کرده‌اند(۷،۸). مهمترین منبع سلول‌های بنیادی مزانشیمی در سال‌های اخیر مغز استخوان بوده است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل دارا بودن خاصیت خودتجدیدی(self renewal) و توان تمایزی به عنوان یک منبع مناسب برای سلول درمانی و ژن درمانی محسوب می‌شود(۹).

مایع زجاجیه مایعی شفاف است که از جام بینایی منشاء می‌گیرد و فضای پشت عدسی چشم را پر کرده است و در مسیر تمایزی عدسی چشم نقش ویژه دارد. در زجاجیه کندروایتین سولفات، هپاران سولفات و اسیدهیالورونیک وجود دارند، اسید هیالورونیک تمایل بالایی برای جذب آب داشته و به این صورت ۹۹٪ وزن زجاجیه را آب تشکیل می‌دهد و یک حالت ژله‌ای به زجاجیه می‌دهد(۱۰).

مهمترین فاکتورهای موجود در مایع زجاجیه فاکتورهای رشد فیبروبلاستی(FGF) FGF-1 و FGF-۲ می‌باشد(۱۱). مطالعات تجربی نشان داده است که این فاکتورها در محیط کشت باعث القا و تمایز عدسی و بیان ژن‌های کریستالین و طویل شدن و تخصص‌یابی ساختاری در سلول‌های فیبری می‌گردند(۱۲). شواهد نشان می‌دهد که سلول‌های بافت پوششی عدسی تحت القای FGF در محیط کشت تمایز پیدا کرده و ساختار مولکولی و مورفولوژی فیبرهای عدسی را کسب کرده‌اند(۱۳).

عمده‌ترین پروتئین‌های سلول‌های فیبر عدسی، کریستالین‌ها می‌باشند(۱۴) که به دو گروه عمده α و γβ تقسیم می‌شوند(۱۵). با توجه به اینکه مایع زجاجیه چشم حاوی فاکتورهای رشدی می‌باشد که برای نگهداری لنز و دیگر اجزای چشم موثر می‌باشد(۱۶). لذا در این بررسی اثر القایی مایع زجاجیه چشم گاو بر سلول‌های مزانشیمی موش و تمایز ساختاری آن به فیبرهای عدسی در محیط کشت مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی

نحوه گرفتن مایع زجاجیه:

در این پژوهش تجربی، چشم‌های گاو گرفته شده از کشتارگاه کرج در PBS(Phosphate Buffer Saline) به آزمایشگاه منتقل شد و با آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و استرپتومایسین همراه با PBS استریل گردید. با فرو کردن سر سرنگ ۱۶g از ناحیه پشتی چشم، مایع زجاجیه بیرون کشیده شد و در دستگاه سانتریفیوژ با دور rpm ۱۴۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. مایع رویی فیلتر گردید و در فریزر ۴۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جداسازی و کشت سلول های مزانشیمی مغز استخوان:

موش‌های نژاد NMRI با سن تقریبی ۴-۶ هفته با روش جابجای مهره‌های گردنی کشته شدند. در شرایط کاملاً استریل

استخوان‌های ران و درشت نی جدا و داخل محیط DMEM قرار داده شد و سپس به زیر هود منتقل گردید. دو سر استخوان با یک قیچی کاملا استریل بریده شده و مغز استخوان از داخل کانال استخوان با استفاده از سرنگ حاوی محیط DMEM و عمل Flushing خارج شد.

مغز استخوان در فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته و سانتریفیوژ شد تا پلت سلولی تشکیل شود. سپس محیط رویی تخلیه شده و سلول‌ها در ۲ میلی لیتر محیط تازه معلق شدند. محیط مورد استفاده DMEM(Dubleco's Modified Eagles Medium (Gibco; Germany حاوی ۱۵٪ FBS(Fetal Bovine Serum; Gibco, Germany) و ۱۰۰ واحد بین‌المللی پنی‌سیلین(Gibco, Germany) و ۱۰۰ واحد بین‌المللی استرپتومایسین(Gibco, Germany) بود. سلول‌های حاصل در فلاسک ۲۵ سانتی متری کشت داده شدند. محیط سلول‌ها هر ۳ روز یکبار به مدت دو هفته تعویض شد.

