تأثیر مایع زجاجیه بر تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان به سلول‌های شبه فیبر عدسی در محیط کشت

هما محسنی کوچصفهانی [*]
محمد نبیونی [**]
حمداله دلاویز [***]
خدیجه بهره‌بر [****]
پریسا غیبی [****]
نسیم اسلامی [****]

[*] دکترای زیست‌شناسی تکوینی، دانشیار دانشگاه تربیت معلم تهران، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی
[**] دکترای زیست‌شناسی تکوینی، استادیار دانشگاه تربیت معلم تهران، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی
[***] دکترای آناتومی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی
[****] دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی تکوینی، دانشگاه تربیت معلم تهران، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ وصول:۱۳۹۰/۱/۲۷
تاریخ پذیرش:۱۳۹۰/۳/۸

مؤلف مسئول: خدیجه بهره بر
پست الکترونیک:bahrebar6224@yahoo.com

چکیده

مقدمه و هدف: عملکرد و شفافیت عدسی چشم در سنین پیری کاهش پیدا می‌کند. بنابراین مداخله خارجی برای ترمیم آن ضروری است. در این مطالعه، اثر تمایزی مایع زجاجیه بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی‌به سلول‌های فیبر عدسی بررسی شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی طی سال‌های ۱۳۹۰-۱۳۸۹ در دانشگاه تربیت معلم تهران انجام شد. تعداد ۱۵ سر موش از نژاد NMRI انتخاب و به صورت تصادفی به سه گروه تجربی ۱، ۲ و کنترل تقسیم شدند. ابتدا مغز استخوان از استخوان‌های ران و درشت نی موش‌ها جدا و کشت داده شد. با استفاده از مارکر Oct4 و به روش ایمونوسیتو شیمی، بنیادی بودن این سلول‌ها بررسی شد. سپس، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به مدت ۱۴ و ۲۱ روز با رقت‌های ۱: ۱و۳: ۱ به ترتیب در گروه‌های تجربی ۱ و ۲ با مایع زجاجیه چشم گاو تیمار شدند. در موش‌های گروه کنترل کشت سلول‌ها بدون حضور مایع زجاجیه انجام شد. با میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس، مورفولوژی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های فیبر عدسی بررسی گردید.

یافته‌ها: در کشت اولیه، جمعیت سلولی هتروژن بود و در پاساژهای بعدی بیشتر سلول‌ها دوکی شکل بودند. مطالعات ایمونوسیتوشیمی‌بنیادی بودن سلول‌ها را تأیید کرد. بررسی‌های مورفولوژیکی نشان داد که اکثر سلول‌های گروه‌های تجربی نسبت به سلول های گروه کنترل کشیده‌تر و به موازات هم آرایش یافته بودند. در داخل هسته آنها تعداد هستک‌ها زیاد شده و تقریباً ساختاری مشابه سلول‌های فیبر عدسی پیدا کرده بودند. به علاوه، غلظت ۲۵ درصد مایع زجاجیه در قیاس با غلظت ۵۰ درصد اثرات تمایزی بهتری نشان داد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد، سلول‌های بنیادی مزانشیمی‌در اثر عمل القایی مایع زجاجیه می‌توانند در مسیر تمایز به فیبر عدسی قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی، تمایز، مغز استخوان، زجاجیه، فیبر، عدسی

مقدمه

سیستم بینایی برای دریافت و ارتباط با دنیای بیرون از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. 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 سلول‌های عدسی و شبکیه چشم در پستانداران بسیار محدود است و فقط در برخی از دوزیستان وجود دارد(۲). در طی دو دهه گذشته، تلاش های گسترده ای انجام شده است تا با شناسایی ژن‌های کلیدی در عدسی، امکان ترمیم و تجدید را در این سلول‌ها امکان پذیر کنند(۳).

مطالعه‌های انجام شده نشان داده‌اند که سلول‌های پشتی عدسی توانایی ترمیم و تکثیر را دارند در حالی که بافت پوششی که در سطح شکمی عدسی قرار دارد، فاقد این توانایی است(٤). با افزایش سن، مشکلات و بیماری‌های چشمی، به ویژه پیرچشمی و آب مروارید در جوامع مختلف رو به افزایش است. بنابر این 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). در این میان، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل دارا بودن خاصیت خودتجدیدی و توان تمایز به سایر سلول‌های دیگر به عنوان یک منبع مناسب و یک استراتژی برای جایگزینی ضایعات سلولی و ژن درمانی محسوب می‌شوند(۶). مغز استخوان منبع اصلی دو نوع ازسلول‌های بنیادی به نام سلول‌های بنیادی خون‌ساز و سلول‌های بنیادی مزانشیمی است. به علاوه، سلول‌های پیش ساز بالغ چند توان را در کشت سلول‌های بنیادی مغز استخوان نیز نشان داده‌اند (۷).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی را از منابع دیگر مثل بافت چربی، پولپ دندان، غضروف مفصلی، بند ناف، خون محیطی، بافت پریوست و ماهیچه اسکلتی جدا کرده اند(۸). مهم‌ترین منبع سلول‌های بنیادی مزانشیمی در سال‌های اخیر مغز استخوان بوده است. بررسی‌های انجام شده نشان دادند که فاکتورهای رشد، اثر مهمی در روند تمایزی سلول‌های بنیادی به سایر سلول‌های دیگر، مانند؛ عصبی، غضروفی و ماهیچه‌ای دارند(۱۰ و۹). تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های عدسی یا شبکیه کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد مایع زجاجیه حاوی فاکتورهای رشد فراوانی است که در نگهداری عدسی و شبکیه چشم نقش ویژه دارد(۱۱).

