مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال دوم، شماره اول، بهار ۱۳۹۲ (۳۱-۲۵)

جداسازی و شناسایی سلول‌های بنیادی اندومتر رحم انسان و بررسی قدرت تمایزی آنها به رده‌های مختلف سلولی

سمیه ابراهیمی باروق[۱]*، جعفر آی[۲]، هما محسنی کوچصفهانی[۳]
۱. دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل، باشگاه پژوهشگران جوان، اردبیل
۲. دانشگاه خوارزمی، دانشکده زیست شناسی، گروه علوم زیستی، تهران
۳. دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده فناوریهای نوین پزشکی، گروه مهندسی بافت، تهران

(تاریخ دریافت: ۹۱/۴/۴، تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۹/۱۰)

چکیده
لایه اندومتریال رحم شامل جمعیتی از سلول‌ها است که خاصیت خود نوزایی داشته و ویژگی‌هایی شبیه سلول‌های بنیادی مزانشیمی را نشان می دهند. در این مطالعه هدف بررسی توان تمایزی سلول‌های بنیادی اندومتریال به رده‌های مختلف سلولی می‌باشد. سلول‌های اندومتریال از نمونه‌های بافتی بدست آمده از رحم انسان به صورت آنزیمی جداسازی شده و در محیط کشت DMEM/F12 حاوی ۱۰٪ سرم کشت داده شدند. بعد از پاساژ سوم سلول‌ها برای اثبات بنیادی بودن با مارکرهای CD105, CD90, CD146, CD31, CD34 مورد آنالیز با فلوسایتومتری قرار گرفتند. سپس قدرت تمایزی سلول‌ها به استخوان، چربی و نورون و اندوتلیال به مدت ۲۱ روز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج فلوسایتومتری نشان داد که سلول‌ها نسبت به مارکرهای CD105,CD90,CD146 مثبت و نسبت به مارکرهای CD31 و CD34 منفی می‌باشند. رنگ آمیزی با Oil Red O و Alizarin Red نشان‌دهنده تمایز سلول‌ها به چربی و استخوان بود. بررسی های ایمنوسیتوشیمی نیز بیان مارکرهای عصبی نستین، MAP2 در سلول‌های عصبی و فلوسایتومتری CD31 را نشان داده و این نشان‌دهنده بیان آن در سلول‌های اندوتلیالی تمایز یافته از سلول‌های بنیادی اندومتریال رحم است. این سلول‌ها به نظر می‌رسد که می‌توانند یک منبع سلولی را ایجاد کنند که برای مطالعات فرایندهای تمایز سلولی و سلول درمانی مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی اندومتریال، آدیپوسیت، استئوبلاست، نورون، سلول‌های اندوتلیال

Isolation and Characterization of Human Endometrial Stem Cells and Evaluation of their Differentiation Potential

S. Ebrahimi-Barough[1]*, J. Ai[2], H.M. Kouchesfehani[3]
1. Islamic Azad University, Ardebil Branch, Young Researchers Club, Ardebil, 2. Khwarizmi University, Faculty of Biology, Department of Biological Sciences, Tehran
3. Tehran University of Medical Sciences, School of Advanced Technologies of Medicine, Department of Tissue Engineering

(Received: Jue. 24, 2012; Accepted: Dec. 1, 2013)

Abstract
Human endometrial stem cells (hEnSCs) contain a cell population that are capable of self-renewal and show similar properties to mesenchymal stem cells. The aim of this research is to show that these cells can differentiate to different cell lineages. In this study, endometrial tissue obtained from patients cells were extracted enzymaticaly. The released cells were cultured in DMEM/F12 with 10% FBS. The flow cytometry analysis was done for CD105, CD90, CD146, CD31 and CD34 in the third passage. The adipogenic, osteogenic, neurogenic and endothelial differentiation was evaluated in the third passage after 21 days of induction with differentiation media. The flow cytometry analysis showed that EnSCs were positive for CD90, CD105 and CD146 and were negative for CD31 and CD34. Moreover, results showed that the hEnSCs can differentiate to osteocyte and adipocyte. This was confirmed by alizarin Red and oil-Red O staining. Immunocytochemistry assey show that the markers including Nestin, MAP2 and CD31 has been expressede in differentiated cells into neuron and endothelial. Results showed that hEnSCs appear to be able to provide a source of different kinds of cells that will be able to be used to further study the cellular differentiation processes and cell therapy.

