به نام خدا

بررسی بیان ژن‌های اختصاصی کبدی توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی و سلول‌های بنیادی کبدی در شرایط کشت

توسط :

زهرا نیکوزاد

پایان نامه

ارائه شده به تحصیلات تکمیلی دانشگاه به عنوان بخشی از فعالیت‌های تحصیلی لازم

برای اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته

زیست شناسی (گرایش بافت شناسی و جنین شناسی)

از دانشگاه دامغان

ارزیابی وتأییدشده توسط کمیته پایان نامه با درجه: **عالی**

دکتر محمد تقی قربانیان، استادیار دانشکده زیست شناسی دانشگاه دامغان (استاد راهنما)

دکتر آرزو رضایی، استادیار دانشکده زیست شناسی دانشگاه دامغان (استاد مشاور)

دکتر کامران حیدری، استادیار دانشگاه علوم پزشکی گلستان (داور اول)

دکتر مریم حاجی قاسم کاشانی، استادیار دانشکده زیست شناسی دانشگاه دامغان (داور دوم)

دکتر نیما قلعه، استادیار دانشکده فیزیک دانشگاه دامغان (نماینده تحصیلات تکمیلی)

خرداد ۱۳۹۰

چکیده

بررسی بیان ژن‌های اختصاصی کبدی توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی و سلول‌های بنیادی کبدی در شرایط کشت

به وسیله‌ی:

زهرا نیکوزاد

هدف: امروزه سلول درمانی روشی مورد قبول در درمان و ترمیم بافت می‌باشد. پلاستیسیتی سلول‌های بنیادی بالغ از جمله سلول‌های بنیادی مزانشیمی، آن‌ها را در درمان بسیاری از بیماری‌ها مانند بیماری‌های کبدی توانمند ساخته است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی به علت توان تمایزی و قدرت تکثیر فوق العاده به عنوان منبع سلولی مورد توجه‌ای برای کاربردهای درمانی می‌باشند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی در بافت‌های مختلفی، مانند مغز استخوان وجود دارند و توانایی تمایز به بافت‌های متنوعی از جمله سلول‌های بافت کبدی (هپاتوسیت‌ها) را دارند. هدف ما در این تحقیق بررسی شاخص‌های عملکرد سلول کبدی و بیان ژن‌های کبدی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی و هپاتوسیت‌ها در شرایط کشت می‌باشد.

مواد و روش: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان از فمور و تیبیای موش صحرایی جدا و در محیط-های α-MEM، DMEM، RPMI کشت داده شدند. همچنین هپاتوسیت‌ها نیز از بافت کبد جدا و در محیط DMEM کشت داده شدند. بیان ژن‌های کبدی مانند آلفافتوپروتئین، آلبومین، سیتوکراتین 18، سیتوکراتین 19 در سطح mRNA و با تکنیک RT-PCR در پاساژ سلولی 1و2 اندازه گیری شد. دیگر عملکردهای سلول کبد مانند سنتز آلبومین و اوره و ذخیره گلیکوژن نیز در سلول‌های مزانشیمی مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: در شرایط کشت، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و هپاتسیت‌های کبدی، عملکردهای ویژه کبد مانند سنتز آلبومین، اوره، ذخیره گلیکوژن و بیان برخی از ژن‌های کبدی را نشان دادند. علاوه بر این، پروفایل پروتئینی سلول‌های بنیادی مزانشیمی نیز شباهت زیادی با هپاتوسیت‌ها نشان دادند.

نتیجه گیری: این نتایج نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی برخی از شاخص‌های عملکردی کبد را نشان دادند و می‌توانند منبعی با ارزش برای پیوند سلول‌های بنیادی بالغ در ترمیم کبد باشند.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، هپاتوسیت‌ها، ژن‌های کبدی

فصل 1

مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته

مقدمه

امروزه به دلیل مشکلات زیاد در درمان بسیاری از بیماری‌ها، توجه علم پزشکی بر روی سلول درمانی[1] و استفاده از سلول‌های بنیادی[2] متمرکز شده است. سلول‌های بنیادی سلول‌هایی هستند که چندین ویژگی دارند. توانایی خودنوزایی[3]، تمایز به رده‌های مختلف سلولی و قابلیت انتقال آن‌ها به منظور بازسازی بافتی از ویژگی‌های این سلول‌ها می‌باشد [1،2،3]. سلول‌های بنیادی از توده سلولی داخلی[4] در طی تکوین بلاستوسیست مشتق می‌شوند، این سلول‌ها پرتوان[5] هستند و سلول‌های بنیادی جنینی[6] نامیده می‌شوند [4]. سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های بنیادی بدنی (سوماتیک) که چندتوان[7] هستند را می‌سازند. سلول‌های چندتوان به سلول‌های زاینده[8] ویژه در هر بافت تبدیل می‌شوند و این سلول‌های زاینده در نهایت توده اندام را می سازند [3].

[1] Cell therapy
[2] Stem cells
[3] Self-renewal
[4] Inner cell mass (ICM)
[5] Pluripotent
[6] Embryonic stem cells
[7] Multipotent
[8] Progenitor

سلول‌های بنیادی به دو دسته سلول‌های بنیادی بالغ[9] و سلول‌های بنیادی جنینی تقسیم‌بندی می شوند. این تقسیم‌بندی براساس توانایی این سلول‌ها در ایجاد انواع رده‌های سلولی می-باشد. سلول‌های بنیادی جنینی بسیاری از انواع سلول‌ها را می‌سازند، در صورتی که سلول‌های بنیادی بالغ موجود در اندام‌ها توانایی تمایز به انواع محدودتری از سلول‌ها را دارند [5]. سلول‌های مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی نسبت به سلول‌های بنیادی بالغ توانایی تکثیری ویژه‌ای دارند [6]، هر چند که استخراج این سلول‌ها و استفاده بالینی از آن‌ها با مشکلات اخلاقی مواجه است [7].

از مهمترین دسته از سلول‌های بنیادی بالغ، سلول‌های بنیادی مزانشیمی[10]، می باشند که از منابع مختلف مانند مغز استخوان، بافت چربی، پرده سینوویال، درم، استخوان ترابکولار، خون محیطی و .... استخراج می شوند [8،9]. اولین بار Alexander friendstain این نوع سلول‌ها را از مغز استخوان جدا کرد [10]. یکی از نقش‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مغز استخوان شکل‌دهی یک نیچ یا کنام تنظیمی[11] برای سلول‌های خون ساز می‌باشد که اثرات تنظیمی مثبت و منفی روی خودنوزایی و تمایز سلول‌های بنیادی خون ساز[12] دارند [11]. از دیگر ویژگی-های سلول‌های مزانشیمی مورفولوژی دوکی و فیبروبلاستی شکل آن‌ها است[10]. هنگام کشت به کف فلاسک متصل می‌شوند و کلونی‌های CFU-F[13] را تشکیل می‌دهند [12،13]. از مهم‌ترین ویژگی‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی، پنهان شدن از شناسایی سلول‌های ایمنی می‌باشد که به دلیل خواص فنوتیپی و عملکردی آن‌ها است. این سلول‌ها، سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن ضعیفی هستند، مولکول‌های MHC I[14] را به میزان کم بیان می‌کنند و مولکول-های MHC II را بیان نمی‌کنند. مقدار بیان کم مولکول‌های MHC I باعث محافظت این سلول‌ها در مقابل سلول‌های کشنده طبیعی[15] می‌شود و عدم بیان MHC II باعث پنهان شدن این سلول‌ها از شناسایی سلول‌های T می‌شود. سلول‌های مزانشیمی مولکول‌های کمک تحریکی[16] را نداشته، که این موضوع نیز سبب بی‌پاسخی سلول‌های T نسبت به آن‌ها می-