در زجاجیه کندروایتین سولفات، هپاران سولفات و اسیدهیالورونیک وجود دارند. عدسی علی رغم این که یک ماده شفاف و بی‌رنگ است، ولی از سلول‌های زنده‌ای تشکیل شده است(۱۲). مهم‌ترین فاکتورهای موجود در مایع زجاجیه فاکتورهای رشد فیبروبلاستی[1] یک و دو هستند(۱۳). مطالعه‌های

1-Fibroblast Growth Factor(FGF)

تجربی نشان داده است که این فاکتور ها در محیط کشت باعث القاء و تمایز عدسی و بیان ژن‌های کریستالین، طویل شدن و تخصص یابی ساختاری در سلول‌های فیبری شوند(۱۴). شواهد نشان می‌دهد که سلول‌های بافت پوششی عدسی تحت القاء فاکتور رشد فیبروبلاستی در محیط کشت تمایز پیدا کرده و ساختار مولکولی و مورفولوژی فیبرهای عدسی را کسب کرده‌اند(۱۵). از طرفی استفاده از دوزهای زیاد فاکتور رشد فیبروپلاستی همراه با تکثیر سلول‌های پوششی عدسی بوده که منجر به آب مروارید زودرس شده است(۱۶). مایع زجاجیه چشم حاوی فاکتورهای رشد فوق است که برای نگهداری لنز و دیگر اجزای چشم مؤثر است(۱۷).

هدف این مطالعه بررسی اثر القایی مایع زجاجیه چشم گاو بر سلول‌های مزانشیمی موش و تمایز ساختاری آن به فیبرهای عدسی در محیط کشت بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی طی سال‌های ۱۳۹۰-۱۳۸۹ در دانشگاه تربیت معلم تهران انجام شد. پروتکل این تحقیق بر اساس قوانین بین‌المللی در مورد حیوانات آزمایشگاهی انجام گردید و در کمیته اخلاق دانشگاه تربیت معلم به تصویب رسید.

در این مطالعه تعداد ۱۵ سر موش از نژاد NMRI با سن تقریبی۶-۴ هفته انتخاب و به صورت تصادفی به سه گروه مساوی تجربی ۱ و۲ و کنترل تقسیم شدند. حیوانات با روش جا به جای مهره‌های گردنی[1] کشته شدند. در شرایط کاملاً استریل استخوان‌های ران و درشت نی جدا گردید و عضلات و بافت نرم اطراف استخوان‌ها پاک شد و داخل محیط DMEM[2] قرار داده شد. لوله محتوی استخوان‌های ران و درشت نی بر روی یخ قرار داده شد و به زیر هود منتقل گردید. دو سر استخوان با یک قیچی کاملاً استریل بریده و مغز استخوان از داخل کانال استخوان با عمل آسپیراسیون خارج گردید. برای این منظور، سرسوزن شماره ۲۲ متصل به سرنگ حاوی محیط DMEM از سر استخوان وارد کانال استخوانی شد و مغز استخوان از کانال استخوانی خارج گردید. مغز استخوان در فالکون ۱۵ میلی لیتری ریخته شد و به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰ سانتریفیوژ شد تا پلت سلولی تشکیل شود. سپس محیط رویی تخلیه شد و سلول‌ها در۲ میلی‌لیتر محیط تازه معلق شدند.

محیط مورد استفاده DMEM حاوی ۱۵ درصد FBS [3] و ۱۰۰ واحد بین المللی پنی‌سیلین و ۱۰۰ واحد بین المللی استرپتومایسین بود. سلول‌های حاصل در فلاسک ۲۵ سانتی‌متری کشت داده شدند. سپس فلاسک به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن منتقل گردید. بعد از ۲ روز محیط رویی خارج گردید و محیط DMEM تازه اضافه گردید. محیط سلول‌ها هر۳ روز یک‌بار به مدت دو هفته تعویض شد.

