مجله علمي - پژوهشي زيست شناسي جانوري تجربي
سال اول، شماره چهارم، بهار ۱۳۹۱ (۲۸-۱۲)

جداسازی و شناسایی سلول های بنیادی اندومتر رحم انسان و بررسی قدرت تمایزی آنها به رده های مختلف سلولی

سمیه ابراهیمی باروق*، جعفر آی، هما محسنی کوچصفهانی، محمد نبیونی

چکیده

مقدمه و هدف: لایه اندومتریال رحم شامل جمعیتی از سلول ها است که خاصیت خود نوزایی داشته و ویژگی هایی شبیه سلول های بنیادی مزانشیمی را نشان می دهند. در این مطالعه هدف بررسی توان تمایزی سلول های بنیادی اندومتریال به رده های مختلف سلولی می باشد.

مواد و روش ها: سلول های اندومتریال از نمونه های بافتی بدست آمده از رحم انسان به صورت آنزیمی جداسازی شده و درمحیط کشت *DMEM/F12* حاوی ۱۰%سرم کشت داده شدند. بعد از پاساژ سوم سلول ها برای اثبات بنیادی بودن با مارکرهای *CD105, CD90, CD146, CD31, CD34* مورد آنالیز با فلوسایتومتری قرار گرفتند. سپس قدرت تمایزی سلول ها به استخوان، چربی و نورون و اندوتلیال به مدت ۲۱ روز مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: نتایج فلوسایتومتری نشان داد که سلول ها نسبت به مارکرهای *CD105,CD90,CD146* مثبت و نسبت به مارکرهای *CD31* و *CD34* منفی می باشند. رنگ آمیزی با *Oil Red O* و *Alizarin Red* نشان دهنده تمایز سلول ها به چربی و استخوان بود. بررسی های ایمنوسیتوشیمی نیز نشان دهنده بیان مارکرهای عصبی نستین ، *MAP2* در سلول های عصبی و فلوسایتومتری *CD31* نشان دهنده بیان آن در سلول های اندوتلیالی تمایز یافته از سلول های بنیادی اندومتریال رحم است.

بحث: این سلول ها به نظر می رسد که می توانند یک منبع سلولی را ایجاد کنند که برای مطالعات فرایند های تمایز سلولی و سلول درمانی مورد استفاده قرار گیرند.

واژه های کلیدی: سلول های بنیادی اندومتریال، آدیپوسیت، استئوبلاست، نورون، سلول های اندوتلیال

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

Isolation and characterization of human endometrial stem cells and evaluation of their differentiation potential

S. Ebrahimi-Barough*, J. Ai, H.M. Kouchesfehani,Mohammad Nabiyuni

ABSTRACT

Introduction: Human endometrial stem cells (hEnSCs) contain a cell population that are capable of self-renewal and show similar properties to mesenchymal stem cells. We show that these cells can differentiate to different cell lineages.

Materials and Methods: In this study, endometrial tissue obtained from patients and then cells were extracted anzymaticaly. 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.

Results: The flow cytometry analysis showed that EnSCs were positive for CD90, CD105 and CD146 and were negative for CD31 and CD34. Moreover, we showed that the hEnSCs can differentiate to osteocyte and adipocyte that confirmed by alizarin Red and oil-Red O staining. The differentiated cells into neuron and endothelial expressed related markers including Nestin, MAP2 and CD31.