سلول‌های مزانشیمی بر اساس خاصیت چسبندگی خود به کف فلاسک می‌چسبند، اما سلول‌های خونساز با تعویض محیط کشت حذف می‌شدند. بعد از یک هفته پاساژ اول انجام شد، به این ترتیب که سلول‌ها با استفاده از trypsin-EDTA از کف فلاسک جدا شده و پس از سانتریفیوژ با لام نئوبار شمارش شدند، درصد سلول‌های زنده به وسیله رنگ آمیزی تریپان بلو تعیین شد. ضمن انجام پاساژهای دوم و سوم سلول‌های پاساژ سوم در مرحله بعدی تحقیق استفاده گردیدند. بنیادی و مزانشیمی بودن این سلول‌ها با مارکرهای Oct4، CD44 و CD31 با روش‌های ایمونوسیتوشیمی و فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت.

ارزیابی ایمونوسیتوشیمی با نشانگر Oct4:

به منظور انجام ارزیابی ایمونوسیتوشیمی، سلول‌های مزانشیمی به مدت ۱۵ دقیقه با پارافرمالدئید ۴ درصد در دمای اتاق تثبیت شدند. سپس با PBS شتشو داده و از بافر بلاک کننده حاوی Triton X-100 جهت نفوذپذیری سلول‌ها برای ورود آنتی‌بادی استفاده شد. سپس Goat serum اضافه شد و پس از خارج کردن Goat serum، آنتی‌بادی اولیه anti oct4 رقیق شده در BSA/PBST ۰/۲ درصد اضافه شد و سلول‌ها در این محلول به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند.

نمونه‌ها ۲ بار با PBS/Tween ۰/۱ درصد شتشو داده شدند. آنتی‌بادی ثانویه رقیق شده در BSA/PBST ۰/۲ درصد متصل به(FITC (Fluorescein isothiocyanate، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق اضافه شد. در نهایت به سلول‌ها رنگ Hoechst اضافه شد تا هسته‌ها رنگ بگیرند. در طول آزمایش از میکروسکوپ معکوس فلورسانس جهت ارزیابی سلول‌ها استفاده شد.

بررسی بیان مارکرهای سطحی به روش فلوسیتومتری:

سلول‌ها را بعد از تریپسینه و سانتریفیوژکردن در اپندورف ریخته و با PBS شستشو و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ شدند. آنتی‌بادی‌های اولیه CD44 کونژوگه با PE(فیکواریترین) و CD31 کونژوگه با FITC (فلورسنس ایزوتیوسیانات) اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در یخچال قرار گرفت و برای کنترل منفی از آنتی بادی‌های PE-IgG2a, FITC- IgG2b استفاده شد. در مرحله بعد سلول‌ها پس از شستشو با PBS به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ شدند. سپس به سلول‌ها بافر فیکس کننده فرمالین ۱ درصد اضافه شد و با دستگاه فلوسیتومتری (FACS) آنالیز شدند.

تیمار سلول‌های جدا شده با مایع زجاجیه:

پس از آخرین پاساژ سلول‌ها بعد از شمارش سلولی، تعدادی سلول در پلیت ۲۴ خانه‌ای کشت داده شدند و پس از چسبیدن سلول‌ها به کف ظرف، گروه‌های تجربی با دوزهای ۱۵٪، ۲۰٪، ۲۵٪، ۵۰٪ از مایع زجاجیه تیمار شدند و گروه کنترل بدون تیمار با مایع زجاجیه و صرفاً با DMEM و FBS ۱۵٪ و آنتی‌بیوتیک‌ها کشت داده شدند. این خانه‌ها به مدت ۱۴ و۲۱ روز تحت تیمار و کشت قرار گرفتند.

رنگ‌آمیزی سلول‌ها با مارکر کریستالین:

در انتهای روزهای ۱۴ و ۲۱، طبق روش ایمونوسیتوشیمی ذکر شده در بالا، نمونه‌های تجربی و نمونه‌های کنترل، با آنتی‌بادی

اولیه کریستالین alpha A+ alpha B crystalline antibody (ab28163) و آنتی‌بادی ثانویه anti-rabbit-IgG-fitc(AF8035) رنگ‌آمیزی شدند.