Keywords: Endometrial stem cells, Adipocyte, Osteoblast, Neuron, Endothelial cells

* نویسنده مسئول: سمیه ابراهیمی باروق Email: s_ebrahimi100@yahoo.com

مقدمه

سلول بنیادی سلولی است که دارای توان خود نوزایی self-renewal بوده و ظرفیت تولید انواع سلول‌های دیگر را دارد. به طور کلی از لحاظ منشا، سلول‌های بنیادی دارای دو منشا جنینی و بزرگسال هستند (Fuchs and Segre, 2000). سلول‌های بنیادی بالغین که در بسیاری از بافت‌های تخصصی بدن از جمله مغز، مغز استخوان، کبد، پوست، لوله گوارش، قرنیه و شبکه چشم و حتی پالپ عاج دندان نیز یافت می‌شوند، در بزرگسالان در هنگام جراحت و حتی در غیاب آن، به صورت مداوم فعال هستند (Lees *et al*., 2007; Edwards, 2004; Harris *et al*., 2007; De Coppi *et al*., 2007). قبلا دانشمندان فکر می‌کردند که سلول‌های بنیادی بزرگسالان، تنها سلول‌های همان بافت را ایجاد می‌کنند، اما امروزه معتقدند که این سلول‌ها می‌توانند به انواع دیگری از سلول‌ها نیز تبدیل شوند (Korbling and Estrov, 2003; Caplan, 2007). منبع جدیدی از سلول‌ها که امروزه مورد توجه قرار گرفته است سلول‌های بنیادی بدست آمده از اندومتریال رحم انسان می‌باشد (Chan *et al*., 2004; Gargett, 2006). اندومتریوم بافتی است که تغییر وضعیت دینامیکی داشته و حدود ۴۰۰ سیکل نوزایی و تمایز و خونریزی را در طی دوران باروری یک زن متحمل می‌شود. فعالیت‌های مداوم و منظم استروژن و پروژسترون این تغییر وضعیت را اداره می‌کنند تا اندومتریوم پذیرای بلاستوسیت کاشته شده در یک دوره باشد (Du and Taylor, 2010). اندومتریوم رحم انسان دارای استرومای پرعروقی است که در شرایط فیزیولوژیک طبیعی، بیشتر از سایر بافت‌های بدن رژنره شده و معمولاً لایه‌های فانکشنال فوقانی آن در مدت خونریزی ماهانه زنان کنده شده و مجدداً توسط لایه بازال تحتانی بازسازی می شود (Cervello and Simon, 2009). امروزه حضور سلول‌های بنیادی در لایه‌های مختلف رحم با استفاده از شناسایی مارکرهای مختلف، بخصوص CD146 به اثبات رسیده است (Cervello and Simon, 2009) و علاوه بر جداسازی این سلول‌ها، خاصیت آنژیوژنزیز نیز در آنها دیده شده است (Gargett, 2007). سلول‌های بنیادی / اجدادی بزرگسال مسئول نوزایی cell Progenitor Adult stem/ اندومتریوم می‌باشند (Gargett *et al*., 2007)، این امر که سلول‌های بنیادی آندومتریال مسئول بازسازی لایه آندومتر رحم در هر سیکل قاعدگی می‌شود از سال‌ها پیش گزارش شده است اما تلاش برای جداسازی و شناسایی خصوصیات سلول‌های بنیادی آندومتریال فقط در طی چند سال اخیر طی آزمایشاتی پیگیری شده است (Meng *et al*., 2007). با توجه به اینکه سلول‌های بنیادی رحم می‌توانند به سلول‌های دیگری مانند نورون، چربی، استئوبلاست و الیگودندروسیت تبدیل شوند (Mobarakeh *et al*., 2012; Ebrahimi-Barough *et al*., 2013)، بر این اساس در این بررسی قدرت تمایزی سلول‌های بنیادی رحم به سلول‌های اندوتلیالی علاوه بر تمایز به رده‌های سلولی استخوان و چربی و نورون مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که این سلول‌ها دارای قدرت تمایز به سلول‌های چربی، استخوان و نورون و سلول‌های اندوتلیالی می‌باشد و امیدهای تازه‌ای را برای استفاده از این سلول‌ها در سلول درمانی ایجاد می‌کند.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی بوده و در آزمایشگاه مهندسی بافت دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی دانشگاه علوم پزشکی از تاریخ ۱۳۹۰-۱۳۹۱ به انجام رسیده است. مواد شیمیایی مورد استفاده عبارت بودند از:

DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's F12 Medium, Gibco12500062), FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco 10270-106), Pen/strep (15070-063 GIBCO, 100U/ml), Trypsin/ EDTA 0.025% (Gibco, 25300), Ascorbic acid-2-phosphate (sigma, A8960) Dexamethazone (sigma, D4902), Glycerol-2-phsphate (sigma, G9891), Alizarin red (sigma, A5533), Indomethacin (Sigma, I7378), Oil Red (Sigma. O0625), N2 (Gibco, 17502-048), L-Glutamine(Gibco, 25030), MEM NEAA (Gibco, 11140), Poly-L-Ornithine (sigma, P4957), Para-formaldehyde (sigma, 16500), bFGF (sigma, F0291), EGF (sigma, E9642), PDGF-AA (Gibco, PHG0035), VEGF (Gibco, PHC9391), CD 105 (Abcam, ab53318), CD90 (eBioScience, 11-0909-71), CD146 (eBioScience, E033746), CD31 (Chemicon MAB3402), CD34 (Gibco, 11-034941) Nestin (Sigma, T5293), MAP2 (Abcam, ab11267) Goat anti-mouse IgG FITC (chemicon, AP308F), Triton X100 (9002-93-1).