Discussion: 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

مقدمه

سلول بنیادی سلولی است که دارای توان خود نوزایی *self-renewal* بوده و ظرفیت تولید انواع سلول های دیگر را دارد. به طور کلی از لحاظ منشا، سلول های بنیادی دارای دو منشا جنینی و بزرگسال هستند(Fuchs E and Segre JA, 2000). سلول های بنیادی بالغین که در بسیاری از بافت های تخصصی بدن از جمله مغز، مغز استخوان، کبد، پوست، لوله گوارش، قرنیه و شبکه چشم و حتی پالپ عاج دندان نیز یافت می شوند، 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 می کردند که سلول های بنیادی بزرگسالان، تنها سلول های همان بافت را ایجاد می کنند، اما امروزه معتقدند که این سلول ها می توانند به انواع دیگری از سلول ها نیز تبدیل شوند (Korbling and Estrov, 2003; Caplan,2007). منبع جدیدی از سلول ها که امروزه مورد توجه قرار گرفته است سلول های بنیادی بدست آمده از اندومتریال رحم انسان می باشد(Chan et al.,2004; Gargett,2006). اندومتریوم بافتي است که تغییر وضعیت دینامیکي داشته و حدود ٤٠٠ سیکل نوزایی و تمایز و خونریزي را در طي دوران باروری یک زن متحمل مي شود. فعالیتهاي مداوم و منظم استروژن و پروژسترون این تغییر وضعیت را اداره مي کنند تا اندومتریوم پذیرای بلاستوسیت کاشته شده در یک دوره باشد (Du and Taylor,2010). اندومتریوم رحم انسان داراي استروماي پرعروقي است که در شرایط فیزیولوژیک طبیعي، بیشتر از سایر بافتهاي بدن رژنره شده و معمولا لایه

هاي فانكشنال فوقاني آن در مدت خونريزي ماهانه زنان كنده شده و مجددا توسط لايه بازال تحتاني بازسازي مي شود (Cervello and Simon,2009). امروزه حضور سلولهاي بنيادي در لايه هاي مختلف رحم با استفاده از شناسايي ماركرهاي مختلف، بخصوص *CD146* به اثبات رسيده است (Cervello and Simon,2009) و علاوه بر جداسازي اين سلولها، خاصيت آنژيوژنزيز نيز در آنها ديده شده است(Gargett,2007). سلول هاي بنيادي / اجدادي بزرگسال *Adult Progenitor cell stem/* مسئول نوزايي اندومتريوم مي باشند (Gargett et al,2007)، اين امر كه سلول های بنیادی آندومتریال مسئول بازسازی لایه آندومتر رحم در هر سیکل قاعدگی می شود از سال ها پیش گزارش شده است اما تلاش برای جداسازی و شناسایی خصوصیات سلول های بنیادی آندومتریال فقط در طی چند سال اخیر طی آزمایشاتی پیگیری شده است(Meng et al.,2007). با توجه به اينكه سلولهاي بنيادي رحم مي توانند به سلولهاي ديگري مانند نورون، چربی، استئوبلاست و اليگودندروسيت تبديل شوند(Mobarakeh et al.,2012; Ebrahimi-Barough et al.,2013)، بر اين اساس در اين بررسی قدرت تمایزی سلولهاي بنيادي رحم به سلول های اندوتلیالی علاوه بر تمایز به رده های سلولی استخوان و چربی و نورون مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که این سلول ها دارای قدرت تمایز به سلول های چربی، استخوان و نورون و سلول های اندوتلیالی می باشد و امیدهای تازه ای را برای استفاده از این سلول ها در سلول درمانی ایجاد می کند.

مواد و روشها

مطالعه حاضر از نوع تجربی بوده و در آزمایشگاه مهندسی بافت دانشکده فناوری های نوین پزشکی دانشگاه علو پزشکی از تاریخ ۱۳۹۰-۱۳۹۱به انجام رسیده است. مواد شیمیایي 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)

۲-۱- جداسازی سلول های بنیادی اندومتریال رحم و فلوسایتومتری:

در این مطالعه از سلول هاي بنیادي 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. تکه های بافت اندومتریال در مایع *Hanks* قرار گرفته و به آزمایشگاه کشت سلول منتقل شدند و توسط بافر فسفات سالین *PBS* حاوي آنتي بیوتیک (پني سیلین، استرپتومایسین۱%) شستشو داده شدند. سپس نمونه ها در محلول کلاژناز نوعI با غلظت ۲*mg/ml* به مدت ۲ساعت در

