ORIGINAL ARTICLE

Differentiation of Human Wharton's jelly Mesenchymal Stem Cells into Oocyte-like Cells by Follicular Fluid

Mona Zolfaghar[1],
Rouhollah Fathi[2],
Tahereh Naji[3],

[1] MSc in Cellular and Molecular Biology, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Islamic Azad University, Pharmaceutical Sciences Branch, Tehran, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Embryology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, Tehran, Iran
[3] Associate Professor, Department of Molecular and Cellular Sciences, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Islamic Azad University, Pharmaceutical Sciences Branch, Tehran, Iran

(Received October 17, 2016 Accepted June 25, 2017)

Abstract

Background and purpose: Follicular fluid (FF) is a rich source of compounds for the development of oocyte. Wharton's jelly mesenchymal stem cells (WJ-MSCs) have a same differentiation origin with primordial germ cells, therefore, WJ-MSCs could differentiate into oocyte-like cells (OLCs) in the presence of appropriate factors. The purpose of present study was to isolate WJ-MSCs and then investigate their differentiation capacity to OLCs by FF.

Materials and methods: The fragments of Wharton's jelly were cultured in α-MEM supplemented with 10% FBS. WJ-MSC at the 3rd passage were studied for differentiation ability to adipocytes and osteocytes. Furthermore, WJ-MSCs related markers were assessed by flow cytometry. In the same passage, WJ-MSCs were induced to differentiate into oocyte-like cells by adding 10% human FF in α-MEM for 21 days.

Results: WJ-MSCs could differentiate into adipocytes and osteocytes. Flow cytometry analysis indicated that WJ-MSCs do not express hematopoietic marker (CD34-CD45) and express MSCs markers (CD73, CD90 and CD105). WJ-MSCs which were under influence of FF differentiated into OLCs and immunocytochemistry analysis showed these cells have positive expression of ZP3, SYCP3 (oocyte's markers) and VASA (germ cell's marker).

Conclusion: The present study demonstrated that WJ-MSCs could differentiate into OLCs (morphologically) under the influence of FF and also expressed ZP3, VASA, and SYCP3 markers positively. According to the capabilities of WJ-MSCs, these cells seem to be suitable for use in cell therapy projects to improve infertility treatments.

Keywords: stem cell, Wharton's jelly, follicular fluid, oocyte-like cells

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27 (154): 1-11 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هفتم شماره ۱۵۴ آبان سال ۱۳۹۶ (۱۱-۱)

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله‌وارتون انسان به سلول‌های شبه تخمک با استفاده از مایع فولیکولی

مونا ذوالفقار[۱]
روح الله فتحی[۲]
طاهره ناجی[۳]

چکیده

سابقه و هدف: مایع فولیکولی منبعی غنی از ترکیبات ویژه برای تکوین تخمک است. ازطرفی سلول‌های بنیادی ژله وارتون با سلول‌های زایای بدوی منشاء تمایزی یکسان دارند. از این رو ممکن است بتوانند در حضور فاکتورهای القایی مناسب به سلول‌های شبه‌تخمک تمایز یابند. هدف این مطالعه جداسازی سلول‌های بنیادی ژله وارتون و تمایز آن به سلول‌های شبه‌تخمک با استفاده از مایع فولیکولی بوده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی قطعات ژله‌وارتون، در محیط α-MEM حاوی ۱۰درصد FBS کشت داده شدند. سلول‌های مزانشیمی جدا شده از بافت، در پاساژ سوم به سلول‌های استخوان و چربی تمایز داده شدند، سپس بیان مارکرهای مربوط به سلول‌های مزانشیمی تحت آنالیز فلوسایتومتری سنجیده شد. جهت تمایز سلول‌های بنیادی ژله وارتون به سلول‌های شبه‌تخمک از محیط α-MEM حاوی ۱۰درصد مایع فولیکولی انسان، به مدت ۲۱ روز استفاده شد و درنهایت سلول‌ها با آنالیز ایمونوسیتوشیمی ارزیابی شدند.

یافته‌ها: سلول‌های بنیادی ژله وارتون توانستند به سلول‌های استخوان و چربی تمایز پیدا کنند. آنالیز فلوسایتومتری نشان داد، سلول‌های بنیادی ژله وارتون مارکر سلول‌های خونی (CD34-45) را بیان نمی‌کنند و مارکرهای سلول‌های مزانشیمی (CD73، CD90 و CD105) را بیان می‌کنند. سلول‌های بنیادی ژله وارتون تحت تیمار با مایع فولیکولی، به سلول‌های شبه‌تخمک تمایز یافتند و آنالیز ایمونوسیتوشیمی نشان داد این سلول‌ها بیان مثبتی از مارکرهای تخمک ZP3) و SYCP3) و سلول زایا (VASA) را دارند.