1-Cervical Dislocation
2-Dubleco,s Mmodified Eagles Medium (DMEM)
3-Fetal Bovine Serum(FBS)

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 ۲ میلی‌لیتر Trypsin-EDTA ۲۵ درصد ساخت شرکت گیبکوی آلمان از کف فلاسک جدا و پس از سانتریفیوژ با لام نئوبار شمارش شدند و درصد سلول‌های زنده به وسیله رنگ‌آمیزی تریپان بلو تعیین شد. ضمن انجام پاساژهای دوم و سوم سلول‌های پاساژ سوم در مرحله بعدی تحقیق استفاده شد. بنیادی بودن این سلول‌ها با استفاده از مارکر (ساخت شرکت آبکام انگلستان) و به روش ایمونوسیتو شیمی مورد بررسی قرار گرفت.

به منظور انجام ارزیابی ایمونوسیتوشیمی، سلول‌های مزانشیمی به مدت ۱۵ دقیقه با پارافرمالدئید ۴ درصد در دمای اتاق تثبیت شدند. سپس با بافرPBS [1] شتشو داده شده و از بافر بلاک کننده حاوی TritonX-۱۰۰، جهت نفوذپذیری سلول‌ها برای ورود آنتی‌بادی استفاده شد. سپس سرم بز اضافه شد و پس از خارج کردن این سرم، آنتی‌بادی اولیه anti- oct4 رقیق شده در بافر ۲ /۰ درصد اضافه شده و سلول‌ها در این محلو ل به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند.

نمونه‌ها ۲ بار با PBS-Tween ۰/۱ درصد شتشو داده شدند. آنتی‌بادی ثانویه از کلاس IgG نشاندار شده با فلورسنس ایزوتیوسیانات [2] رقیق شده در بافر ۲/۰ درصد، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق اضافه شد. در نهایت به سلول‌ها رنگ هوخست [3] به میزان ۱۰۶ میلی‌لیتر بر میکروگرم اضافه شد تا هسته‌ها رنگ بگیرند. از میکروسکوپ معکوس فلورسانس جهت ارزیابی سلول‌ها استفاده شد.

چشم‌های گاو در ظرف حاوی یخ از کشتارگاه به آزمایشگاه منتقل شدند و مایع زجاجیه که حالت ژله ای دارد با سر سرنگ از چشم خارج شد و به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۴ هزار سانتریفوژ گردید تا یکنواخت شود و در دمای ۴۰ ـ درجه سانتی‌گراد فریزر ذخیره شد.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل از پاساژ سوم در دو گروه تجربی ۱و۲ با حجم های۱:۱و ۳: ۱ مایع زجاجیه و DMEM همراه با مکمل‌ها به مدت ۱۴ و ۲۱ روز کشت داده شدند. محیط کشت هر دو روز یک‌بار تعویض شد. در گروه کنترل، کشت سلول‌های مزانشیمی بدون حضور زجاجیه و در شرایط یکسان با دو گروه تجربی انجام شد.

یافته‌ها

در کشت اولیه، سلول‌های گرفته شده از مغز استخوان موش‌ها به شکل گروه های سلولی ناهمگن و هتروژن دیده شدند. در این مرحله، سلول‌ها با

1-Phosphate Buffer Saline(PBS)
2-Anti-IgG conjugated to fluorescein isothiocyanate (Anti-IgG-FITC)
3-Hoechst(Sigma, USA)

مورفولوژی متفاوت نظیر؛ پهن، دوکی و چند وجهی مشاهده شدند. 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 به صورت خالص در آمدند و سلول‌های مزانشیمی از لحاظ مورفولوژیکی بیشتر شبیه به سلول‌های فیبروبلاست (دوکی شکل) شدند(تصویر ۱).

بنیادی بودن سلول‌های کشت شده با استفاده از آنتی بادی oct4 و به روش ایمونوسیتو شیمی سنجش شد. سلول‌های مزانشیمی کشت شده ازمجاورت با آنتی‌بادی Oct4 ایمونوپوزیتیو بودند که بیانگر بنیادی و چند توان بودن این سلول‌ها است(تصویر۲).