[9] Adult stem cells
[10] Mesenchymal stem cells (MSCs)
[11] Microenvironment
[12] Hematopoietic stem cells (HSCs)
[13] Colony forming unit fibroblast (CFU-F)
[14] Major Histocompatibility Complex
[15] Natural killer cells
[16] Co-Stimulatory

شود[14]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی در شرایط In vivo و In vitro پتانسیل تمایزی بالایی به ادیپوسیت‌ها (سلول‌های چربی)، کندروسیت‌ها (سلول‌های غضروفی) یا استئوبلاست‌ها (سلول‌های استخوانی) دارند [15،16]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی طی پیوند قادرند در مغز، ماهیچه، استخوان، شش، قلب،کبد، دستگاه گوارش و سیستم خون ساز مستقر شوند [17]. طی آسیب بافتی، سلول‌های مزانشیمی فاکتورهای محلولی را ترشح می‌کنند که عملکرد و شرایط ریز محیط بافتی را تغییر می‌دهند. این فاکتورها شامل SCF[17]، IL6[18]، HGF[19] و.... می‌باشند که توانایی ترمیم بافت‌های صدمه دیده را افزایش داده و باعث تحریک تکثیر و تمایز سلول‌های زاینده موجود در بافت‌های آسیب دیده می‌شوند و عکس‌العمل‌های ایمنی و التهابی را کاهش می‌دهند [18]. ویژگی‌های ذکر شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، از قبیل تحریک نکردن پاسخ ایمنی و پس نزدن پیوند، آن‌ها را به عنوان بهترین کاندید در سلول درمانی معرفی کرده است [19].

بیماری کبدی یکی از بیماری‌هایی است که در جهان تلفات زیادی می‌دهد. به طور معمول پیوند کبد موثرترین راه درمان برای بیمارانی با مرحله پایانی صدمه کبدی حاد یا مزمن است که با اصطلاح End Stage Liver Disease (ESLD) می‌شناسیم. این حالت همراه با ناتوانی کبد می‌باشد [20،21]، اما این روش محدودیت‌های زیادی دارد که شامل کمبود دهنده عضو، رد پیوند و هزینه‌های گران آن می‌باشد [22]. تقریباً بیشتر از 10% بیماران هنگامی که برای پیوند کبد در لیست انتظارند، می‌میرند [23]. از این رو استفاده از سلول‌های بنیادی از جمله سلول بنیادی مزانشیمی می تواند کمک مهمی به علم پزشکی در درمان این بیماری کند [24]. لذا در این تحقیق، به سئوالات زیر پاسخ خواهیم داد:

1- سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، در چه شرایطی از کشت بدون القاگر بیشترین پتانسیل را به سمت سلول‌های کبدی نشان می دهند؟

2- آیا سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، بدون حضور القاگر پتانسیل تمایزی به سمت سلول‌های کبدی و بیان ژن‌های ویژه کبدی مانند آلفافتوپروتئین، آلبومین، سیتوکراتین 18 و سیتوکراتین 19 را دارند؟

[17] Stem cell factor

[18] Interlukine 6

[19] Hepatocyte growth factor

3- آیا سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌توانند برخی از ویژگی‌های عملکردی سلول‌های کبدی مانند سنتز آلبومین، ترشح اوره، ذخیره گلیکوژن و الگوی پروفایل پروتئینی مشابه با سلول‌های کبدی را نشان دهند؟

برای پاسخ به این سؤالات از تکنیک‌های RT-PCR، سنجش آلبومین، اوره و رنگ‌آمیزی PAS به منظور ارزیابی تولید گلیکوژن و SDS-PAGE استفاده شد.

1-1 سلول‌های بنیادی

سلول‌های بنیادی با پتانسیل ترمیمی وسیع و ظرفیت تمایزی‌شان به چندین رده، در مهندسی بافت و سلول درمانی بسیار مورد توجه‌اند [25]. در حقیقت سلول‌های بنیادی، سلول‌های تخصص نیافته و تمایز نیافته‌ای هستند، که در طول عمر خود، توانایی خودنوزایی و ایجاد انواع زیادی از سلول‌های تمایز یافته را دارند [22].

سلول‌های بنیادی بر اساس وسعت توانایی‌شان در ایجاد انواع رده‌های سلولی تقسیم‌بندی می‌شوند. سلول‌های بنیادی همه‌توان[20] سلول‌هایی هستند که قادر به ایجاد انواع سلول‌های موجود در بدن می‌باشند و سلول تخم نمونه‌ای از سلول بنیادی همه‌توان می‌باشد [26]. سلول-های بنیادی پرتوان سلول‌هایی هستند که توانایی و پتانسیل تمایزی به سه لایه زاینده سوماتیکی اکتودرم، مزودرم و آندودرم را دارند. در حالیکه سلول‌های بنیادی چندتوان تنها قادر به تمایز به سلول‌های یک بافت و یا یک یا دو لایه زاینده می‌باشند [25]. سلول‌های بنیادی باید قادر به خودنوزایی باشند. طی تقسیمات متقارن[21] یا نامتقارن[22] جمعیت سلول‌های بنیادی حفظ می‌شود. در تقسیم متقارن هر دو سلول دختری ویژگی‌های کامل سلول بنیادی را حفظ می‌کنند، در صورتی که در تقسیم نامتقارن یک سلول دختری به صورت سلول بنیادی می‌ماند و سلول دیگر مسیر تمایزی را ادامه می‌دهد [25]. سلول های بنیادی به منظور حفظ خود در بافت بالغ، به طور همزمان، هم سلول‌های تخصصی آن بافت را ایجاد می کنند و هم سلول هایی را ایجاد می کنند که طی تقسیم به صورت تمایز نیافته باقی می‌مانند و سلول‌های بنیادی حفظ می‌شوند [3،2،1]. در واقع خاصیت خود نوزایی یک ویژگی منحصر به فرد سلول‌های بنیادی است در حالیکه سلول‌های زاینده که زاده سلول‌های بنیادی هستند، قادرند به صورت

[20] Totipotent
[21] Symmetric
[22] Asymetric

کوتاه مدت سازماندهی و تجدید کنند. این سلول‌ها پتانسیل یک یا چند دودمانی دارند و در نهایت تکثیر یافته و به جمعیت پیکری[23] تمایز می‌یابند [1].

سلول‌های بنیادی با توجه به منبع‌شان به دو دسته سلول‌های بنیادی بالغ و جنینی تقسیم می‌شوند. سلول‌های بنیادی بالغ و سلول‌های بنیادی جنینی دو منبع با ارزش سلولی به منظور سلول درمانی و مهندسی بافت می‌باشند و وقتی این سلول‌ها در شرایط کشت گسترش می‌یابند ویژگی خودنوزایی و توان تمایزی خود را حفظ می‌کنند. در حقیقت در شرایط In vitro، تمایز سلول‌های بنیادی به رده‌های مختلف سلولی با استفاده از فاکتورهای رشد ثابت شده است [25].