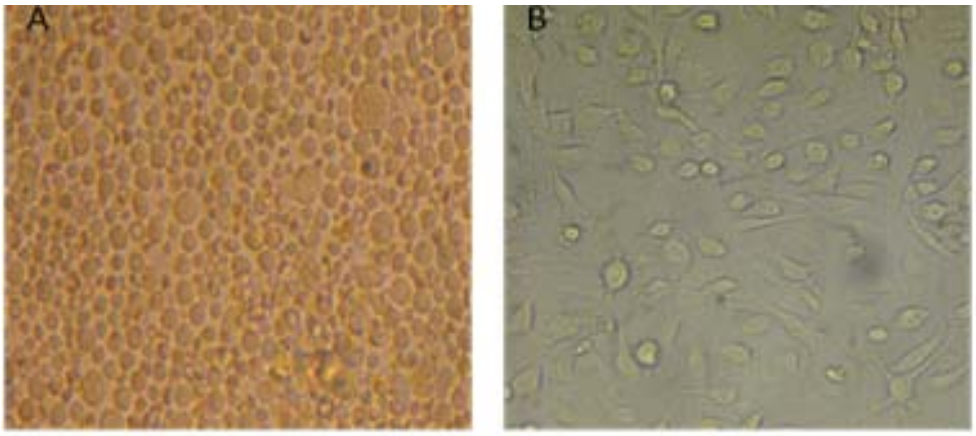
نتایج

مورفولوژی سلول‌های کشت داده شده:

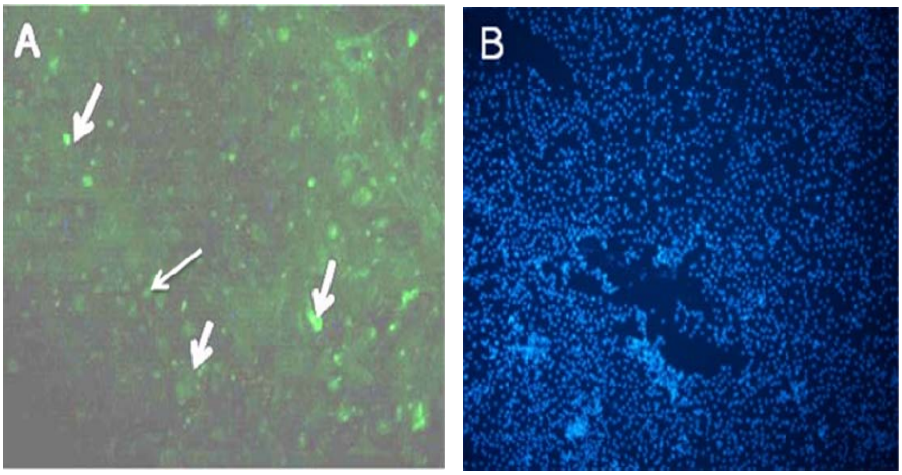
در کشت اولیه سلول‌های گرفته شده از مغز استخوان موش‌های NMRI به شکل گروه‌های سلولی ناهمگن و هتروژن دیده شدند(تصویر ۱,A). در روز هفتم، سلول‌ها با مورفولوژی متفاوت نظیر پهن، دوکی و چند وجهی مشاهده شدند(تصویر ۱ ,B). در پاساژهای بعدی تعداد سلول‌های دوکی شکل بیشتر شد، به طوری که در پاساژ سوم اکثریت سلول‌ها دوکی شکل بودند. در ادامه پاساژهای بعدی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بصورت خالص در آمده بودند و سلول‌های مزانشیمی از لحاظ مورفولوژیکی بیشتر شبیه به سلول‌های فیبروبلاست(دوکی شکل) بودند.