جداسازی سلول‌های بنیادی اندومتریال رحم و فلوسایتومتری

در این مطالعه از سلول‌های بنیادی اندومتریال رحم انسان استفاده شد. نمونه بافت اندومتر از رحم بیمارانی که برای درمان نازایی به بیمارستان ولیعصر امام خمینی مراجعه کرده بودند با رضایت خود فرد اهدا کننده بدست آمد. تکه‌های بافت

اندومتریال در مایع Hanks قرار گرفته و به آزمایشگاه کشت سلول منتقل شدند و توسط بافر فسفات سالین PBS حاوی آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین، استرپتومایسین ۱٪) شستشو داده شدند. سپس نمونه‌ها در محلول کلاژناز نوع I با غلظت ۲mg/ml به مدت ۲ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷°c و ۵٪ CO_2 برای هضم بافتی قرار گرفته شدند. پس از هضم بافت، برای حذف تکه‌های بافتی هضم نشده و ناخالصی‌های موجود فیلتراسیون توسط فیلترهای ۷۰ µm و ۴۰µm انجام شد. سپس برای حذف سلول‌های تک هسته‌ای از نمونه از فایکول استفاده گردید. سلول‌های جدا شده به محیط کشت DMEM/F12 حاوی ۱۵٪ سرم و پنی‌سیلین- استرپتومایسین منتقل شدند (Mobarakeh *et al*., 2012; Ebrahimi-Barough *et al*., 2013) و بعد از اینکه سلول‌ها، سطح ظرف کشت را به صورت یک لایه کاملاً پوشش دادند، پاساژ اول با استفاده از Trypsin-EDTA انجام شد. بعد از سومین پاساژ سلول‌ها از نظر ویژگی‌های تمایزی و مارکرهای سطح سلولی مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور شناسایی سلول‌های بنیادی اندومتریال رحم از روش فلوسیتومتری برای مارکرهای مزانشیمی CD105, CD90, CD146 و CD31 به عنوان مارکر سلول‌های اندوتلیالی و CD34 مارکر سلول‌های هماتوپوئیتیک استفاده شد. مراحل فلوسایتومتری برای آنتی‌ژن‌های اختصاصی سلول‌های اندومتریال به شرح زیر بود (لازم به ذکر است این آنتی‌ژن‌ها جزء آنتی‌ژن‌های سطح سلولی می‌باشند): سلول‌ها پس از شستشو با محلول شستشوی مخصوص فلوسایتومتری (شامل *PBS* و سرم ۱٪) به مدت ۳۰ دقیقه با پارافرمالدئید ۴٪ فیکس شدند. در مرحله بعدی با آنتی‌بادی‌های موردنظر که شامل CD105, CD90,CD146, CD31, CD34 و به صورت مستقیم به یک آنتی‌بادی ثانویه فلورسانس متصل بودند به مدت ۱ ساعت انکوبه شدند. بعد از فیکس مجدد سلول‌ها با پارافرمالدئید یک درصد، نمونه‌ها برای بررسی بیان مارکرهای سطحی توسط دستگاه فلوسایتومتری مدل Bectin Dekenson و نرم‌افزار Win MDI2/8 در موسسه رویان مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی توان تمایزی سلول‌های بنیادی اندومتریال رحم به سلول‌های چربی و استخوان

سلول‌ها بعد از پاساژ سوم برای بررسی توان تمایزی به سلول‌های چربی و استخوان آماده شدند. برای بررسی تمایز به سلول‌های چربی و استخوان سلول‌ها به تعداد cell/ml ۲۰۰۰۰ در ظرف ۲۴ خانه‌ای حاوی محیط DMEM/F12 و سرم ۱۰٪ کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت، محیط تمایز به چربی و استخوان به سلول‌ها اضافه گردید. محیط تمایز به چربی شامل DMEM/F12 حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آسکوربیک اسید ۳-فسفات، ۱۰۰ نانوگرم دگزامتازون و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر ایندومایسین و محیط تمایز به استخوان شامل DMEM/F12 حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسکوربیک اسید ۳-فسفات، ۱۰ نانوگرم دگزامتازون و ۱۰ میلی‌مولار بتا- گلیسرول فسفات بود. سلول‌ها به مدت ۲۱ روز در این محیط‌های القایی نگهداری شدند و محیط سلول‌ها در هر هفته سه بار تعویض گردید. به منظور نشان دادن نواحی تمایز یافته به سلول‌های چربی از رنگ‌آمیزی Oil Red استفاده شد در این رنگ‌آمیزی سلول‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با محلول ۰/۵ درصد Oil Red انکوبه شدند. نواحی که به سلول‌های چربی تمایز پیدا کرده بودند به علت واکنش تری‌گلیسیریدهای موجود در سلول‌های تمایزیافته با رنگ Oil red به رنگ قرمز در آمدند. برای اثبات تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوانی از رنگ‌آمیزی آلزارین رد استفاده گردید که برای این کار سلول‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در فرمالین ۱۰٪ فیکس و بعد به مدت ۱۵ دقیقه با رنگ آلزارین رد در دمای اتاق انکوبه شدند. بدین ترتیب سلول‌های تمایزیافته به استخوان به‌علت وجود رسوبات کلسیمی، در حضوراین رنگ به رنگ قرمز در می‌آیند (Ebrahimi-Barough *et al*., 2013).