1-1-1 سلول‌های بنیادی جنینی

سلول‌های بنیادی که طی چند روز اول تکوین جنین پستانداران ایجاد می‌شوند، با عنوان سلول‌های بنیادی جنینی نامیده می‌شوند. این سلول‌ها از توده سلولی درونی بلاستوسیست مشتق می‌شوند و سلول‌های بنیادی جنینی پرتوان نامیده می‌شوند [25،27، 28،29]. سلول‌های بنیادی جنینی بطور ویژه Oct4، SSEA-4، TRA-1-60، Tra-1-81 را بیان می‌کنند و فعالیت تلومرازی بسیار بالایی دارند [30]. توانایی سلول‌های بنیادی جنینی برای ایجاد بافت‌های مشتق از سه لایه زاینده جنینی در شرایط In vitro و In vivo بی‌نظیر است [31،33]. تحت شرایط کشت مناسب، سلول‌های بنیادی جنینی، هر سه لایه سلولی سوماتیکی زاینده اکتودرم، مزودرم و آندودرم را ایجاد می‌کنند [25].

پیوند سلول‌های بنیادی جنینی پرتوان خطر شکل‌دهی تراتوما را به همراه دارد. هنگامی که سلول‌های بنیادی جنینی انسانی(hES) [24] به یک حیوان پیوند زده می‌شوند تومور انواع مختلف بافت‌ها مانند پوست، مو، ماهیچه و ... را ایجاد می‌کنند [32،33]. حضور سه لایه زاینده در این تومورها ویژگی پرتوان بودن این سلول‌ها را تأیید می‌کند و مشکلات اساسی استفاده از سلول-های بنیادی جنینی به خاطر شکل‌گیری تراتوما پس از پیوند، موضوعات اخلاقی این روش و پیچیدگی‌های درمانی نظیر عکس العمل‌های ایمنی می‌باشد [25،34].

[23] Somatic

[24] human Embryonic Stem cells

2-1-1 سلول‌های بنیادی بالغ

سلول‌های بنیادی بالغ در اکثر بافت‌های بالغ وجود دارند و توان و درجه تمایزی و خود-نوزایی‌شان در مقایسه با سلول‌های بنیادی جنینی محدودتر می‌باشد. با اینکه سلول‌های بنیادی بالغ به چندین رده تمایز می‌یابند اما سلول‌های پرتوانی نیستند [25].

یکی از سلول‌های بنیادی بالغ، سلول‌های بنیادی خون ساز می‌باشد [36،35]. سلول‌های بنیادی خون ساز ویژگی خودنوزایی دارند و وقتی که پیوند زده می‌شوند به صورت عملکردی سیستم خون ساز فرد پذیرنده را تجدید می‌کنند [25]. از دیگر سلول‌های بنیادی بالغ سلول-های بنیادی عصبی[25] می‌باشند که نورون‌ها، الیگودندروسیت‌ها و آستروسیت‌ها را ایجاد می-کنند[37]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی نیز جز سلول‌های بنیادی بالغ می‌باشند و به فیبروبلاست‌ها، استئوبلاست‌ها، ادیپوسیت‌ها و ماهیچه اسکلتی تمایز می‌یابند [40،39،38]. دسته‌ای دیگر از سلول‌های بنیادی بالغ معرفی شده سلول‌های بنیادی معدی- روده‌ای [41]، سلول‌های بنیادی اپیدرمی[42] و سلول‌های بنیادی کبدی[26][43] می‌باشند. در گذشته، اینگونه تصور می‌شد که سلول‌های بنیادی بالغی که از رده ویژه‌ای مشتق می‌شوند، تنها قادر به تمایز به سلول‌های همان رده می‌باشند. اما مشاهدات اخیر نشان داد که پتانسیل تمایزی بیشتری در سلول‌های بنیادی بالغ نهفته است و این ویژگی به عنوان پلاستیسیتی (انعطاف پذیری)[27] سلول‌های بنیادی معرفی شده است[25].

در شرایط In vivo، تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان به هپاتوسیت، شاهد مهم پلاستیسیتی سلول‌های بنیادی است [44]. سلول‌های بنیادی بالغ موجود در مغز استخوان علاوه بر نقش عملکردی خود در استخوان، توانایی ترمیم را در بافت‌های دیگر نیز دارند. سلول های بنیادی مزانشیمی موجود در مغز استخوان که بخش غیرخون ساز مغز استخوان می-باشند، طی پیوند قادر به قرارگیری در بافت‌های ماهیچه، استخوان، مغز، ریه، قلب، کبد، مسیر معدی-روده ای و بافت‌های خون ساز می‌باشند و حتی پس از تزریق به بلاستوسیست اولیه، می‌توانند در ایجاد انواع سلول‌های سوماتیک شرکت کنند [8].

[25] Neural stem cell(NSCs)