ایمونوسیتوشیمی سلول های بنیادی مغز استخوان:

بنیادی بودن سلول‌های کشت شده،با استفاده از آنتی‌بادی Oct4 و به روش ایمونوسیتوشیمی سنجش شد. سلول‌های مزانشیمی کشت شده با آنتی‌بادی Oct4 ایمونوپوزیتیو بودند که بیانگر بنیادی و چند توان بودن این سلول‌ها است(تصویر۲،A). هسته سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان که با رنگ‌آمیزی Hoechst آبی دیده می‌شوند(تصویر۲،B).

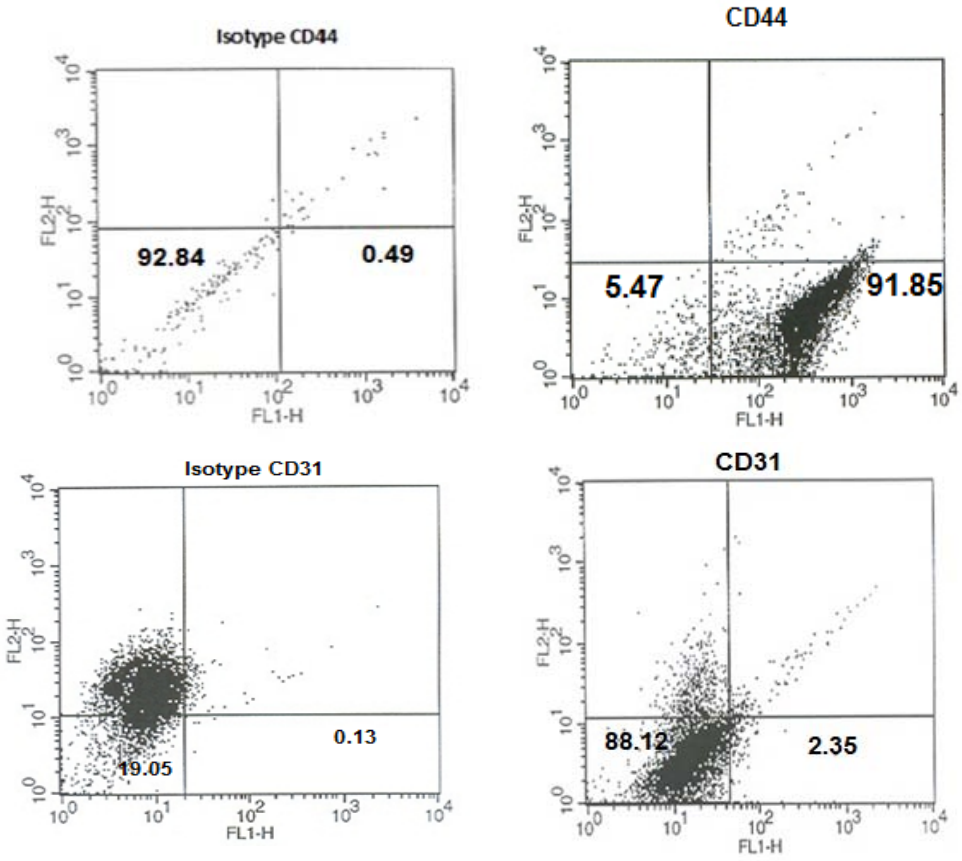


تصویر۱: کشت سلول‌های مغز استخوان گرفته شده از موش در روز اول کشت، سلول‌های مزانشیمی و غیرمزانشیمی به شکل ناهمگن دیده شدند(A). در روز هفتم، سلول‌های مزانشیمی بیشتر به صورت دوکی شکل مشاهده شدند(B). (میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس با بزرگ نمایی ۴۰۰ برابر).



تصویر۲: A- بیان Oct4 در این سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان با روش ایمونوسیتوشیمی، بنیادی بودن این سلول‌ها را نشان داد(فلش). B– هسته سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان که با رنگ آمیزیHoechst آبی دیده می‌شود(میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس با بزرگ نمایی ۲۰۰ برابر).

بررسی بیان مارکرهای سطحی به روش فلوسیتومتری: جهت اثبات ماهیت مزانشیمی بودن این سلول‌ها علاوه بر خاصیت چسبدگی آنها به ظرف کشت، یکی دیگر از راه‌های شناسایی آنها استفاده از مارکر سطحی می‌باشد، که بعد از چند بار پاساژدادن و جداشدن سلول‌های بنیادی مزانشیمی از سایر سلول‌ها به روش فلوسیتومتری بررسی شد که مارکر CD44 به میزان بالایی و مارکر CD31 به میزان کمی بیان شد(شکل ۳).