بررسی توان تمایزی سلول‌های بنیادی اندومتریال رحم به سلول‌های عصبی

برای تمایز به سلول‌های عصبی سلول‌های بنیادی اندومتریال با غلظت cell/ml ۵۰۰۰۰ در ظرف ۲۴ خانه‌ای پوشیده شده با پلی - ال- اورنیتین منتقل شدند. بعد از ۲۴ ساعت به سلول‌ها محیط تمایزی عصب اضافه گردید این محیط شامل۴۰٪ محیط حاصل (Condition media) از سلول‌های نوروبلاستومای BE(2)-C (بدست آمده از موسسه پاستور) و ۶۰٪ شامل DMEM/F12+ N2 supplement +FGF2(20ng/ml) به مدت ۵ روز بود. بعد از ۶ روز، محیط سلول‌ها با محیط جدید که حاوی FGF2(20ng/ml) + EGF(20ng/ml) و Condition media با همان نسبت قبلی به مدت ۸ روز دیگر تعویض گردید. بعد از این دوره محیط جدید دیگر شامل FGF2 (20ng/ml)+ PDGF-AA (10ng/ml) و Condition media به مدت ۸ روز به سلول‌ها اضافه گردید. بعد از ۲۱ روز سلول‌ها برای بررسی ایمنوسیتوشیمی مارکرهای نستین و MAP2 با

پارافرمالدئید ۴٪ فیکس شدند. ایمنوسیتوشیمی به روش زیر انجام گردید: سلول‌ها با محلول پارافرماالدئید ۴٪ به مدت ۱۰ دقیقه تثبیت شدند، با محلول تریتون X100، ۰/۲٪ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نفوذپذیر شدند. بعد از این مرحله محلول بلاک‌کننده حاوی Goat serum ۵٪ در محلول بافر سالین به مدت ۳۰ دقیقه به سلول‌ها اضافه گردید. سپس آنتی‌بادی اولیه نستین (با غلظت ۱:۱۰۰)، MAP2 (با غلظت ۱:۲۰۰) به مدت ۲ ساعت به سلول‌ها اضافه گردید. آنتی‌بادی ثانویه Goat anti- mouse IgG FITC با غلظت ۱:۵۰۰ بر علیه آنتی‌بادی‌های اولیه اضافه گردید و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. هسته سلول‌ها با DAPI رنگ‌آمیزی گردید.

بررسی توان تمایزی سلول‌های بنیادی اندومتریال رحم به سلول‌های اندوتلیالی

برای تمایز به سلول‌های اندوتلیالی، سلول‌های اندومتر رحم بعد از پاساژ سوم با غلظت ۵۰۰۰۰ cell/ml در ظرف ۲۴ خانه‌ای با محیط کشت حاوی سرم ۱۰٪ به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس محیط القائی تمایز به اندوتلیال به سلول‌ها به مدت ۲۱ روز اضافه گردید. محیط تمایز شامل محیط کشت DMEM/F12 حاوی VEGF با غلظت ۵۰ ng/ml بود. سلول‌ها به مدت ۲۱ روز مورد تیمار قرار گرفتند. محیط کشت هر ۳ روز یکبار تعویض گردید. بعد از ۲۱ روز القا با محیط تمایزی سلول‌ها برای فلوسایتومتری مارکر اندوتلیالی CD31 با پارافرمالدئید ۴٪ فیکس شدند.