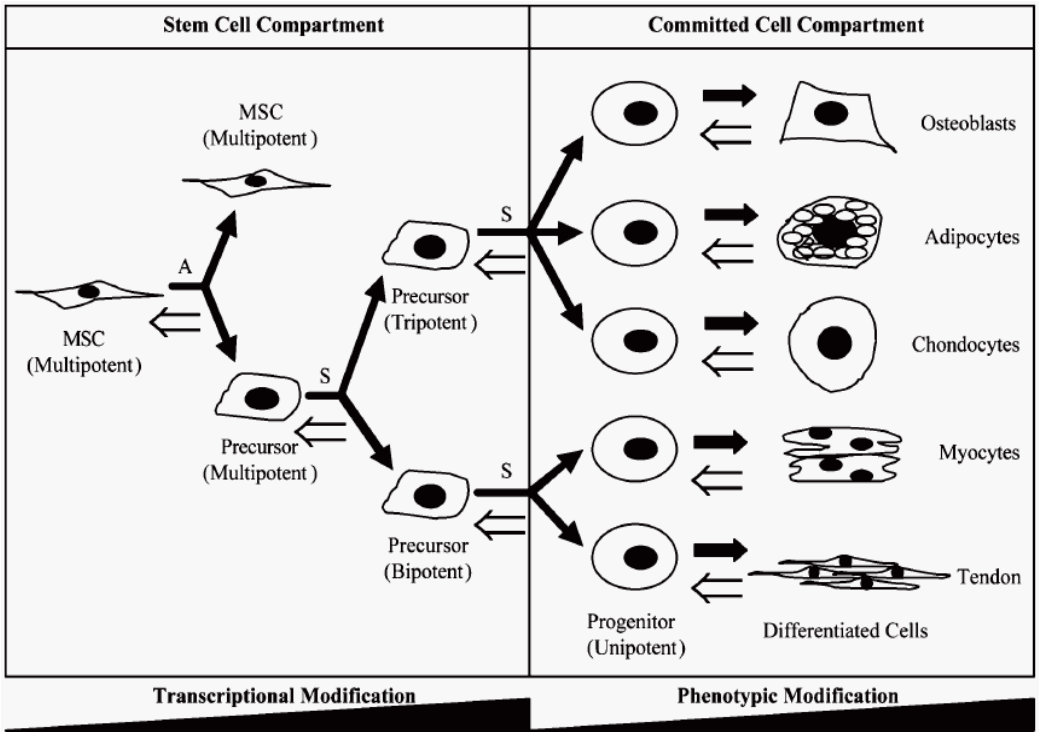
[26] Oval cells

[27] Plasticity

2-1 سلول‌های بنیادی مزانشیمی و ویژگی‌های آن

سلول‌های بنیادی مزانشیمی به عنوان سلول‌های چندتوان می‌باشند که توانایی تمایز به انواع مختلف از رده‌های سلولی مانند استئوبلاست‌ها، کندروسیت‌ها، ادیپوسیت‌ها و تنوسیت‌ها را دارند[45]. مطالعات مربوط به سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دهه 1970 برمی‌گردد. هنگامی که A.J Friedenstein و همکارانش، یک نوع سلول غیرخون ساز چسبنده را در مغز استخوان انواع مختلف گونه‌ها بیان کردند و این سلول‌ها قادر بودند کلونی‌های فیبروبلاستی را در In vitro شکل دهند[۵۰،۱۰]. این سلول‌ها به عنوان CFU-Fs نامیده شدند. بعدها مشخص شد که این سلول‌ها پتانسیل تمایزی به انواع سلول‌های بافت همبند و غیرهمبند همچون رده‌های کندروژنیک، ادیپوژنیک، استئوژنیک، هپاتوسیت‌ها، نورون‌ها و غیره را در In vito دارند. همچنین، هنگامی که در شرایط In vivo هم پیوند زده می‌شوند این ویژگی‌ها را حفظ می‌کنند [47،46]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی طی پیوند، قادر به استقرار در بافت‌های کبد، قلب، ریه، مغز، مسیر معدی روده‌ای و سیستم خون ساز می‌باشند [17].

سلول‌های بنیادی مزانشیمی طی روند تمایزی و قبل از کسب فنوتیپ اختصاصی دو مرحله را می‌گذرانند. یک مرحله تولید سلول‌های بنیادی و دیگری ایجاد سلول‌های متعهد. درتولید سلول‌های بنیادی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی چندتوان، از طریق تقسیم سلولی نامتقارن، جمعیت سلولی کم‌توان را ایجاد می‌کنند و سپس از طریق تقسیم سلولی متقارن، سلول‌های پیش ساز با ظرفیت خودنوزایی کمتر و پتانسیل تمایزی محدودتری ایجاد می‌شوند. در وضعیت سلولی متعهد شده، این سلول‌های پیش ساز سه یا دوتوانی تقسیم متقارن را ادامه می-دهند و سلول‌های زاینده دوتوانی یا تک‌توانی با ویژگی سلولی قبل از تعهد را ایجاد می‌کنند که در نهایت به سلول‌های کاملاً تمایز یافته تبدیل می‌شوند (تصویر 1-1)[48].



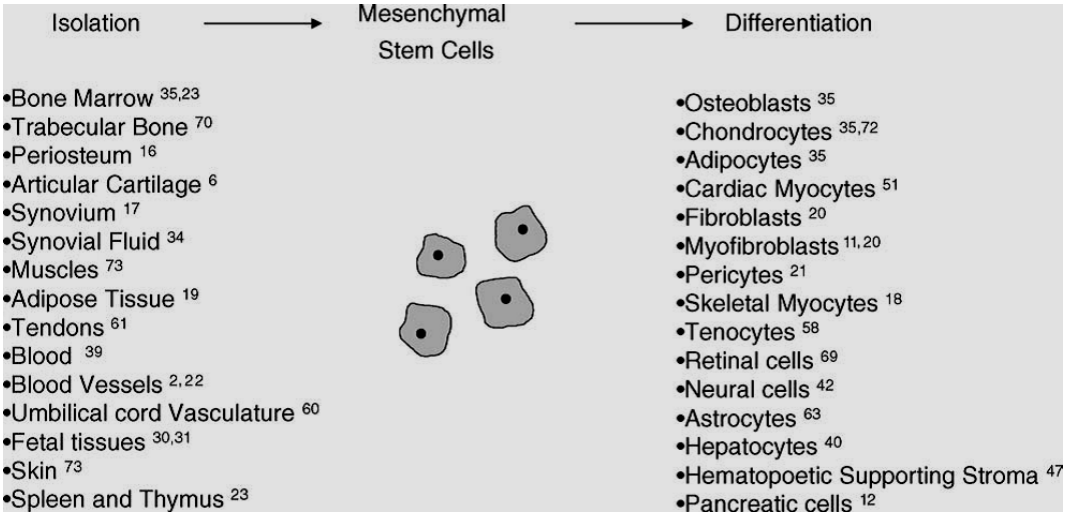
تصویر 1-1: روند تمایزی سلول‌های بنیادی بالغ مزانشیمی

یکی از راه‌های بررسی اثبات سلول‌های بنیادی مزانشیمی این است که این سلول‌ها از نظر قابلیت تمایز به استئوبلاست‌ها، ادیپوسیت‌ها و کندروسیت‌ها در In vitro مورد ارزیابی قرار گیرند. برای نشانگرهای CD71، CD105، CD73، CD90 (Thy-1)، مثبت و برای CD45، CD34 و CD11b منفی باشند [۴۹،۱۱]. از دیگر نشانگرهای شناسایی این سلول‌ها CD144، CD166، CD115، CD29، Sca-1 و Stro-1 می‌باشند و به عنوان نشانگرهای اختصاصی این سلول‌ها در نظر گرفته می‌شوند [15]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی با اصطلاحات زیادی مانند Marrow stromal cells، Multipotent stromal cells، Mesenchymal stromal cells، Colony-forming unit fibroblasts[28]، Bone marrow stromal stem cells[۲۹]، Stromal precursor cells[۳۰]، Multi-potent adult progenitor cells[31] نام‌گذاری می‌شوند [15].

سلول‌های بنیادی مزانشیمی در بافت‌های مختلفی مستقرند و توانایی و ظرفیت تمایزی چندتوان را در شرایط In vitro دارند [15]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی از منابع بافتی مختلفی

[28] CFU-Fs
[29] BMSSCs
[30] SPCs
[31] MAPCs

مانند مغز استخوان، بافت چربی، غشا سینوویال، ماهیچه اسکلتی، درم، پری سیت، استخوان ترابکولار، بندناف انسانی، ریه، مایع آمنیوتیک، کبد جنینی و حتی خون محیطی قابل جداسازی می‌باشند(تصویر 1-2) [8]. هرچند سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از بافت‌های مختلف ویژگی‌های مشترکی دارند اما تفاوت‌هایی را از نظر فنوتیپی، تکثیر و توانایی تمایزی از خود نشان می‌دهند که احتمالاً این تفاوت در آن‌ها به اثرات ریزمحیط اطراف این سلول‌ها بر می-گردد [15].



تصویر 1-2: منابع استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی و انواع سلول‌های مشتق از آن‌ها

از بین این منابع ذکر شده، مغز استخوان یکی از در دسترس ترین منبع جداسازی برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد [49]. سلول‌های استرومایی مغز استخوان شامل جمعیت ناهمگنی از سلول‌ها مانند سلول‌های رتیکولار آندوتلیال، فیبروبلاست‌ها، ادیپوسیت‌ها و سلول-های زاینده استئوژنیک می‌باشند که فاکتورهای رشد خون ساز را ایجاد می‌کنند و برهم کنش سلول- سلول را تسهیل کرده و پروتئین‌های ماتریکس را که نقش اصلی را در تنظیم خون سازی دارند، می‌سازند [50، 51، 52]. در حقیقت سلول‌های بنیادی مزانشیمی موجود در مغز استخوان یک نیچ یا کنام را برای سلول‌های بنیادی خون ساز تشکیل می‌دهند و با ایجاد ریز محیط کوچک برای این سلول‌ها، اثرات تنظیمی مثبت و منفی بر خودنوزایی، تکثیر و تمایز سلول‌های زاینده و بنیادی خون ساز می‌گذارند [15].