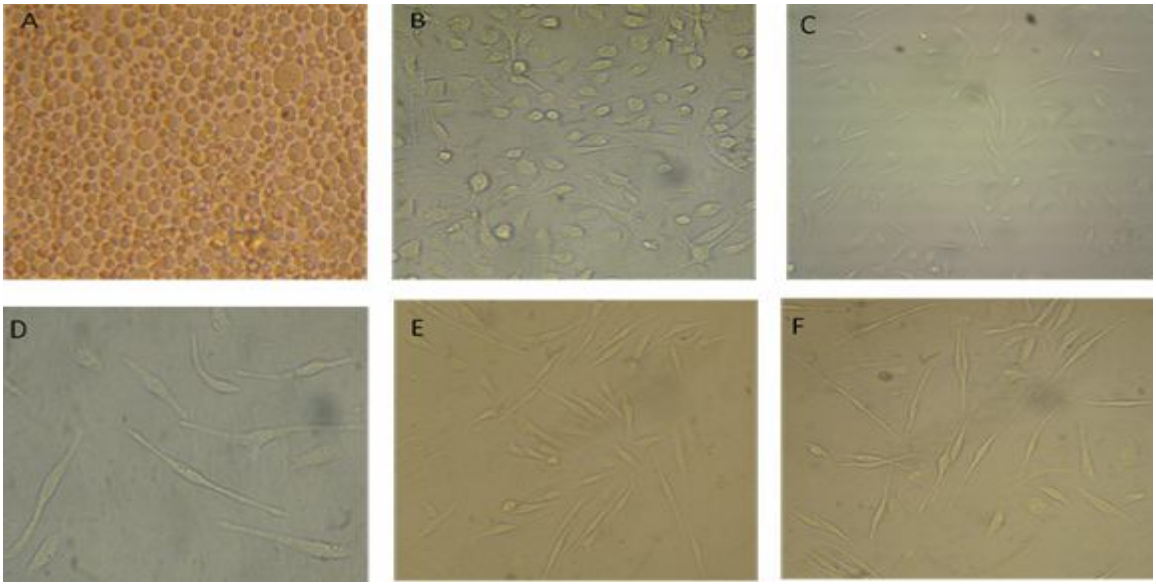
سلول‌های بنیادی مزانشیمی در گروه‌های تجربی که با مایع زجاجیه تیمار شده بودند، از نظر شکل ظاهری نسبت به سلول‌های گروه کنترل (بدون مایع زجاجیه) کشیده‌تر و به صورت موضعی به موازات هم آرایش یافته بودند. به علاوه، تعداد هستک‌ها در داخل هسته زیاد شده بود که نشان دهنده فعالیت پروتئین‌سازی در این سلول‌ها بود. 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 (تصویر۳).

نتایج نشان داد که غلظت‌های کمتر مایع زجاجیه (۲۵درصد) در مقایسه با غلظت ۵۰ درصد اثرات القایی بیشتری بر روی تمایز سلول‌های مزانشیمی برای تمایز به ساختار فیبرهای عدسی دارد(تصویر۴).

بحث و نتیجه‌گیری

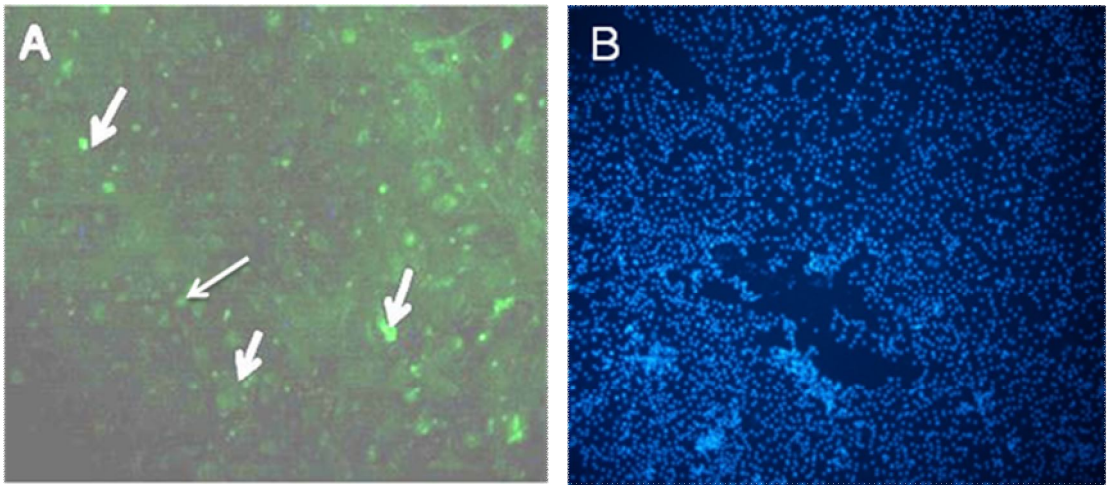
با افزایش سن حالت ارتجاعی عدسی چشم کمتر می شود و میزان تطابق آن کاهش پیدا می کند و باعث کاهش توانایی افراد در دید نزدیک می شود(٤). بنابر این جایگزینی و یا ترمیم عملکرد عدسی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. لذا هدف این مطالعه بررسی اثر القایی مایع زجاجیه چشم گاو، بر سلول‌های مزانشیمی موش و تمایز ساختاری آن به فیبرهای عدسی در محیط کشت بود.