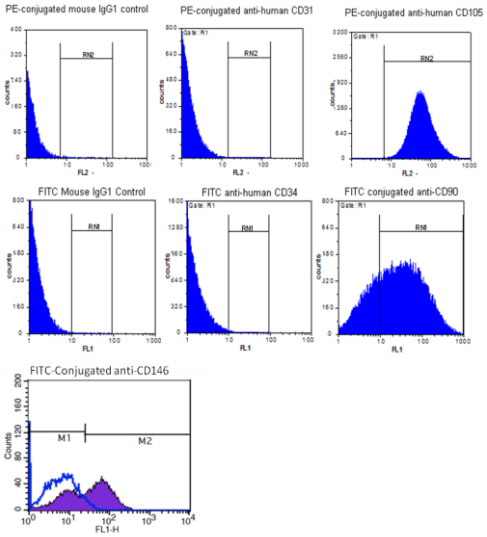
نتایج

نتایج مربوط به جداسازی سلول‌های بنیادی اندومتریال رحم و آنالیزهای فلوسایتومتری

از آنجایی که این سلول‌های بنیادی درصد کمی از جمعیت سلول‌های اندومتریال انسان را تشکیل می‌دهند، لذا این سلول‌ها در کشت‌های اولیه به صورت جمعیت ناخالص می باشند و تعدادی سلول‌های اندوتلیال و خونی نیز وجود دارند ولی در پاساژهای بعدی به صورت خالص در می‌آیند، در کلونی‌های خالص سلول‌های اندومتریال از لحاظ مورفولوژیکی شبیه به سلول‌های فیبروبلاستی و دوکی شکل می‌باشند (شکل۱). نتایج فلوسایتومتری نشان داد که این سلول‌ها بعد از پاساژ سوم نسبت به مارکرهای مزانشیمی CD105, CD90 و CD146 مثبت و نسبت به مارکر اندوتلیالی CD31 و هماتوپوئیتیک CD34 منفی می‌باشند (شکل ۲).

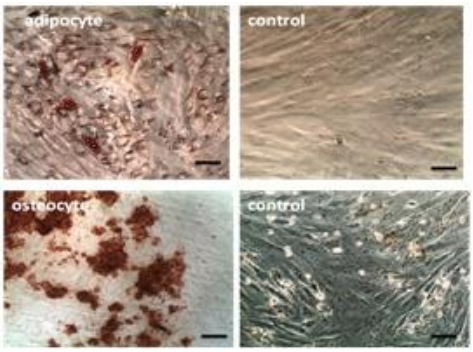
نتایج مربوط به تمایز سلول‌های بنیادی اندومتریال رحم به سلول‌های چربی و استخوان

پس از ۲۱ روز سلول‌های تیمار شده برای بررسی تمایز به سلول‌های چربی و استخوان، مورد رنگ‌آمیزی قرار گرفتند. نتایج رنگ‌آمیزی با Oil red برای سلول‌های چربی و آلیزارین رد برای سلول‌های تمایز یافته به استخوان نشان‌دهنده تمایز سلول‌های بنیادی اندومتریال در محیط القایی به چربی و استخوان به مدت ۲۱ روز بود. همان‌طور که در شکل ۳ دیده می شود سلول‌های تمایز یافته به سلول‌های چربی دارای قطرات چربی به شکل واکوئل‌های تجمع‌یافته در درون سیتوپلاسم سلول دیده می‌شوند. همچنین محل تشکیل ندول‌های استخوانی با رنگ‌آمیزی آلیزارین رد در سلول‌های تمایز یافته به استخوان قرمز شده است. نتایج در شکل ۳ آمده است.



شکل ۱. فتومیکروگراف از ظاهر مورفولوژیکی سلول‌های بنیادی اندومتریال بعد از پاساژ ۳. سلول‌ها ظاهر دوکی شکل داشته و شبیه سلول‌های فیبروبلاستی می‌باشند. (scale bar: 50µm)

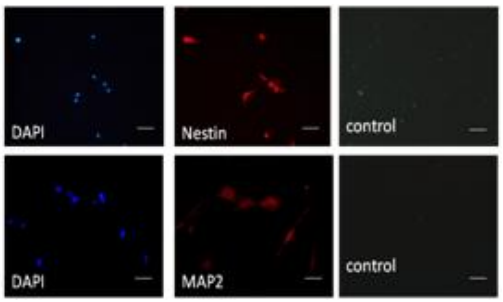
شکل ۲. آنالیز فلوسایتومتریک بیان مثبت CD90، CD105 و CD146 و بیان منفی CD31 و CD34 در سلول‌های بنیادی اندومتریال رحم



شکل ۳. پتانسیل تمایز سلول‌ها به چربی و استخوان. قطرات چربی در سلول‌های تمایز یافته به آدیپوسیت سلول با رنگ‌آمیزی اویل رد قرمز رنگ دیده می‌شوند. محل تشکیل ندول‌های استخوانی با رنگ‌آمیزی آلیزارین رد در سلول‌های تمایز یافته به استخوان قرمز شده است. (Scale bar: 50µm)