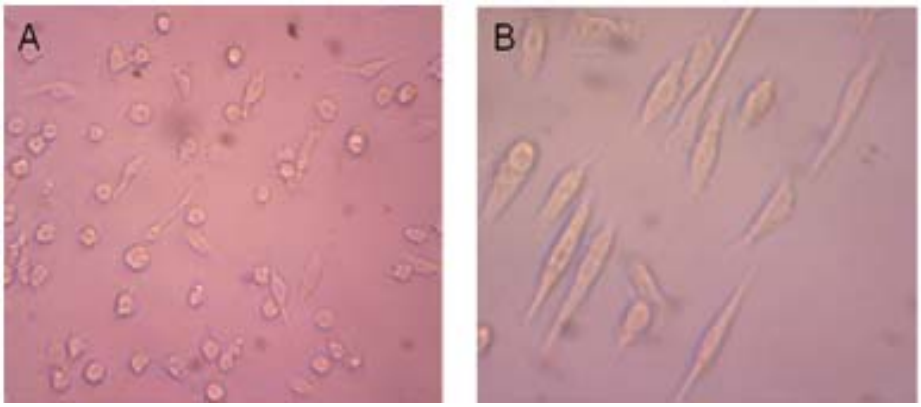
شکل۳: بررسی نتایج فلوسیتومتری سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان با مارکرهای سطحی CD44 و CD31: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان ۹۱/۸۵ درصد مارکر CD44 و ۲/۳۵ مارکر CD31 را بیان کردند.

تاثیر مایع زجاجیه بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی:

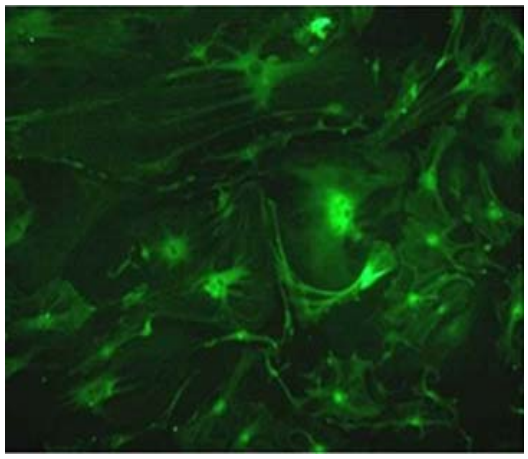
سلول‌های بنیادی مزانشیمی در گروه‌های تجربی که با مایع زجاجیه تیمار شده بودند، از نظر شکل ظاهری نسبت به سلول‌های گروه کنترل(بدون مایع زجاجیه) کشیده‌تر و به صورت موضعی به موازات هم آرایش یافته بودند(تصویر۴). بعلاوه، تعداد هستک‌ها در داخل هسته زیاد شده بود که نشان دهنده فعالیت پروتئین‌سازی در این سلول‌ها بود. در روز چهاردهم، مورفولوژی سلول‌های گروه تجربی دوکی‌تر و ساختاری مشابه رشته‌های فیبری کسب کرده بودند که با مورفولوژی سلول‌های پوششی فیبر عدسی مشابه بودند(تصویر۴). به علاوه پروتئین آلفا کریستالین در سلول‌های گروه‌های تجربی بیان شد(تصویر۵).

در این تحقیق از مایع زجاجیه چشم گاو برای القای تمایز سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان موش به سلول‌های فیبر عدسی استفاده شد. بررسی‌های مورفولوژیکی نشان داد که تنها در دوزهای ۲۵٪ و۵۰٪ از مایع زجاجیه، می‌توان تغییرات قابل مقایسه‌ای را نسبت به گروه‌های کنترل مشاهده کرد. تغییرات مورفولوژیکی مشاهده شده در این تحقیق عبارتند از کشیدگی

زیاد سلول‌ها، به موازات هم قرارگیری آنها، افزایش تعداد هستک‌ها و از دست دادن هسته سلولی که همه این نتایج مورفولوژیکی بیانگر شروع تمایز این سلول‌ها به سمت ساختارهای شبه فیبر عدسی می‌باشد.