سلول‌های بنیادی مزانشیمی در طی آسیب بافتی فاکتورهای محلولی را ترشح می‌کنند که از نظر عملکردی ریزمحیط بافتی را تغییر داده و ترمیم بافت آسیب دیده را تحت تأثیر قرار می‌دهند. فاکتورهای محلولی که توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی در شرایط آسیب بافتی ترشح می‌شوند شامل HGF، TGF[32]، IL1، IL-1β، IL-3، IL-6، IL-7، IL-11 و SCF است. این فاکتورها در نهایت باعث افزایش توانایی بافت آسیب دیده برای تکثیر و تمایز سلول‌های زاینده درونی موجود در بافت می‌شوند. از طرفی عکس‌العمل‌های ایمنی و التهابی را نیز کاهش می‌دهند [18].

سلول‌های بنیادی مزانشیمی سلول‌های ایمونوژنیک ضعیفی هستند و عملکردهای سلول‌های کشنده طبیعی، سلول‌های B و سلول‌های T را متوقف می‌کنند و بر فعالیت سلول‌های دندرتیک هم اثر می‌گذارند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی انواعی از فاکتورهای رشد، سیتوکین‌ها، کموکین‌ها و پروتئازها را تولید می‌کنند که این عوامل نقش مهمی را در تعدیل ایمنی و مهاجرت سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی قادر به بیان گیرنده‌های کموکینی هستند که این گیرنده‌ها در نهایت اجازه مهاجرت آن‌ها را به بافت‌های آسیب دیده می‌دهند. در حقیقت این سلول‌ها در شرایط In vivo توانایی مهاجرت را به مکان‌های آسیب، التهاب و تومور دارند [53].

این ویژگی‌های ذکر شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، آن‌ها را به عنوان سلول مناسبی برای کارهای درمانی، ترمیم، سلول درمانی و مهندسی بافت مطرح می‌سازد. استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به طور اتولوگ، از لحاظ پاسخ‌های ایمنی خطرات پس‌زدن پس از پیوند را ندارند و تومورزا نیز نمی‌باشند، علاوه بر این، مشکلات استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی را هم ندارند [15].

1-2-1 تعدیل پاسخ ایمنی توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی

سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بسیاری از بافت‌های بالغ به خصوص مغز استخوان و بافت چربی قابل جداسازی می‌باشند. هم‌راستا با توانایی این سلول‌ها در تمایز به سلول‌های رده

[32] Transforming growth factor

مزودرمی مانند ادیپوست‌ها، استئوبلاست‌ها و کندروسیت‌ها، این سلول‌ها توانایی تعدیل ایمنی[33] و مهار پاسخ ایمنی[34] را نیز دارند [19].

مطالعات زیادی ویژگی و عملکرد مهار پاسخ ایمنی سلول‌های بنیادی را هم در In vivo و In vitro نشان داده است. روند مهار پاسخ ایمنی توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی، نیازمند فعال‌سازی اولیه این سلول‌ها توسط سلول‌های ایمنی و به وسیله ترشح سیتوکین التهابی اینترفرون گاما (IFNγ) [35] به تنهایی و یا به همراه TNFα[36]، IL-1α یا IL-β می‌باشد [54، 55]. نقش عامل IFNγ و رسپتور آن بسیار مهم است. اگر فرد پذیرنده پیوند فاقد اینترفرون گاما (IFNγ -) باشد به درمان توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی پاسخ نمی‌دهد. در موش‌های با نقص رسپتور IFNγ هم فعالیت مهار پاسخ ایمنی وجود ندارد [55].

مهار پاسخ ایمنی به وسیله MSCs، از طریق ترشح مولکول‌های محلولی می‌باشد که طی برهمکنش MSCs و سلول هدف تحریک می‌شوند و یا افزایش می‌یابند. از بین این فاکتورها، ایندول آمین 2و3 دی اکسیژناز[37] در انسان گزارش شده است [56، 57]. در حقیقت IFNγ با اتصال به رسپتور خود بر روی MSCs باعث تولید IDO از MSCs می‌شود [58]. در جوندگان، القا سنتز نیتریک اکسید[38] توسط MSCs نقش مهمی را در مهار تکثیر T-cell، بازی می‌کند [59]. نیتریک اکسید یک گاز فعال زیستی است که عملکرد T-cell و ماکروفاژها را تحت تأثیر قرار می‌دهد[55]. مکانیسم‌های متفاوتی از مهار پاسخ ایمنی در گونه‌های مختلف وجود دارد که IDO در MSCs انسانی و NO در MSCs موش نقش اصلی را بازی می‌کنند [60].

از دیگر عوامل مهم پروستاگلندین E2[39] می‌باشد که نقش مهمی را در فعالیت مهار پاسخ ایمنی MSCs بازی می‌کند. این عامل که محصول اسید آراشیدونیک است به عنوان مهارکننده ایمنی قوی می‌باشد و میتوز T-cell و تولید IL-2 را مهار می‌کند. این عامل یک کوفاکتور مهم برای القا فعالیت لنفوسیت T کمکی نوع 2[40] می‌باشد. تولید PGE2 توسط MSCs باعث مهار

---

[33] Immunomodulatory
[34] Immunosuppression
[35] Interferon γ
[36] Tumor necrosis factor alpha
[37] IDO
[38] NO
[39] PGE2
[40] T-Helper type 2

T-cell می‌شود و مهار این عامل توسط مهارکننده‌ها نتیجه اش برگشت تکثیر لنفوسیت T می-باشد [61]. PGE2 تولید شده توسط MSCs اثر خود را بر روی مونوسیت‌ها به وسیله بلوکه کردن روند تمایزی‌شان به سمت سلول‌های دندریتیک می‌گذارد [62 ، 63].

از دیگر فاکتورهای مترشحه از MSCs، IL-6 می‌باشد که در مهار تمایز مونوسیت به سلول‌های دندریتیک[41] شرکت دارد[64]. موازی و هم‌راستا با این روند، ترشح Il-6 توسط MSCs آپوپتوز لنفوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها را به تأخیر می‌اندازد [65 ، 66] ساخت $HLA\text{-}G_5$ توسط MSCs نشان‌داده که تکثیر T-cell ($CD4^+$ و $CD8^+$) را متوقف کرده و ایجاد T-cell تنظیمی[42] را پیشرفت می‌بخشد [67 ،68]. تماس بین MSCs و T-cellهای فعال شده، تولید IL-10 را تحریک می‌کند که این عامل، یک کوفاکتور اصلی برای تحریک آزادسازی $HLA\text{-}G_5$ محلول می‌باشد. در واقع تعدیل ایمنی به واسطه MSCs نتیجه عملکردی مولکول‌های متعددی است. MSCs با اینکه تکثیر لنفوسیت‌های T را در فاز G0/G1 سیکل متوقف می‌کنند اما باعث آپوپتوز آن ها نمی‌شوند. علاوه بر این باعث متوقف شدن اثر سیتوتوکسیسیتی لنفوسیت‌های T و باعث القا سلول‌های T_{REG} یا سلول‌های آنتی- التهابی می‌شوند [69 ،70].