انکوباتوربا دمای ۳۷°c و ۵% *CO2* براي هضم بافتی قرار گرفته شدند. پس از هضم بافت، برای حذف تکه های بافتی هضم نشده و ناخالصی های موجود فیلتراسیون توسط فیلترهای ۷۰ *μm* و ۴۰*μm* انجام شد. سپس برای حذف سلول های تک هسته ای از نمونه از فایکول استفاده گردید. سلول ها ی جدا شده به محیط کشت *DMEM/F12* حاوی۱۵% سرم و پنی سیلین-استرپتومایسین منتقل شدند (Mobarakeh et al.,2012; Ebrahimi-Barough et al.,2013) و بعد از اینکه سلول ها، سطح ظرف کشت را به صورت یك لایه کاملا پوشش دادند، پاساژ اول با استفاده از *Trypsin-EDTA* انجام شد. بعد از سومین پاساژ سلول ها از نظر ویژگی های تمایزی و مارکرهای سطح سلولی مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور شناسایي سلول هاي بنیادي اندومتریال رحم از روش فلوسیتومتري برای مارکرهای مزانشیمی *CD105,* *CD90, CD146* و *CD31* به عنوان مارکر سلول های اندوتلیالی و *CD34* مارکر سلول های هماتوپوئیتیک استفاده شد . مراحل فلوسایتومتري براي آنتي ژن های اختصاصي سلول هاي اندومتریال به شرح زیر بود (لازم به ذکر است این آنتي ژن ها جزء آنتي ژن هاي سطح سلولي مي باشند): سلول ها پس از شستشو با محلول شستشوي مخصوص فلوسایتومتری (شامل *PBS* و سرم۱%) به مدت ۳۰دقیقه با پارافرمالدئید۴% فیکس شدند. در مرحله بعدی با آنتی بادی های مورد نظر که شامل *CD105, CD90,CD146,* *CD31, CD34* و به صورت مستقیم به یك آنتي بادي ثانویه فلورسانس متصل بودند به مدت ۱ ساعت انکوبه شدند. بعد ازفیکس مجدد سلول ها با پارافرمالدئید یك درصد، نمونه ها برای بررسی بیان

مارکرهای سطحی توسط دستگاه فلوسایتومتري مدل *Bectin Dekenson* و نرم افزار *Win MDI2/8* در موسسه رویان مورد بررسي قرار گرفتند.

۲-۲- بررسی توان تمایزی سلول های بنیادی اندومتریال رحم به سلول های چربی و استخوان:

سلول ها بعد از پاساژ سوم برای بررسی توان تمایزی به سلول های چربی و استخوان آماده شدند. برای بررسی تمایز به سلول های چربی و استخوان سلول ها به تعداد *cell/ml* ۲۰۰۰۰ در ظرف ۲٤ خانه ای حاوی محیط *DMEM/F12* و سرم ۱۰%کشت داده شدند. بعد از ۲٤ساعت، محیط تمایز به چربی و استخوان به سلول ها اضافه گردید. محیط تمایز به چربی شامل *DMEM/F12* حاوی ۵۰میکروگرم در میلی لیتر آسکوربیک اسید ۳-فسفات، ۱۰۰نانوگرم دگزامتازون و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر ایندومایسین و محیط تمایز به استخوان شامل *DMEM/F12* حاوی ۵۰میکروگرم در میلی لیتر اسکوربیک اسید۳-فسفات،۱۰ نانوگرم دگزامتازون و ۱۰ میلی مولار بتا- گلیسرول فسفات بود. سلول ها به مدت ۲۱ روز در این محیط های القایی نگهداری شدند و محیط سلول ها در هر هفته سه بارتعویض گردید. به منظور نشان دادن نواحي تمایز یافته به سلول هاي چربي ازرنگ آمیزی *Oil Red* استفاده شد در این رنگ آمیزي سلولها به مدت ۱۵ دقیقه با محلول ۰/۵ درصد *Oil Red* انکوبه شدند. نواحي که به سلولهاي چربي تمایز پیدا کرده بودند به علت واکنش تري گلیسیریدهاي موجود در سلو لهاي تمایز یافته با رنگ *Oil red* به رنگ قرمز در آمدند. براي اثبات تمایز سلول هاي بنیادي مزانشیمي به سلو ل هاي استخواني از رنگ

آمیزي آلزارین رد استفاده گردید که براي این کار سلول ها به مدت ۱۰ دقیقه در فرمالین ۱۰% فیکس و بعد به مدت ۱۵ دقیقه با رنگ آلزارین رد در دماي اتاق انکوبه شدند . بدین ترتیب سلول هاي تمایز یافته به استخوان به علت وجود رسوبات کلسیمي ، در حضور این رنگ به رنگ قرمز در مي آیند(Ebrahimi-Barough et al., 2013).