تصویر۴ : سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از ۱۴ روز تیمار. در گروه کنترل(A) بدون مجاورت با مایع زجاجیه به شکل گرد دیده شدند. در حالیکه درگروه تجربی(B) بصورت دوکی و موازی هم قرار گرفته‌اند(میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس با بزرگ نمایی ۴۰۰ برابر).



تصویر۵ : بیان آلفا کریستالین در سلول‌های تیمار شده با مایع زجاجیه(میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس با بزرگ نمایی ۲۰۰ برابر)

بحث

در این تحقیق، توانایی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول‌های فیبر عدسی چشم بررسی گردید. به این منظور سلول‌های مزانشیمی از مغز استخوان موش جدا شد و به مدت ۱۴ و ۲۱ روز با مایع زجاجیه چشم گاو تیمار شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای اولین بار توسط Friednstin و Petrakova از مغز استخوان رت به دست آمد(۱۷). جداسازی و خلوص سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش به علت تعداد کم سلول‌های مزانشیمی در مغز استخوان و رشد ناخواسته سلول‌های غیرمزانشیمی به مراتب مشکل‌تر از دیگر گونه‌های جانوری است، این جداسازی بر اساس خاصیت چسبندگی سلول‌های مزانشیمی به ظروف کشت، صورت گرفت، چون سلول‌های هماتوپویتیئک توانایی چسبیدن به ظرف کشت را ندارند. در حقیقت این روش جداسازی تا به امروز به عنوان روش استاندارد برای جدا کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان شناخته شده و استفاده می‌شود. با این مکانیسم که بسیار ساده و کم هزینه می‌باشد در کوتاه‌ترین زمان ممکن می‌توان از خاصیت چسبندگی سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تعویض مداوم محیط کشت در آغازین ساعات کشت سلول‌های مغز استخوان موش

برای تخلیص سلول‌های دوکی بنیادی مزانشیمی استفاده کرد(۱۸). در این تحقیق برای اثبات بنیادی بودن سلول‌ها بیان Oct4 و برای مزانشیمی بودن سلول‌ها از خاصیت چسبندگی آنها و مارکرهای CD44 و CD31 استفاده شد.

Eslaminejad و همکاران در سال ۲۰۰۷ مارکرهای سطحی CD135، CD44، CD34، CD45، CD11b و Thy1.2 را در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش بررسی کردند که نتایج این بررسی نشان داد که مارکر CD44 در حد بسیار بالایی(۹۰ درصد) و سایر مارکرها به میزان کم در این سلول‌ها بیان شدند(۱۹). در این مطالعه بیان برخی مارکرهای سطحی نظیر CD44 و CD31، در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به روش فلوسیتومتری مورد بررسی قرار گرفت که نتایج این تحقیق نشان داد که مارکر CD44 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بیان بالایی(۹۱/۸۵) داشته در حالی که مارکر CD31 بیان کمی(۲/۳۵) داشت.

در سال ۲۰۰۰، Eleanor و همکاران بر روی رشد و تمایز سلول‌های اپیتلیومی عدسی انسان مطالعه کردند. آنها این سلول‌های اپیتلیومی را جدا کرده و به مدت ۱۵ روز در محیط دارای FGF-2 کشت دادند. در نهایت مشاهده کردند که مورفولوژی آنها تغییر یافته و اجسام لنتوئیدی(Lentoid) (مجموعه دستجات چند سلولی گرد و دارای خاصیت انکساربالا) ظاهر شدند. آنها برای اثبات ادعای خود در مورد تمایز این سلول‌ها به عدسی چشم از مارکر آلفا کریستالین‌ها با روش RT-PCR استفاده کردند(۲۰). در تحقیق حاضر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان که به مدت ۱۴ و ۲۱ روز تحت القای مایع زجاجیه چشم قرار داشتند، از نظر بیان آلفا کریستالین مورد بررسی قرار گرفتند که پاسخ مثبت این سلول‌ها بیانگر تمایز آنها به سمت ایجاد سلول‌های فیبر عدسی و بیان ژن‌های خاص عدسی می‌باشد.