MSCs اثر مهاری خود را بر روی تمایز نهایی لنفوسیت‌های B انجام می‌دهند، که این عمل را از طریق آزادسازی فاکتورهای خونی اجرا می‌کنند. MSCs با اینکه تکثیر لنفوسیت‌های B را در فاز Go/G1 سیکل سلولی متوقف می‌کنند، اما زنده ماندن این سلول‌ها را نیز افزایش می-دهند [71 ،72]. MSCs تکثیر و تمایز سلول‌های B نابالغ را به سمت سلول‌های مترشحه ایمونوگلوبین ترغیب می‌کند و به طور قوی تکثیر و تمایز جمعیت‌های سلول‌های B را به سمت سلول‌های پلاسمایی تقویت می‌کند [73].

سلول‌های دندریتیک سلول‌های ارائه دهنده آنتی ژن بالقوه‌ای هستند که در القا تحمل، مقاومت و ایمنی نقش مهمی دارند. طی بلوغ، سلول‌های دندرتیک نابالغ نیازمند بیان مولکول-های کمک تحریکی و افزایش بیان مولکول‌های MHC کلاس I و II به همراه دیگر مارکرهای سطحی‌شان مانند CD11c، CD80، CD83 می‌باشند. سلول‌های MSCs، از طریق کاهش بیان MHC کلاس II و مولکول های کمک تحریکی سطح سلولی، بلوغ مونوسیت‌ها و بلوغ سلول-های زاینده خون ساز را به سمت سلول‌های دندریتیک کاهش می‌دهند [61، 74، 75]. این اثرات به وسیله ترشح IL-6 توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی فعال شده [64 ، 74] و یا

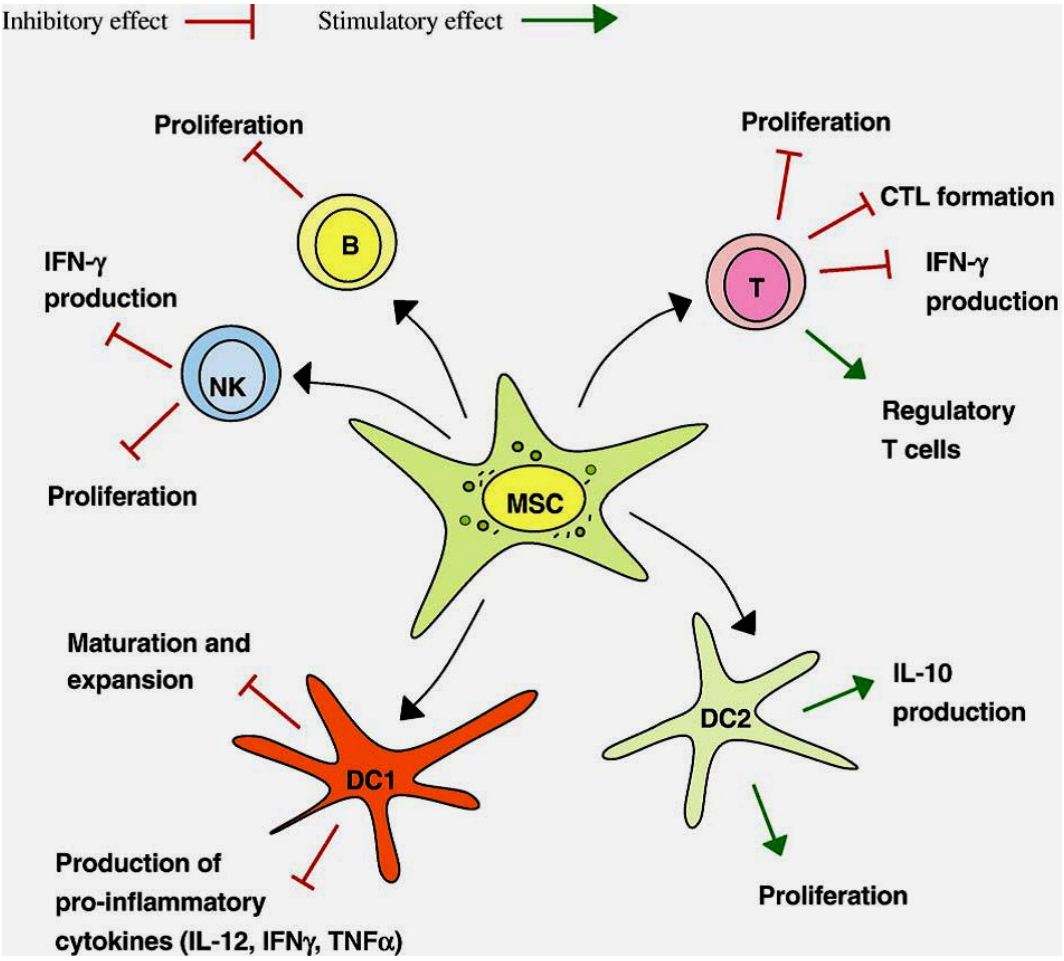
[41] Dendritic cells (DCs)

[42] T_{REG}

توسط PGE2 که مستقیماً مسئول متوقف کردن بلوغ سلول‌های دندرتیک هستند انجام می‌شود [63].

با توجه به ویژگی‌های ذکر شده، MSCs عملکرد سلول‌های ایمنی زیادی را متوقف می‌کنند (تصویر 1-3). مانند توقف تکثیر لنفوسیت‌های T و ممانعت از بلوغ DCs. همچنین باعث القا سلول‌های T_{REG} (سلول های آنتی-التهابی) نیز می‌شوند و طی این روند مکانیسم‌های دخیل در فرآیند تعدیل ایمنی توسط MSCs، شامل ترشح IDO، PGE2، نیتریک اکسید و HLA-G5 می‌باشند [19].

همه این موارد ذکر شده از MSCs، آن‌ها را برای درمان انواع بیماری‌ها اعم از بیماری‌های خودایمنی مناسب ساخته است. ویژگی تحریک ایمنی ضعیف این سلول‌ها در شرایط In vivo و In vitro، امکان استفاده آلوژنیک از این سلول‌ها را در شرایط بالینی حاد فراهم کرده است [19].



تصویر 1-3: تأثیرات سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر سیستم ایمنی