۲-۳- بررسی توان تمایزی سلول های بنیادی اندومتریال رحم به سلول های عصبی:

برای تمایز به سلول های عصبی سلول های بنیادی اندومتریال با غلظت *cell*/ml ۵۰۰۰۰ در ظرف ۲۴ خانه ای پوشیده شده با پلي - ال - اورنیتین منتقل شدند. بعد از ۲٤ ساعت به سلول ها محیط تمایزی عصب اضافه گردید این محیط شامل٤٠%محیط حاصل(*Condition media*) از سلول های نوروبلاستومای *BE(2)-C*(بدست آمده از موسسه پاستور)و ٦٠% شامل *DMEM/F12+ N2 supplement +FGF2(20ng/ml)* به مدت ۵ روز بود. بعد از ۶ روز، محیط سلول ها با محیط جدید که حاوی *FGF2(20ng/ml)+EGF(20ng/ml)* و *Condition media* با همان نسبت قبلی به مدت ۸روز 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 سلول ها اضافه گردید. بعد از ۲۱ روز سلول ها برای بررسی ایمنوسیتوشیمی مارکرهای نستین و MAP2 با پارافرمالدئید ۴% فیکس شدند. ایمنوسیتوشیمی به روش زیر انجام گردید: سلول ها با محلول پارافرما الدئید ۴% به مدت 10دقیقه تثبیت شدند، با محلول تریتون X100، ۰/۲% به مدت ۳۰دقیقه در دمای اتاق نفوذپذیر شدند. بعد از این مرحله محلول بلاک

کننده حاوی Goat serum ۵% در محلول بافر سالین به مدت ۳۰ دقیقه به سلول ها اضافه گردید. سپس آنتی بادی اولیه نستین(با غلظت ۱:۱۰۰)، *MAP2*(با غلظت ۱:۲۰۰) به مدت ۲ساعت به سلول ها اضافه گردید. آنتی بادی ثانویه *Goat anti- mouse IgG FITC* با غلظت ۱:۵۰۰ بر علیه انتی بادی های اولیه اضافه گردید و به مدت ۱ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. هسته سلول ها با *DAPI* رنگ آمیزی گردید.

۲-٤- بررسی توان تمایزی سلول های بنیادی اندومتریال رحم به سلول های اندوتلیالی:

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

نتایج

۳-۱- نتایج مربوط به جداسازی سلول های بنیادی اندومتریال رحم و آنالیزهای فلوسایتومتری:

از آنجایي كه اين سلول هاي بنيادي درصد كمی از جمعيت سلول هاي اندومتريال انسان را تشكيل مي دهند، لذا اين سلول ها در كشت هاي اوليه به صورت جمعيت ناخالص مي باشند و

تعدادی سلول های اندوتلیال و خونی نیز وجود دارند ولی در پاساژهاي بعدي به صورت خالص در مي آيند، دركلوني هاي خالص سلول هاي اندومتريال از لحاظ مورفولوژيكي شبيه به سلول هاي فيبروبلاستی و دوكي شكل مي باشند(شكل۱). نتايج فلوسايتومتری نشان داد كه اين سلول ها بعد از پاساژ سوم نسبت به ماركرهای مزانشيمی *CD105, CD90* و *CD146* مثبت و نسبت به ماركر اندوتليالی *CD31* و هماتوپوئيتيك *CD34* منفی می باشند (شكل ۲).

۳-۲- نتايج مربوط به تمايز سلول های بنيادی اندومتريال رحم به سلول های چربی و استخوان