O`Connor و همکارانش در سال ۲۰۰۷ دو بافت اپیتلیومی از دو عدسی مجزا را بر روی هم در محیط کشت مخلوط با زجاجیه گاوی(به نسبت ۱:۱) کشت دادند که در این شرایط این سلول‌ها بعد از ۳۰ روز کشت شکل کروی پیدا کرده، شفاف شده و قادر به متمرکز کردن نور شده‌اند. در نتیجه مایع زجاجیه گاوی فاکتورهای مناسب برای تمایز به سمت سلول‌های عدسی را داراست(۲۱).

Maleki و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف می توانند تحت القای مایع زجاجیه به سلول‌های فیبر عدسی تمایز یابند(۲۲). نتیجه مطالعه ما همانند مطالعه Maleki و همکاران نشان داد، تحت القای فاکتورهای رشد موجود در مایع زجاجیه چشم، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان می‌توانند به ساختاری مشابه به فیبر عدسی تمایز یابند که در هر دو تحقیق مارکرتمایزی آلفا کریستالین بیان شدند.

نتیجه‌گیری

در کل از یافته‌های این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که بر اساس تغییرات مورفولوژیکی و بیان مارکرهای خاص عدسی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان در اثر تیمار با زجاجیه به سلول‌های شبه فیبر عدسی تمایز می‌یابند.

سپاسگزاری

از همکاری آقای دکتر امیر آتشی مدیر گروه سلولی شرکت بن یاخته و همچنین مساعدت نمودن دانشگاه علوم پزشکی ایران جهت انجام آنالیز فلوسایتومتری صمیمانه سپاسگزاری می‌نماییم.

منابع:

1- Tholozan F, Quinlan RA. ***Lens cells: more than meets the eye.*** The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2007; 39(10): 1754-9.

2- Tsonis PA, Rio-Tsonis KD. ***Lens and retina regeneration: transdifferentiation, stem cells and clinical applications.*** Experimental Eye Research 2004; 78(2): 161-72.

3- Bosco L, Venturini G, Willems D. ***In vitro lens transdifferentiation of Xenopus laevis outer cornea induced by fibroblast growth factor (FGF).*** Development 1997; 124(2): 421-8.

4- 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.

5- Behfar A, Yamada S, Crespo-Diaz R, Nesbitt JJ, Rowe LA, Perez-Terzic C, et al. ***Guided cardiopoiesis enhances therapeutic benefit of bone marrow human mesenchymal stem cells in chronic myocardial infarction.*** Am Coll Cardiol 2010; 56 (9): 721-34.

6- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. ***Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.*** Science 1999; 284(5411): 143-7.

7- Baghaban Eslaminejad MR, Taghiya L. ***Mesenchymal stem cell purification from the articular cartilage cell culture.*** Iranian J Basic Med Sci 2007; 10(3): 146-53.

8- Alexanian AR. ***Neural stem cells induce bone- marrow-derived mesenchymal stem cells to generate neural stem-like cells via juxtacrine and paracrine interactions.*** Exp Cell Res 2005; 310(2): 383-91.

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

10- Oyser CW. ***The human eye:stricture andfunction.*** Sinauer Associates; 1999.p. 530-1

11- Majima K. ***Presence of growth factor in human vitreous.*** Ophthalmologica 1997; 211(4): 226-8.

12- McAvoy JW. ***Beta- and gamma-crystallin synthesis in rat lens epithelium explanted with neural retinal.*** Differentiation 1980; 17(2): 85-91.

13- Zhao H, Rossant J, Ornitz DM, Beebe DC, Robinson ML. ***Different FGFR genes play an essential but redundant role in postinduction lens development.*** Invest Ophthalmol Visual Sci 2003; 44(5): 954-63.

14- Bloemendal H, de Jong W, Jaenicke R, Lubsen, NH, Slingsby C, Tardieu A***. Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallines.*** Prog Biophys Mol Biol 2004; 86 (3): 407-85.