DC1 : سلول‌های دندریتیکی مونوسیتی بالغ

DC2 : سلول‌های دندریتیکی پلاسماسیتوئیدی بالغ

2-2-1 کاربرد سلول‌های بنیادی مزانشیمی در شرایط In vitro و In vivo

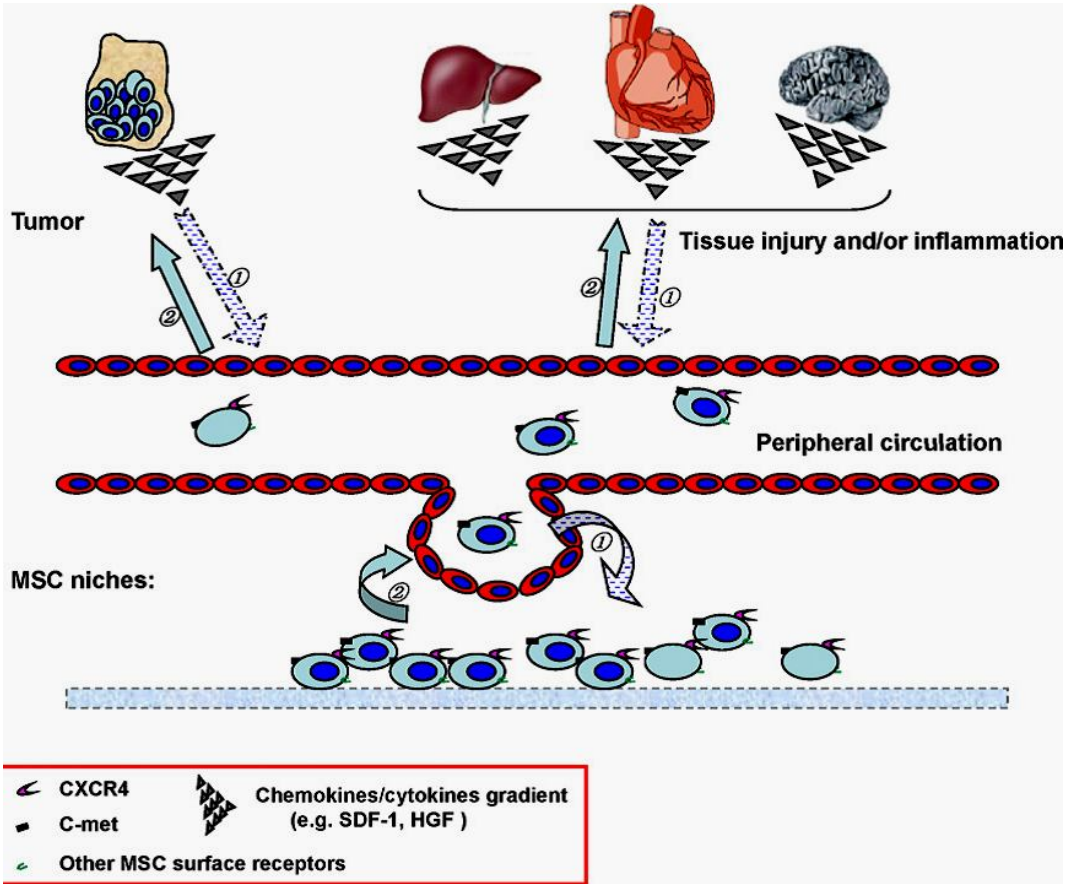
مطالعات In vivo در انواعی از مدل‌های حیوانی نشان داده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی در ترمیم و تجدید بافت‌های آسیب دیده مانند استخوان، غضروف، مغز، میوکارد، کبد و ... نقش دارند. مشارکت MSCs در ترمیم بافت‌های آسیب دیده به بیان فاکتورهای رشد، کموکین‌ها و گیرنده‌های ماتریکس خارج سلولی روی سطح آن‌ها بر می‌گردد [76،15].

ارزیابی کموتاکسی نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت شده در شرایط In vitro به سمت فاکتورهای رشد مختلف و کموکین‌ها مهاجرت می‌کنند و این مهاجرت وابسته به کموکین‌ها، توسط سیتوکین التهابی TNFα القا می‌شود [77].

از دیگر مکانیسم‌های مهاجرت و استقرار سلول‌های بنیادی مزانشیمی اتصال به آندوتلیوم می باشد. سلول‌های آندوتلیالی تحت شرایط آسیب فعال می‌شوند و این حالت همراه با بیان مولکول‌های سطحی‌ای می‌باشد که استقرار و اتصال سلول‌های در حال گردش را بر روی سلول‌های آندوتلیالی موجب می‌شوند. دو مولکول عمده از این گروه شامل VCAM-1[43] و E- selectin می‌باشند و سلول‌های بنیادی مزانشیمی از طریق مولکول‌های سطحی خود شامل CD_{49d} و CD_{44} به این لیگاندها اتصال می‌یابند [78، 79].

[43] Vascular cell adhesion molecule1

غیر از این عوامل ذکر شده، دو عامل اصلی دیگر برای مهاجرت سلول‌های بنیادی مزانشیمی، SDF-1 و گیرنده آن CXCR4 می‌باشد. طی آسیب، گرادیانتی از کموکین‌ها و سیتوکین‌هایی مانند SDF-1[44]، HGF از بافت‌های آسیب دیده و مناطق توموری آزاد می‌شود که بقا، تکثیر و مهاجرت سلول‌های بنیادی مزانشیمی را افزایش می‌دهند و باعث مهاجرت این سلول‌ها به مناطق آسیب و التهاب می‌شوند (تصویر 1-4) [80، 81].



تصویر1- 4: نمایش مهاجرت سلول‌های بنیادی مزانشیمی به مناطق آسیب، التهاب و تومور طی روند ترمیم بافت. ترشح سایتوکین‌ها از بافت‌های آسیب دیده وناحیه توموری سبب افزایش بقا، تکثیر و مهاجرت سلول-های بنیادی مزانشیمی می‌شود.

نقش سلول‌های بنیادی مزانشیمی در درمان بسیاری از بیماری‌ها اثبات شده است. در بررسی‌های انجام شده بر روی این سلول‌ها در بیماری‌های قلبی و در شرایط In vivo، سلول-های بنیادی مزانشیمی آندوژن و داخلی به اندازه سلول‌های بنیادی مزانشیمی خارجی و

[44] Stromal-derived factor 1 alpha

اگزوژن در ترمیم قلب شرکت کردند. سلول‌های مهاجر نه تنها به انواع سلول‌ها مانند میوسیت های قلبی و سلول های آندوتلیال عروق تمایز یافتند، بلکه انواعی از فاکتورهای میتوزی، آنتی-آپوپتوزی و آنژیوژنیک را نیز ترشح کردند[82]. همچنین در شرایط In vitro نیز وقتی سلول-های استرومایی مشتق از مغز استخوان در معرض 5-آزاسیتیدین قرار گرفتند، توانستند ژن‌های ویژه میوسیت‌های قلبی را همانند میوسیت‌های قلبی تکوین یافته در In vivo بیان کنند[83].

همچنین وقتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در شرایط In vivo به صورت داخل مغزی در موش دچار نقص اسید اسفنگومیلیناز تزریق شدند، ناهنجاری‌های نورولوژیکی به تأخیر افتاد و بر طول عمر حیوان اضافه شد[84] و هیچ نوع توموری مشتق از سلول‌های دهنده در این مدل‌های حیوانی مشاهده نشده است. در حالیکه با پیوند سلول‌های بنیادی جنینی تمایز نیافته، پیشرفت تراتوما گزارش شده است [4]. پیوند آلوژنیک MSCs در کودکان دچار بیماری استئوژنزیس ایمپرفکتا[45] نوع III، افزایش 44 تا 77 درصد در حجم ماده معدنی استخوان و در نهایت رشد طولی و کاهش مقدار شکستگی در این بیماران را نشان داد[85 و86].

سلول‌های بنیادی مزانشیمی در بیماری و آسیب کبدی مزمن هم مورد بررسی قرار گرفتند و با پیوند MSCs، آسیب کبدی مزمن و فیبروز کاهش یافت[87].

سلول‌های بنیادی مزانشیمی در شرایط In vitro می‌توانند برای مقاصد درمانی مورد استفاده قرار گیرند. بطور مثال فعالیت استئوژنیک نیازمند شرایطی مانند وجود β- گلیسرول- فسفات، اسکوربیک اسید 2- فسفات و دگزامتازون می‌باشد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی در حضور چنین مکمل‌هایی مورفولوژی استئوبلاستی را به همراه افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز و تولید ماتریکس خارج سلولی غنی از کلسیم نشان می‌دهند. هم‌چنین MSCs طی تمایز به رده کندروژنیک نیازمند شرایطی مانند وجود اعضا خانواده TGF-β3 یا BMPs می‌باشند. سلول‌های مزانشیمی در چنین شرایط کشتی، شروع به بیان ماتریکس خارج سلولی ویژه سلول‌های غضروفی می‌کنند و مورفولوژی سلول‌های غضروفی را نشان می‌دهند[88].