در این مطالعه، یافته‌های ایمونوسیتوشیمی سلول‌های جدا شده از مغز استخوان را به عنوان سلول‌های بنیادی تأیید کرد. نتایج نشان داد، فاکتورهای رشد موجود در مایع زجاجیه اثر القایی بر سلول‌های بنیادی مغز استخوان دارد. شکل این سلول‌ها دوکی و طویل بود و تقریباً مورفولوژی فیبرهای عدسی را کسب کرده بودند. فاکتورهای رشد موجود در مایع زجاجیه و زلالیه اثر القایی بر تکثیر و تمایز سلول‌های پوششی عدسی چشم دارند (۱۸).

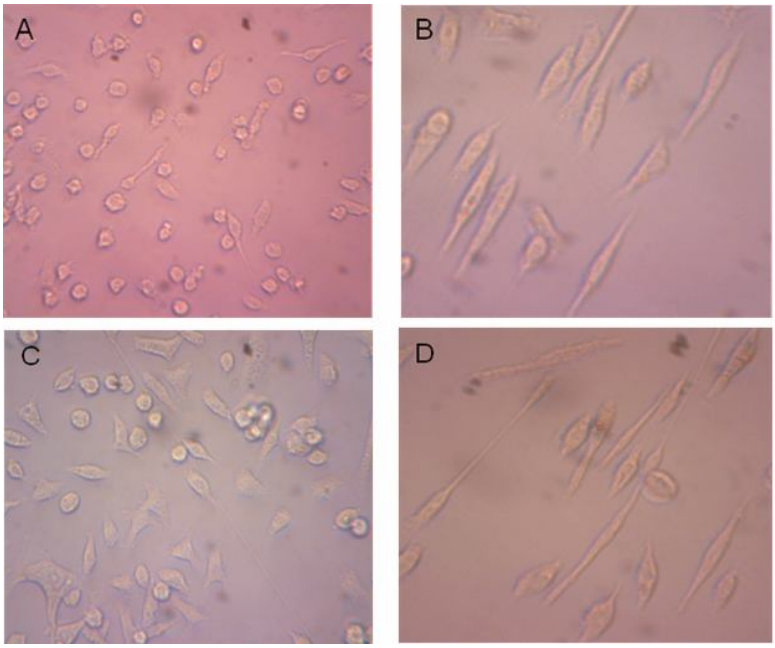


تصویر ۱: مقایسه مرفولوژی سلول‌های بنیادی مغز استخوان کشت داده شده طی زمان‌های مختلف (میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس، بزرگ‌نمایی ۴۰)

A:سلو ل های مزانشیم و غیر مزانشیمی ناهمگن، B: سلول‌های دوکی شکل منفرد در روز ٤، در روز اول کشت C: تعدا بیشتر سلول‌های دوکی شکل در روز ۷، D: ۷۰ درصد سلول‌های دوکی شکل در روز ۱۴، E: کلونی سلول‌های شبیه فیبروبلاستی در روز ۲۱، F: کلونی سلول‌های خالص مزانشیمی در روز ۲۸.

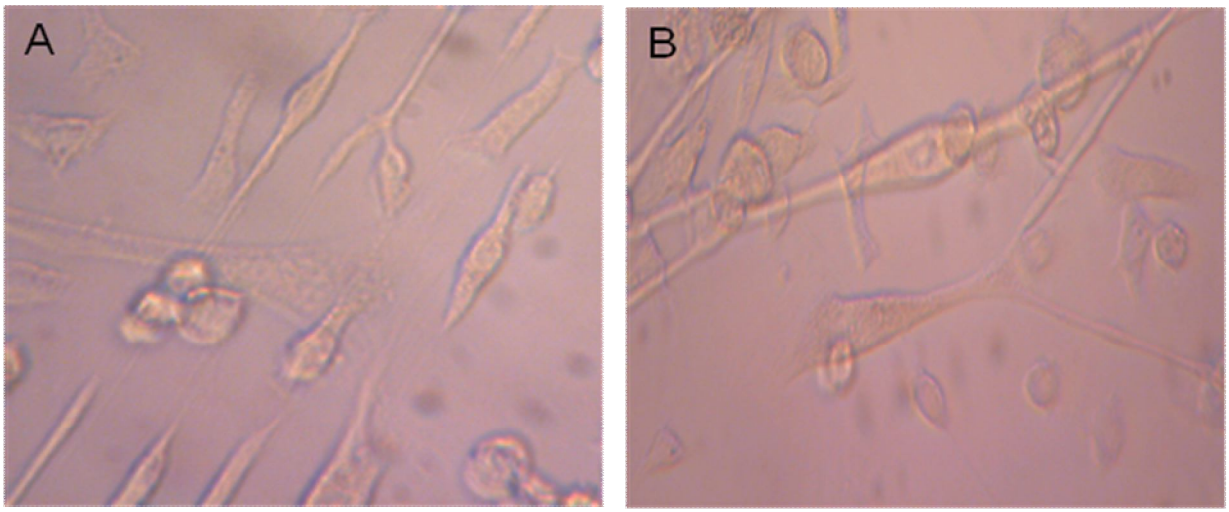


تصویر ۲ :A- سنجش بنیادی بودن سلول‌های مزانشیمی با استفاده از آنتی‌بادی Oct4 و روش ایمونوسیتوشیمی، B ـ رنگ آمیزی هوخست برای تشخیص هسته سلول‌های مزانشیمی (میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس، با بزرگ‌نمایی ۲۰).