نتایج مربوط به تمایز سلول‌های بنیادی اندومتریال رحم به سلول‌های عصبی

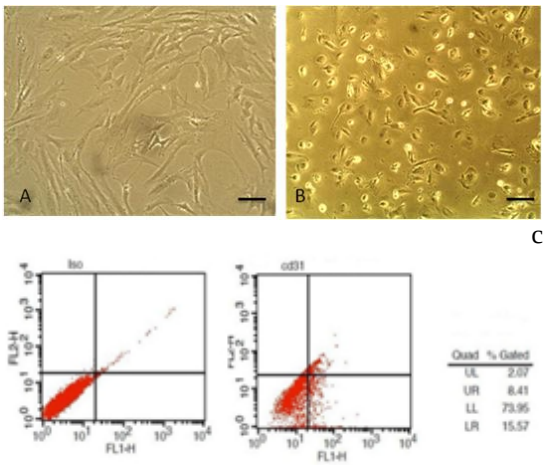
بررسی مورفولوژیکی در طول مطالعه نشان داد که ۱۴ روز پس از القاء با محیط تمایزی عصب، مورفولوژی سلول‌های تیمار شده کم‌کم شروع به تغییر کرد. زوائد سلولی آشکار گردید و سلول‌ها شروع به طویل شدن نمودند و این طویل شدن سلولی تا ۲۱ روز ادامه پیدا کرد. سلول‌های گروه کنترل، تغییری نکرده است و این سلول‌ها، خصوصیات سلول‌های تمایز نیافته یعنی سیتو پلاسم فراوان و زوائد بی‌شمار را حفظ کرده‌اند. نتایج ایمنوسیتوشیمی نشان داد که سلول‌های اندومتریال دارای توان تمایز به نورون با بیان مارکرهای عصبی نستین و MAP2 می‌باشند (شکل ۴).



شکل ۴. حضور پروتیین‌های اختصاصی سلول نورونی Nestin و MAP2 در سلول شبه‌نورونی مشتق از سلول بنیادی اندومتریال رحم القا شده. (Nestin= scale bar: 100 MAP2= µm) (scale bar: 400µm

نتایج مربوط به تمایز سلول‌های بنیادی اندومتریال رحم به سلول‌های اندوتلیالی

همانطور که در شکل ۵ دیده می‌شود سلول‌هایی که تحت تیمار با محیط تمایزی اندوتلیال قرار گرفته بودند بعد از روز ۱۵ شروع به تغییر شکل دادن کردند و نسبت به گروه کنترل (شکل ۵a) که تغییر خاصی را نشان نمی‌داد تغییرات مورفولوژی سلولی در گروه تیمار شده به وضوح دیده شد که همراه با تشکیل زوائد سلولی با ساختار لوله مانند بود و این تغییر شکل تا روز ۲۱ ادامه پیدا نمود (شکل ۵b). نتایج فلوسایتومتری CD31 برای سلول‌های تیمار شده با VEGF نشان داد که این سلول‌ها بعد از ۲۱ روز این مارکر را به میزان ۱۵/۵۷٪ بیان کردند (شکل۶).



شکل ۵. فتومیکروگراف از سلول‌های اندومتریال تمایز یافته به سلول‌های اندوتلیال. (A) گروه کنترل (B) گروه تیمار شده با VEGF بعد از ۲۱ روز تیمار. زوائد سلولی در شکل نشان‌دهنده رگزایی در این سلول‌ها می‌باشد. (Scale bar: 50µm). (C) نتایج مربوط به بررسی بیان مارکر اندوتلیالی CD31 در سلول‌های تمایز یافته (۱۵/۵۷٪).

بحث

در تحقیق حاضر از سلول‌های بنیادی اندومتریال انسان به عنوان منبع دیگری از سلول‌های بنیادی که امروزه بیشتر مورد توجه قرار گرفته است، استفاده شد. سلول‌های بنیادی اندومتریال رحم انسان بسیاری از ویژگی‌های سلول‌های بنیادی را نشان می‌دهند. این سلول‌ها قادرند که در شرایط آزمایشگاهی به انواع دودمان‌های مختلف مزانشیمی مانند سلول‌های چربی، غضروفی، ماهیچه‌ای و غیرمزانشیمی مانند سلول‌های نورونی تمایز یابند (Gargett, 2006; Wolf *et al.*, 2010).

اندومتریوم انسان از قطر ۰/۵mm–۱ بعد از هر قاعدگی به اندازه ۵–۷ mm تا پایان سیکل قاعدگی رشد می‌کند. به منظور توضیح این فرایند پیشنهاد گردید که جمعیتی از سلول‌های بنیادی در لایه بازال اندومتریوم انسانی موجود