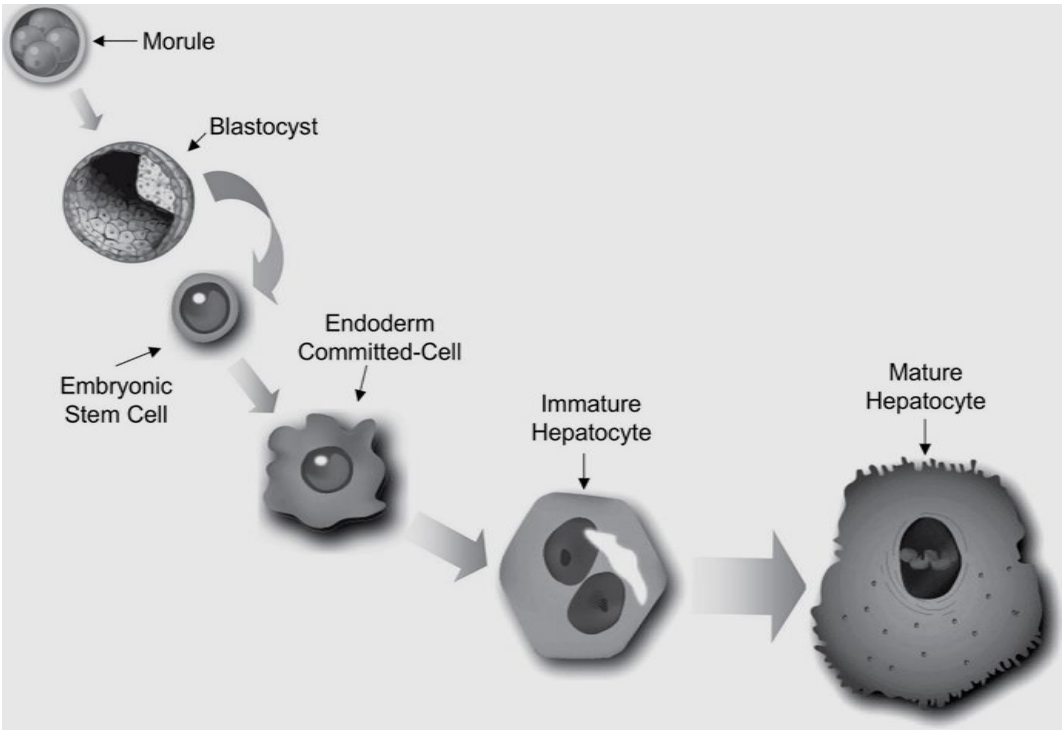
مطالعات نشان داده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان می‌توانند طی پیوند در In vivo به هپاتوسیت‌ها تکوین یابند[89]. این سلول‌ها حتی در شرایط In vitro نیز وقتی در حضور فاکتورهایی مانند HGF، FGF-4 قرار می‌گیرند به هپاتوسیت‌های عملکردی تمایز می‌یابند[90، 91، 92]. هپاتوسیت‌های فانکشنال ایجاد شده در شرایط In vitro عملکردهای

[45] Osteogenesis imperfecta III

هپاتوسیت‌ها مانند تولید آلبومین، ذخیره گلیکوژن، ترشح اوره و جذب LDL را نشان دادند[93]. در نهایت ایجاد شرایط کشت مناسب برای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به رده‌های خاص سلولی، این توانایی را به این سلول‌ها می‌دهد که به عنوان منبع مهم و سودمندی در درمان بسیاری از بیماری‌ها باشند[89].

3-1 تکوین کبد

طی روند گاسترولاسیون، لایه آندودرم به بافت‌های روده ای، ریه، پانکراس و کبد تمایز می-یابد (تصویر 1-5) [94].



تصویر1- 5 : تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های شبه هپاتوسیتی طی تکوین جنین

در موش، در روز هشتم جنینی، هنگامی که دیواره شکمی آندودرمی در مجاورت قلب در حال تکوین قرار می‌گیرد، سلول‌های بنیادی آندودرمی شروع به تکثیر می‌کنند[95،96،97]. تخصصی شدن سلول‌ها به سمت رده سلول‌های اپتلیالی کبدی در روز 8/5 جنینی اتفاق می

افتد و نیازمند سیگنال FGF[46] از مزودرم قلبی[98] و سیگنال BMP[47] از مزانشیم دیواره عرضی[48][99] می‌باشند. در روز 9-9/5 این سلول‌ها شروع به بیان GATA4، HNF4α و ژن-های ویژه کبدی مانند آلبومین[49](Alb) و آلفا فتوپرتئین[50] (AFP) می‌کنند[100،97].

سلول‌های ویژه کبدی در این شرایط به عنوان هپاتوبلاست هستند و به طور مجتمع و زیاد تکثیر می‌کنند و به مزانشیم دیواره عرضی حمله می‌کنند. مزانشیم دیواره عرضی شامل سلول-های ستاره‌ای و سلول‌های اندوتلیایی سینوزوئیدی می‌باشند. این سلول‌ها انواعی از سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد مانند EGF[51]، FGF، HGF، TGFβ، TNFα، IL6 که در تکوین کبد نقش دارند را ترشح می‌کنند. این فاکتورها در ترمیم کبد و پاسخ تکثیری برای ایجاد هپاتوسیت‌ها هم ترشح می‌شوند[101،97]. در موش صحرایی در روز 11 جنینی، کبد مکان اصلی خون سازی است و با مهاجرت سلول‌های بنیادی خون ساز به جوانه کبدی حجم وسیعی از توده کبدی را سلول‌های خونی تشکیل می‌دهند تا ساختار کبدی را به عنوان اندام ابتدایی خون ساز شکل دهند. هپاتوبلاست‌ها گسترش می‌یابند و شروع به بیان آلکالین فسفاتاز جفتی، پروتئین-های فیلامنتی حد واسط، CK14[52] ، CK18[53] ، CK8[54] ، گاما-گلوتامیل ترانس پپتیداز[55] ، α-آنتی تریپسین[56] ، گلوتامیلS-ترانسفرازP[57] ، ایزوفرم‌های جنینی آلدولاز، لاکتات دهیدروژناز و پیرووات کیناز ماهیچه‌ای[58] می‌کنند[103،102]. پیش از روز 16 جنینی هپاتوبلاست‌ها به دو دودمان کلانژیوسیت‌ها و هپاتوسیت‌ها انشعاب می‌یابند[105،104،100]. تمایز به سمت دودمان کلانژیوسیتی توسط سیگنال Notch به جلو می‌رود و توسط HGF منع می‌شود و انکوستاتین M باعث پیشرفت به سمت تمایز هپاتوسیتی می‌شود[106] . بعد از روز 16 جنینی تغییر انبوهی در نحوه بیان ژن سلول‌های اپیتلیالی به سمت فنوتیپ تمایزیافته صورت می-

[46] Fibroblast growth factor
[47] Bone morphogenic protein
[48] Septum transversum
[49] Albumin
[50] Alpha-fetoprotein
[51] Epidermal growth factor
[52] Cytokeratin 14
[53] Cytokeratin 18
[54] Cytokeratin 8
[55] GGT
[56] α-AT
[57] GST
[58] M2-PK