تصویر ۳:مقایسه مرفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در گروه‌های کنترل و تجربی طی زمان‌های مختلف (میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس، بزرگ‌نمایی۴۰)

A: گروه کنترل در روز ۱۴، B: گروه تجربی در روز ۱۴، C: گروه کنترل در روز ۲۱، D: گروه تجربی در روز ۲۱



تصویر ۴: مقایسه مرفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در معرض القاء با غلظت‌های متفاوت مایع زجاجیه (میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس، بزرگ‌نمایی۴۰)

A: در معرض غلظت ۵۰ درصد، B: در معرض غلظت ۲۵ درصد

فاکتور رشد فیبروبلاست یکی از فاکتورهای مهمی است که در مایع زجاجیه وجود دارد. مطالعه‌های انجام شده نشان می‌دهد که این فاکتور برای تکامل طبیعی لنز لازم است(۱۹)، به گونه‌ای که حذف سه گانه ژن‌های فاکتور رشد فیبروبلاستی ۱، ۲ و۳ در طی روند شکل‌گیری پلاکود لنزی منجر به عدم

تشکیل حباب بینایی می‌شود(۱۹)، در حالی که بیان بیش از اندازه خانواده فاکتور رشد فیبروبلاستی منجر به شکل‌گیری زودرس عدسی می‌شود(۱۶). بنابراین وجود فاکتورهای فاکتور رشد فیبروبلاستی و سایر مولکول‌های رشد در مایع زجاجیه برای تکامل و رشد عدسی ضروری است. این بررسی نشان داد که با القاء و بیان ژن‌های خاص روند تمایز در سلول‌های بنیادی تغییر می‌کند و آنها به سلول‌های مورد نظر تغییر ساختار و عملکرد می‌دهند.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی در انسان به راحتی قابل دسترس می‌باشند. این سلول‌ها قادرند که در شرایط آزمایشگاهی به انواع دودمان‌های مختلف مزانشیمی مانند؛ سلول‌های چربی، غضروفی، ماهیچه‌ای و غیرمزانشیمی مانند سلول‌های نورونی تمایز یابند(۲۰). به همین دلیل سلول‌های بنیادی مزانشیمی به عنوان یک منبع ایده‌آل برای سلول درمانی وژن درمانی محسوب می‌گردند. یک بررسی انجام شده نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف می‌توانند تحت القای مایع زجاجیه برخی از پروتئین مربوط به ساختار لنز را بیان کنند(۲۱). نتیجه مطالعه اخیر همانند مطالعه ملکی و همکاران(۲۰۱۰) نشان داد که، تحت القاء فاکتورهای رشد موجود در مایع زجاجیه چشم، سلول‌های بنیادی مزانشیمی‌مشتق از بند ناف می‌توانند به ساختاری مشابه به فیبر عدسی تمایز یابند(۲۱).

در این تحقیق سلول‌های مزانشیمی از مغز استخوان موش، ۲۱ روز پس از تیمار با مایع زجاجیه چشم گاو ساختاری دوکی شکل پیدا کردند و در مقایسه با گروه کنترل سلول‌ها کشیده‌تر بودند. لازم به ذکر است که تعداد سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مغز موش در مقیاسه با دیگر پستانداران کمتر است و همراه با رشد دیگر سلول‌ها است که جداسازی و تخلیص سلول‌های مزانشیمی موش در روند کار اهمیت فراوانی دارد(۲۲) . دراین مطالعه اثر مایع زجاجیه در تغییر سلول‌های بنیادی به سلول‌های دوکی بهتر از تحقیقاتی بوده است که به تنهایی از فاکتور رشد فیبروبلاستی در محیط کشت استفاده شد(۱۸). این تفاوت به دلیل است که مایع زجاجیه نه تنها دارای فاکتور رشد فیبروبلاستی بلکه حاوی فاکتورهای رشد دیگری است که برای تمایز و تکامل طبیعی عدسی مهم است(۱۷). این یافته می‌تواند مکمل تحقیقاتی باشد که نشان می‌دهند هر چند که مایع زجاجیه یک ترکیب ژله‌ای فاقد سلول است، ولی حاوی فاکتورهای رشد فراوانی مانند، فاکتور رشد شبه انسولینی، فاکتور رشد مشتق از پلاکت و فاکتور رشد اپیدرمی‌است(۱۸ و۱۳).