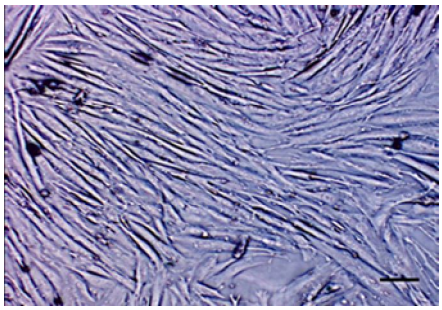
پس از ۲۱ روز سلول های تيمار شده برای بررسی تمايز به سلول های چربی و استخوان، مورد رنگ آميزی قرار گرفتند. نتايج رنگ آميزی با *Oil red* برای سلول های چربی و آليزارين رد برای سلول های تمايز يافته به استخوان نشان دهنده تمايز سلول های بنيادی اندومتريال در محيط القايی به چربی و استخوان به مدت ۲۱ روز بود. همانطور كه در شكل ۳ ديده می شود سلول های تمايز يافته به سلول های چربی دارای قطرات چربی به شكل واكوئل های تجمع يافته در درون سيتوپلاسم سلول ديده می شوند. همچنين محل تشكيل ندول های استخوانی با رنگ آميزی آليزارين رد در سلول های تمايز يافته به استخوان قرمز شده است. . نتايج در شكل ۳ آمده است.

۳-۳- نتايج مربوط به تمايز سلول های بنيادی اندومتريال رحم به سلول های عصبی

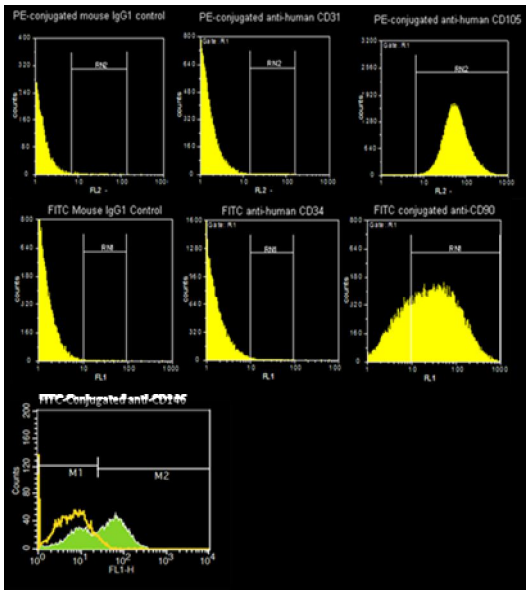
بررسی مورفولوژیکی در طول مطالعه نشان داد که ۱۴ روز پس از القاء با محیط تمایزی عصب ، مورفولوژی سلولهای تیمار شده کم کم شروع به تغییر کرد. زوائد سلولی آشکار گردید و سلول ها شروع به طویل شدن نمودند و این طویل شدن سلولی تا ۲۱ روز ادامه پیدا کرد. سلولهای گروه کنترل ، تغییری نکرده است و این سلولها ، خصوصیات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

۳-٤- نتایج مربوط به تمایز سلول های بنیادی اندومتریال رحم به سلول های اندوتلیالی

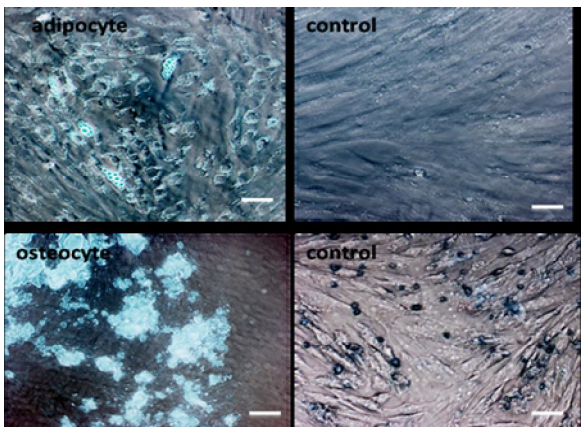
همانطور که در شکل ۵ درده می شود سلول هایی که تحت تیمار با محیط تمایزی اندوتلیال قرار گرفته بودند بعد از روز ۱۵ شروع به تغییر شکل دادن کردند و نسبت به گروه کنترل(شکل ۵a) که تغییر خاصی را نشان نمی داد تغییرات مورفولوژی سلولی در گروه تیمار شده به وضوح دیده شد که همراه با تشکیل زوائد سلولی با ساختار لوله مانند بود و این تغییر شکل تا روز ۲۱ ادامه پیدا نمود (شکل ۵b). نتایج فلوسایتومتری*CD31* برای سلول های تیمار شده با *VEGF* نشان داد که این سلول ها بعد از ۲۱ روز این مارکر را به میزان ۱۵.۵۷% بیان کردند (شکل۶).