می‌باشد. این سلول‌ها پس از تکثیر سریع به لایه فانکشنال اندومتریوم مهاجرت کرده و در رژانرسیون و نوسازی اندومتریوم سهیم می شوند (Mobarakeh *et al*., 2012; Ebrahimi-Barough *et al*., 2013). ما در این مطالعه علاوه بر بررسی مارکرهای سطحی مربوط به سلول‌های بنیادی اندومتریال رحم از روش تمایز به رده‌های مختلف بافتی علاوه بر چربی، استخوان، نورون به سلول‌های اندوتلیالی نیز استفاده کردیم. مطالعات ما نشان داد که سلول‌های بدست آمده از بافت اندومتریال رحم انسان با بیان مارکرهای سطحی مزانشیمی CD105, CD90 و به ویژه مارکر اصلی سلول‌های بنیادی اندومتریال رحم CD146 ویژگی بنیادی بودن را نشان می‌دهند. CD146 یکی از مارکرهای اصلی برای سلول‌های بنیادی اندومتریال محسوب می شود و این سلول‌ها را از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان جدا می‌کند. نتایج مربوط به بیان این مارکرها مطابق با مطالعات انجام شده توسط Gargett *et al*. (2010) می‌باشد (Gargett and Masuda, 2010).

نشان داده شده که سلول‌های بنیادی گوناگونی مثل سلول‌های بنیادی مزانشیمال (MSC)، سلول‌های بنیادی خونساز (HSC)، سلول‌های بنیادی پیش‌ساز چند توان بالغین (MAPC)، سلول‌های بنیادی خون بند ناف (UCBSC)، سلول‌های بنیادی جنینی (ESC) توانایی تمایز به سلول‌های چربی، استخوان و نورون را دارند (Björklund and Lindvall, 2000; Dong *et al*., 2009; Zhu *et al*., 2008; Deng *et al*., 2006).

پیدا نمودن منبع مناسبی از سلول‌های بنیادی که امکان استفاده از آن در کلینیک وجود داشته باشد، چالش بزرگی در سلول درمانی به شمار می‌آید. سلول‌های بنیادی بالغ مشتق از مغز استخوان، هرچند که پتانسیل رژنراتیو بالایی دارند، اما دارای مشکلاتی نیز هستند، عدم دسترسی آسان در کلینیک، تهاجمی بودن جداسازی این سلول‌ها که در مغز استخوان همراه با بی‌هوشی و درد بسیار بوده و نیز از دست رفتن خاصیت تمایز این سلول‌ها در سنین بالا و جمعیت بسیار هتروژن از جمله این مشکلات می‌باشد (Meng *et al*., 2007). آنچه که در حال حاضر ضروری به نظر می‌رسد، لزوم دستیابی به منبعی از سلول‌های بنیادی است که بر این نقایص فائق گردیده و نیز خطر آنورمالی‌های کاریوتیپیک در طول کشت را نداشته و امکان رگزایی را داشته باشد. تحقیق بر روی توانایی تمایز سلول‌های بنیادی اندومتریال نشان داده است که این سلول‌ها، قادر به تمایز به سلول‌های هر سه لایه اندودرم (هپاتوسیت)، مزودرم (استئوسیت، آدیپوسیت، کاردیومیوسیت) و اکتودرم (عصب) هستند (Meng *et al*.,2007) و بنابراین جایگزین مناسبی برای سلول درمانی به شمار می‌آیند. همچنین تحقیقات نشان داده است که این سلول‌ها پس از ۳۴ پاساژ متوالی هنوز هم کاریوتیپ نرمالی دارند (Meng *et al*., 2007)، سرعت تکثیر این سلول‌ها از سلول‌های بنیادی مغز استخوان بالاتر می‌باشد (Meng *et al*., 2007). در تحقیق حاضر از محیط القایی چربی و استخوان برای تمایز این سلول‌ها مطابق با روشی که برای تمایز سلول‌های مزانشیمی بکار می رود استفاده گردید و نتایج نشان‌دهنده تمایز سلول‌های تیمار شده با این محیط های القایی به چربی و استخوان بود. تلاش برای تمایز سلول‌های بنیادی اندومتریال به سلول‌های عصبی اولین بار توسط Wolff *et al*. (2010) و Mobarakeh *et al*. (2012) انجام گرفت (Mobarakeh *et al*., 2012, Wolf *et al*., 2010). که در این مطالعات فقط از فاکتورهای القایی مثل FGF2،EGF، PDGF-AA و یا RA استفاده شده بود در این تحقیق همراه با این فاکتورهای القایی از محیط ترشحی (Condition media) مربوط به سلول‌های نوروبلاستومای انسانی BE(2)-C نیز استفاده گردید. نتایج حاصل از این مطالعه نیز از نظر بیان نستین و MAP2 با کارهای انجام شده مطابقت داشت. در این مطالعه برای اولین بار از سلول‌های اندومتریال برای تمایز به سلول‌های اندوتلیالی نیز استفاده گردید نتایج نشان داد که اگر این سلول‌ها به مدت ۲۱ روز با VEGF مورد القا قرار بگیرند مارکر اندوتلیالی CD31 را بیان می‌کنند. از این ویژگی این سلول‌ها می‌توان برای رگزایی در سلول درمانی استفاده نمود. اگرچه کارهای انجام شده توسط Esfandiari *et al*. (2008) نشان‌دهنده تولید رگ توسط سلول‌های اندومتریال رحمی در محیط سه بعدی است (Esfandiari *et al*., 2008) ولی نتایج این تحقیق مربوط به محیط دوبعدی می‌باشد و نتایج نشان‌دهنده تمایز سلول‌های بنیادی اندومتریال به سلول‌های اندوتلیالی که برای تولید رگ حائز اهمیت است می‌باشد. تحقیق حاضر نشان داد که سلول‌های بنیادی اندومتریال، امکانات فراوانی را برای تکامل درمان‌های بالینی بیولوژیک جدید با هدف بازسازی بافت‌های مختلف از جمله عصب و رگ را فراهم می‌کند. بدون شک با پیشرفت‌های آینده در مهندسی بافت و سلول درمانی می‌توان از این سلول‌ها در جهت منافع بیماران زیادی استفاده کرد.