در مطالعه وانگ و همکاران[1](۲۰۱۰) بر روی جوجه نشان داده شد که فاکتور رشد اپیدرمی نه تنها در تکامل لنز بلکه در بیان بسیاری از ژن‌های لنز در زمان بعد از تولد مهم است و فاکتور رشد فیبروبلاستی به تنهایی مسئول روند تمایزی فیبرهای عدسی نمی‌باشد(۱۸). هم‌چنین فاکتور رشد شبه انسولینی منجر به تمایز پروتئین‌های آلفا و بتا کریستالین در سلول‌های اپی تلیال موش صحرایی

مـی‌شـود(۲۳). نتـایج مطالعـه حاضـر در راسـتای بررسی‌های دیگر نشان می‌دهد کـه فاکتورهـای رشـد مـایع زجاجیـه بیـشتر بـر پـروتئین‌هـای سـاختاری سلول‌های مزانشیمی موش مؤثر بوده اسـت. سـاختار اصلی سلول‌های عدسی چشم، کریستالین‌ها هستند که به طور یکنواخت در عدسی توزیع مـی‌شـوند و باعـث ایجـاد خاصـیت شـفاف و انکـساری عدسـی مـی‌گردنـد (۲۴). در حـالی کـه در سـنین پیـری انعطاف‌پذیری عدسی کاهش می‌یابد و تمرکز تـصویر به خوبی اتفاق نمی‌افتد. بررسی‌های انجام شده در این زمینه نشان می‌دهند کـه بافـت پوشـشی جـدا شـده از عدسی چشم در محیط کشت زجاجیه تکثیر پیدا کـرده و قادر به متمرکز کردن نور می‌شـود(۲۵). در مطالعـه حاضر نشان داده شد که غلظـت‌هـای کمتـری از مـایع زجاجیه(۲۵ درصد) اثر القایی بیشتری بر سـلول‌هـای مزانشیمی نسبت به غلظت‌های بیـشتر آن(۵۰ درصـد) دارد.

در مجموع یافته‌های این مطالعه نـشان داد کـه سـلول‌هـای بنیـادی مزانـشیمی مـشتق شـده از مغـز استخوان موش می‌توانند تحت القای مایع زجاجیـه بـه سلول‌های شبه فیبر عدسی تمایز یابند. بنابر این برای رسـیدن بـه نتـایج بهتـر پیـشنهاد مـی‌شـود، تحقیقات بیشتری بـر روی فاکتورهـای رشـد مختلـف مایع زجاجیه و بر روی تمایز سـلول‌هـای بنیـادی بـه سـلول‌هـای فیبـر عدسـی چـشم انجـام شـود، تـا بـا مـشخص شـدن فاکتورهـای تأثیرگـذار و دوز مناسب آنها زمینـه لازم بـرای اسـتفاده بـالینی فـراهم شود.

تقدیر و تشکر

از همکاران مرکز تحقیقات سـلولی و مولکـولی دانشگاه تربیت معلم تهران و دانـشگاه علـوم پزشـکی یاسوج جهت فراهم آوردن امکانات این طـرح تقـدیر و تشکر می‌شود.

The effects of Vitreous Humor on Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow to Lens Fiber Like Cells

Mohseni Kouchesfahani H[*], **Nabiuni M**[**], **Delaviz H**[***], **Bahrebar KH**[****], **Gheibi P**[****], **Eslami N**[****].

[*]Associate Professor of Developmental Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Tarbiat Moallem University, Tehran,Iran
[**]Assistant Professor of Developmental Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Tarbiat Moallem University, Tehran,Iran
[***]Assistant Professor of Anatomy, Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran
[****]MSc in Developmental Biology, Department of Biology, Tarbiat Moallem University, Tehran, Iran

Received:16/04/2011
Accepted:29/05/2011

Corresponding Author: Bahrebar KH
Email:bahrebar6224@yahoo.com

ABSTRACT:

Introduction & Objective: The function and transparency of the lens actually diminishes with aging; as a result, external intervention is necessary to amend it. The aim of the present study was to investigate the effects of vitreous humor on the mesenchymal stem cells (MSCs) to lens fiber like cells.

Materials & Methods: The present experimental study was conducted at Tarbiat Moallem University in 2010. Bone marrow was collected from tibias in NMRI mice and then cultured. Immuno-cytochemistery was done to confirm the mesenchymal stem cells using Oct4 antibody. Subsequently, MSCs were treated with bovine vitreous body for 7 and 21 days. The morphology of the MSCs to the lens fibers were studied using Phase Contrast Microscope.