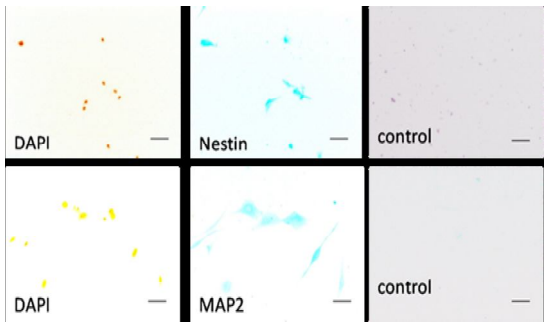
شکل۱- فتومیکروگراف از ظاهر مورفولوژیکی سلول ها ی بنیادی اندومتریال بعد از پاساژ ۳ . سلول ها ظاهر دوکی شکل داشته و شبیه سلول های فیبروبلاستی می باشند. (scale bar:50µm)



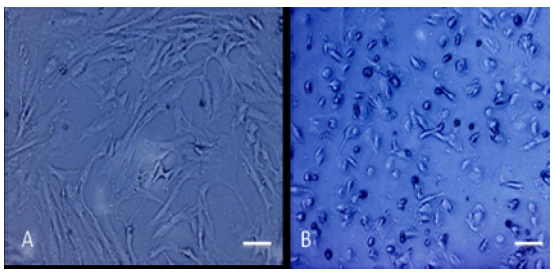
شکل۲- آنالیز فلوسایتومتریک بیان مثبت *CD90* ، *CD105* و*CD146* و بیان منفی*CD31* و *CD34* در سلول های بنیادی اندومتریال رحم

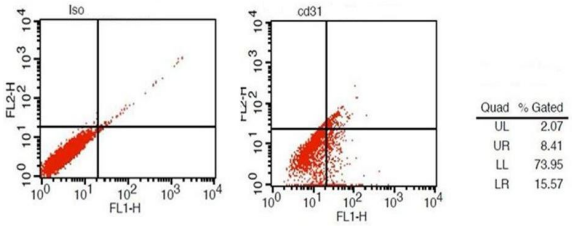


شکل۳- پتانسیل تمایز سلول ها به چربی و استخوان. قطرات چربی در سلول های تمایز یافته به آدیپوسیت سلول با رنگ آمیزی اویل رد قرمز رنگ دیده می شوند. محل تشکیل ندول های استخوانی با رنگ آمیزی آلیزارین رد در سلول های تمایز یافته به استخوان قرمز شده است. (Scale bar:50µm)



شکل۴- حضور پروتین های اختصاصي سلول نوروني *Nestin* و *MAP2* در سلول شبه نوروني مشتق از سلول بنیادي اندومتریال رحم القا شده. (*Nestin*= µm scale bar:100 *MAP2*= scale bar:400µm)





شکل۵- فتومیکروگراف از سلول های اندومتریال تمایز یافته به سلول های اندوتلیال. (*A*)گروه کنترل (*B*) گروه تیمار شده با *VEGF* بعد از ۲۱روز تیمار. زوائد سلولی در شکل نشان دهنده رگزایی در این سلول ها می باشد. (Scale bar:50µm). (C) نتایج مربوط به بررسی بیان مارکر اندوتلیالی *CD31* در سلول های تمایز یافته (۱۵.۵۷%)

بحث

در تحقیق حاضر از سلولهای بنیادی اندومتریال انسان بعنوان منبع دیگری از سلولهای بنیادی که امروزه بیشتر مورد توجه قرار گرفته است، استفاده شد. سلول هاي بنيادي اندومتريال رحم انسان بسیاری از ويژگي هاي سلول هاي بنيادي را نشان مي دهند. اين سلول ها قادرند كه در شرايط آزمايشگاهي به انواع دودمان هاي مختلف مزانشيمي مانند سلول هاي چربي ، غضروفي، ماهيچه اي و غيرمزانشيمي مانند سلول هاي نوروني تمايز يابند.(Gargett.,2006; Wolf et al.,2010) اندومتریوم انسان از قطر ۰/۵mm -۱ بعد از هر قاعدگی به اندازه mm ۵-۷ تا پایان سیکل قاعدگی رشد می کند. بمنظور توضیح این فرایند پیشنهاد گردید که جمعیتی از سلولهای بنیادی در لایه بازال اندومتریوم انسانی موجود می باشد. 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 سلول های بنیادی اندومتریال رحم از روش تمایز به رده های مختلف بافتی علاوه بر چربی، استخوان، نورون به سلول