سپاسگزاری

از گروه مهندسی بافت دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران در اجرا و تأمین مالی این آزمایش تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Björklund A, Lindvall O (2000) Cell replacement therapies for central nervous system disorders. Nat Neurosci, 3:537-44.

Caplan A (2007) Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. J Cell Physiol, 213: 341-347.

Cervello I, Simon C (2009) Somatic Stem Cells in the Endometrium. Reprod Sci, 16: 200-205.

Chan RWS, Schwab KE and Gargett CE (2004) Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. Biol Reprod, 70: 1738-1750.

De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC and Perin L (2007) Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. Nat Biotechnol, 25(1): 100-6.

Deng J, Petersen E, Steindler D, Jorgensen M, Laywell E (2006) Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture and are neurogenic after transplantation. Stem Cells, 24: 1054-64.

Dong SW, Ying DJ, Duan XJ, Xie Z, Yu ZJ, Zhu CH (2009) Bone regeneration using an acellular extracellular matrix and bone marrow mesenchymal stem cells expression Cbfa1. Biosci Biotech Biochem, 73(10): 2226-33.

Du H, Taylor HS (2010) Stem cells in female reproduction. Reprod Sci, 16: 126-139.

EbrahimiBaroughS, Mohseni Kouchesfehani H, Ai J, Massumi M (2013) Differentiation of endometrial stromal cells into Oligodendrocyte Progenitor Cells (OPCs). J Molecular Neuroscience, 51(2): 265-273

Edwards RG (2004) Stem cells today: Bone marrow stem cells. Reprod Biomed Online, 9(5): 541-83

Esfandiari N, Khazaei M, Ai J, Nazemian Z, Jolly A, Casper R (2008) Angiogenesis following three-dimensional culture of isolated human endometrial stromal cells. Fertil Steril, 2(1): 19-22.

Fuchs E and Segre JA (2000) Stem cells: a new lease on life. Cell, 100: 143-55

Gargett CE (2007) Uterine stem cells: what is the evidence? Hum Reprod Update, 13: 87-101.

Gargett CE, Chan RW, Schwab KE (2007) Endometrial stem cells. Curr Opin Obstet Gynecol, 19: 377-383.

Gargett CE (2006) Identification and characterisation of human endometrial stem/progenitor cells. Aust N Z J Obstet Gynaecol, 46: 250-253.

Gargett C, Masuda H (2010) Adult Stem Cells in the Endometrium. Molec Hum Reprod; 16:818-34

Harris DT, Badowski M, Ahmad N, Gaballa MA (2007) The potential of cord blood stem cells for use in regenerative medicine. Expert Opin Biol Ther, 7(9):1311-22.

Korbling M, Estrov Z (2003) Adult stem cells for tissue repair - A new therapeutic concept? N Engl J Med, 349: 570-582.

Lees JG, Lim SA, Croll T, Williams G, Lui S, Cooper-White J, McQuade LR, Mathiyalagan B, Tuch BE (2007) Transplantation of 3D scaffolds seeded with human embryonic stem cells: biological features of surrogate tissue and teratoma-forming potential. Regen Med, 2(3): 289-300.

Meng X, Ichim TE, Zhong J, Rogers A, Yin Z, Jackson J (2007) Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. J Transl Med, 5: 57.

Mobarakeh TZ, Ai J, Yazdani F, Rezayat M, Ghanbari Z, Noroozi Javidan A(2012) Human endometrial stem cells as a new source for programming to neural cells. Cell Biol. Int. Rep, 19(1):7-14.

Wolff E, Gao X, Yao K, Andrews Z, Du H, Elsworth J, Taylor H (2010) Endometrial stem cell transplantation restores dopamine production in a Parkinson disease model. J Cell Mol Med, 15: 747-55.

Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, Ma X, Cui Z (2008) Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC, Cell Biochem Funct, 26: 664-75.