15- Horwitz JA. ***Crystallin can function as a molecular chaperone.*** Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89 (21): 10449-1045.

16- Beebe DC, Latker CH, Jebens HA, Johnson MC, Feagans DE, Feinberg RN. ***Transport and steady-state concentration of plasma proteins in the vitreous humor of the chicken embryo: implications for the mechanism of eye growth during early development.*** Dev Biol 1986; 114 (2): 361-8.

17- Friedenstein AJ, Piatetzky Shapiro II, Petrakova KV. ***Osteogenesis in transplants of bone marrow cells.*** J Embryol. Exp. Morph 1966; 16(3): 381-390.

18- Kemp KC, Hows J, Donaldson C. ***Bone marrow-derived mesenchymal sem cells.*** Leuk lymphoma 2005;

46(11): 1531-44.

19- Eslaminejad MB, Nadri S, Hossini RH. ***Expression of Thy 1.2 surface antigen increases significantly during the murine mesenchymal stem cells cultivation period.*** Dev Growth Differ 2007; 49(4): 351- 64.

20- 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 (12): 3893-907.

21- Oconnor MD, McAcavoy JW. ***In vitro generation of function lens-like structures with relevance To age-related nuclear cataract.*** Invest ophthalmol Vis Sci 2007;48 (3): 1245-52.

22- Maleki M, Parivar K, Nabiyouni M, Yaghmaei P, Naji M. ***Induction of alpha-crystallins expression in umbilical cord mesenchymal stem cells.*** Iranian J Ophthalmology 2010; 22(2): 67-71.

Differentiation Induction of the Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow to Lens Fiber-Like Cells

Mohseni Kouchesfahani H(PhD)*[1], Nabiuni M(PhD)[2], Delaviz H(PhD)[3], Bahrebar Kh(MSc)[4], Gheibi P(MSc)[5], Eslami N(MSc)[6]

[1,2,4-6]*Department of Biology, Tarbiat Moallem University, Tehran, Iran*
[3]*Department of Basic Medical Sciences, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran*

Received: 10 Jul 2011 ***Accepted:*** 23 Sep 2011

Abstract

Introduction: In this study the effect of vitreous humor on the mesenchymal stem cells (MSCs) derived from bone marrow to lens fiber-like cells was investigated.

Methods: In this experimental study bone marrow cells were collected by flushing femurs and tibias in NMRI mice. Immunocytochemistry by Oct4 antibody was used to confirm that the cells are stem cells. The mesenchymal character of these cells was proven by their adherence and by such flocytometery markers as CD44, CD31. In experimental groups, MSCs were cultured with DMEM and bovine vitreous body for induction. The supplemented medium was changed every two days. The expression of α –crystalline, as the marker of lens differentiation, was detected by immunocytochemistry.

Results: During the primary culture, the cell population was heterogeneous where varying morphologies such as flat, spindle-shaped, and polygonal were observed. In the subsequent passages, the number of the spindle-shaped cells appeared to increase, so that in passage 3 the majority of the cells seemed morphologically to be spindle-shaped.

Immunocytochemistery study confirmed the presence of stem cells using Oct4 antibody. The flowcytometric analysis of surface markers revealed that mesenchymal bone marrow stem cells express CD44 and CD31 to a low level. Morphological studies showed that most cells in experimental groups were locally longer and more aligned in parallel compared to control group cells. α –crystalline expression proved the formation of lens fiber-like cells.

Conclusion: According to the findings of this study, it can be concluded that MSCs derived from mouse bone marrow differentiate into lens fiber like cells by treating them with vitreous humor.

Keyword: Mesenchymal Stem Cells, Vitreous Body, Immunohistochemistry; Cataract

This paper should be cited as:
Mohseni Kouchesfahani H, Nabiuni M, Delaviz H, Bahrebar Kh, Gheibi P, Eslami N. ***Differentiation induction of the mesenchymal stem cells derived from bone marrow to lens fiber-like cells***. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci; 19(5): 568-77.

Corresponding author: Tel:+ 98 21 88329220, Fax: +98 21 88848940, Email: kouchesefehani@saba.tmu.ac.ir