های اندوتلیالی نیز استفاده کردیم. مطالعات ما نشان داد که سلول های بدست آمده از بافت اندومتریال رحم انسان با بیان مارکرهای سطحی مزانشیمی *CD105,CD90* و به ویژه مارکر اصلی سلول های بنیادی اندومتریال رحم *CD146* ویژگی بنیادی بودن را نشان می دهند. *CD146* یکی از مارکرهای اصلی برای سلول های بنیادی اندومتریال محسوب می شود و این سلول ها را از سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان جدا می کند. نتایج مربوط به بیان این مارکرها مطابق با مطالعات انجام شده توسط *Gargett et al.,* در سال ۲۰۱۰ می باشد (Gargett and Masuda,2010) نشان داده شده که سلول های بنیادی گوناگونی مثل سلول های بنیادی مزانشیمال (*MSC*)، سلول های بنیادی خونساز (*HSC*)، سلول های بنیادی پیش ساز چند توان بالغین (*MAPC*)، سلول های بنیادی خون بند ناف (*UCBSC*) ، سلول های بنیادی جنینی توانایی تمایز به (*ESC*) سلولهای چربی، استخوان و نورون را دارند (Bj?rklund 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 می آید. سلولهای بنیادی بالغ مشتق از مغز استخوان، هر چند 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 بنظر می رسد، 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 بشمار می آیند. 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 می باشد(Meng et al.,2007) . در تحقیق حاضر از محیط القایی چربی و استخوان برای تمایز این سلول ها مطابق با روشی که برای تمایز سلول های مزانشیمی بکار می رود استفاده گردید و نتایج نشان دهنده تمایز سلول های تیمار شده با این محیط های القایی به چربی و استخوان بود. تلاش برای تمایز سلول های بنیادی اندومتریال به سلول های عصبی اولین بار توسط *Wolff* و همکارانش در سال ۲۰۱۰ و *Mobarakeh* و همکاران در سال ۲۰۱۲ 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 سلول های 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 سلول های اندومتریال برای تمایز به سلول های اندوتلیالی نیز استفاده گردید نتایج نشان داد که اگر این سلول ها به مدت ۲۱روز با *VEGF* مورد القا قرار بگیرند مارکر اندوتلیالی *CD31* را بیان می کنند. از این ویژگی این سلول ها می توان برای رگزایی در سلول درمانی استفاده نمود. اگرچه کارهای انجام شده توسط دکتر اسفندیاری و همکارانش در سال ۲۰۰۸ نشان دهنده تولید رگ توسط سلول های اندومتریال رحمی در محیط سه بعدی است(Esfandiari et al., 2008) ولی نتایج این تحقیق مربوط به محیط دوبعدی می باشد و نتایج نشان دهنده تمایز سلول های بنیادی اندومتریال به سلول های اندوتلیالی که برای تولید رگ حائز اهمیت است می باشد. 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 می کند. بدون شک با پیشرفتهای آینده در مهندسی بافت و سلول درمانی می توان از این سلول ها در جهت منافع بیماران زیادی استفاده کرد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از گروه مهندسی بافت دانشکده فناوری های نوین پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران در اجرا و تامین مالی این آزمایش تشکر و قدر دانی می گردد.

REFERENCES:

Bj?rklund A and 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 and 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 and 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 and Taylor HS(2010) Stem cells in female reproduction. *Reprod Sci*;16:126-139.

Ebrahimi-Barough S, 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 and 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. Endometrial stem cells. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2007;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 and Masuda H(2010) Adult Stem Cells in the Endometrium. *Molec Hum Reprod*; 16:818-34

Harris DT, Badowski M, Ahmad N and 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 and 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 and 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 and 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 and 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 and Cui Z(2008) Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC, *Cell Biochem Funct*; 26: 664–75.