Results: During the primary culture, the cell population was heterogeneous and in the subsequent passages, the number of the spindle-shaped cells increased. Immuno-cytochemistery study confirmed the MSCs. Morphological studies showed that most cells in the experimental group were locally longer and more aligned in parallel compared to control group cells. Moreover, lens fiber like with large nuclei and multiple nucleoli was observed. Furthermore, the concentration of 25% of vitreous body had more induction effect on MSCs in comparison with the 50% concentration.

Conclusion: The MSCs derived from mouse bone marrow could differentiate into lens fiber like cells by treating them with vitreous humor.

Key words: Bone Marrow, Lens, Fiber, Stem Cells, Vitreous

REFERENCES:

1.Tholozan F, Quinlan RA. Lens cells: More than meets the eye. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2007; 39:1754–9.
2.Tsonis PA, Rio-Tsonis KD. Lens and retina regeneration: transdifferentiation, stem cells and clinical applications. Experimental Eye Research 2004; 78:161–72.
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: 421–8.
4.Imokawa Y, Brockes JP. Thrombin is a critical determinant of vertebrate lens regeneration. Curr Biol 2003; 13: 877–81.
5.Behfar A, Yamada S, Crespo-Diaz R, Nesbitt JJ, Rowe LA, Perez-Terzic C, Gaussin V, et al. Guided Cardiopoiesis Enhances Therapeutic Benefit of Bone Marrow Human Mesenchymal Stem Cells in Chronic Myocardial Infarction. Am Coll Cardiol 2010; 56: 721-34.
6.Pitchford SC, Hahnel MJ, Jones CP, Rankin SM. Troubleshooting: Quantification of mobilization of progenitor cell subsets from bone marrow in vivo. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 2010; 61:113–21.
7.Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R,Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 284:143-7.
8.Baghaban Eslaminejad MR, Taghiya L. Mesenchymal stem cell purification from the articular cartilage cell culture. Basic Medical Sciences 2007; 10:146-53.
9.Kränkel N, Spinetti G, Amadesi S, Madeddu P. Targeting stem cell niches and trafficking for cardiovascular therapy. Pharmacology & Therapeutics 2011; 129: 62–81.
10.Park S, Koh SE, Maeng S, Lee WD, Lim J, Lee YJ. Neural progenitors generated from the mesenchymal stem cells of first-trimester human placenta matured in the hypoxic-ischemic rat brain and mediated restoration of locomotor activity. Placenta 2011; 32: 269-76.
11.Hyuga M, Kodama R, Eguchi G. Basic fibroblast growth factor as one of the essential factors regulating lens transdifferentiation of pigmented epithelial cells. Int J Dev Biol 1993; 37: 319–26.
12.Mascarelli F, Rauais D, Counis MF, Courtois Y. Characterization of acidic and basic fibroblast growth factors in brain, retina and vitreous chick embryo. Biochem Biophys Res Commun 1987; 146: 478–86.
13.Majima K. Presence of growth factor in human vitreous. Ophthalmologica 1997; 211: 226–8.
14.McAvoy JW. Beta- and gamma-crystallin synthesis in rat lens epithelium explanted with neural retinal. Differentiation 1980; 17: 85–91.
15.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: 954-63.
16.Richardson NA, Chamberlain CG, McAvoy JW. IGF-1 enhancement of FGF induced lens fiber differentiation in rats of different ages. Invest. Ophthalmol Vis Sci 1993; 34: 3303–12.
17.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: 361–8.
18.Wang Q, John W, McAvoy JW, Lovicu FJ. Growth factor signaling in vitreous humor–induced lens fiber differentiation. IOVS July 2010; 51: 3599-611.
19.Lyu J, Joo CK. Wnt signaling enhances FGF2-triggered lens fiber cell differentiation. Development 2004; 131:1813–24.
20.Deng J, Petersen BE, Steindler DA, Jorgensen ML, Laywell ED. Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture and are neurogenic after transplantation. Stem Cells 2006; 24(4):1054-64.

21.Maleki M, Parivar K, Nabiyouni M, Yaghmaei P, Naji M. Induction of Alpha-Crystallins Expression in Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells. Iranian Journal of Ophthalmology 2010; 22(2): 67-71.
22.Soleimani M, Nadri S, Izadpanah R. Isolation of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow: frequent medium change method. Tehran University Medical Journal 2008; 66 (4): 229-36.
23.Beebe DC, Silver MH, Belcher KS, VanWyk JJ, Svoboda ME, Zelenka PS. Lentropin, a protein that controls lens fiber formation, is related functionally and immunologically to the insulin-like growth factors. Proc Natl Acad Sci 1987; 84: 2327–30.
24. Horwitz JA. Crystallin can function as a molecular chaperone. Proc Natl Acad Sci 1992; 89: 10449-53.
25. 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.

.