استنتاج: مطالعه حاضر نشان داد، سلول‌های بنیادی ژله وارتون می‌توانند به سلول‌های شبه‌تخمک (از نظر ظاهری) تحت تأثیر مایع فولیکولی تمایز یابند، هم‌چنین مارکرهای ZP3، VASA و SYCP3 را به طور مثبت بیان کردند. با توجه به توانایی‌های سلول‌های بنیادی ژله وارتون ، به نظر می‌رسد این سلول‌ها می‌توانند مناسب جهت استفاده در پروژه‌های سلول‌درمانی با رویکرد بهبود درمان ناباروری باشند.

واژه های کلیدی: سلول بنیادی، ژله‌وارتون، مایع فولیکولی، سلول‌های شبه تخمک

مقدمه

آمار جهانی ناباروری ۱۰ تا ۱۵ درصد است (۱) که می‌تواند به علت تأخیر در بارداری تا دهه سوم زندگی و در نتیجه کاهش کیفیت تخمک زنان باشد. حتی دوره کوتاه باروری زنان، می‌تواند به علت آسیب‌های ناشی از عوامل محیطی و یا فیزیولوژیک و هم‌چنین داروهای گنادوتوکسیک (Gonadotoxic) و آن‌هادرمان‌های

مولف مسئول: روح الله فتحی– تهران، خیابان رسالت، خیابان بنی‌هاشم، کوی حافظ، پژوهشکده علوم تولیدمثل، دپارتمان جنین‌شناسی Email: rfathi79@royaninstitute.org
۱. کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. استادیار، گروه جنین شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاددانشگاهی، تهران، ایران
۳. دانشیار، گروه آموزشی علوم سلولی مولکولی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۷/۲۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۵/۱۰/۲۲ تاریخ تصویب : ۱۳۹۶/۴/۴

تهاجمی (جهت درمان سرطان) کوتاه‌تر گردد(۲). در نتیجه نیاز به روش‌های کمک باروری ضرورتاً احساس می‌شود. در سال‌های اخیر استفاده از سلول‌های بنیادی جهت تولید سلول زایا (Germ Cell)، به عنوان یک راه حل جهت رفع مشکلات ناباروری در نظر گرفته شده است و محققین توانسته‌اند انواع مختلف سلول‌های بنیادی اعم از سلول‌های بنیادی جنینی(۳)، مغز استخوان و بافت چربی را به سلول‌های زایا تمایز دهند(۴).

سلول‌های بنیادی جنینی تقریباً می‌توانند به سلول‌های تمامی بافت‌های بدن انسان افتراق یابند از این رو تحت عنوان سلول‌های پرتوان(Pluripotent) شناخته می‌شوند. اما با توجه به نگرانی‌های اخلاقی گسترده پیرامون استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی انتخاب یک منبع مناسب برای جداسازی سلول‌های بنیادی اهمیت می‌یابد. امروزه سلول‌های بنیادی جوان‌تری که نسبت به سایر بافت‌ها شناخته شده‌اند شامل سلول‌های بنیادی مایع آمنیون، بندناف و جفت هستند. این سلول‌ها اغلب مزانشیمی بوده و به دلیل ویژگی‌های خاص خود، باعث افزایش توجه شده‌اند(۵). سلول‌های بنیادی مزانشیمی بندناف(Human umbilical cord mesenchymal stem cells (HUC-MSCs)) ، علاوه بر بیان مارکرهای مزانشیمی، مارکرهای مربوط به سلول‌های بنیادی جنینی مانند Oct-4، Nanog، Sox-2 و KLF-4 را در سطوح پایینی بیان می‌کنند(۶). از این رو می‌توان گفت سلول‌های بنیادی بندناف، میانگینی از سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی بالغ هستند و دارای قابلیت تمایز به سلول‌های سه رده زاینده (مزودرم، اکتودرم و اندودرم) هستند(۷، ۹). اخیراً مطالعاتی جهت تمایز این گروه از سلول‌ها به سلول‌های شبه زایا صورت گرفته است. چرا که نیمی از ناباروری‌ها به دلیل عدم تولید سلول زایا و یا کافی نبودن آن ها و نیز عدم وجود تخمک کارآمد می‌باشد. از آن‌جا که بافت ژله‌وارتون بندناف در روز سیزدهم تشکیل رویان از اپی بلاست پروگزیمال تمایز می‌یابد و با سلول‌های زایای بدوی(Primordial Germ Cells) منشأ تمایزی یکسان دارند، (۱۰) بنابراین انتظار می‌رود که سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون(Wharton's Jelly Mesenchymal Stem cells (WJ-MSCs)) پتانسیل مناسبی جهت تمایز به سلول‌های زایا داشته باشند. از طرفی مایع فولیکولی((Follicular Fluid (FF)) به عنوان یک منبع سرشار از ترکیبات لیپیدی، کربوهیدراتی و پروتئینی دارای نقشی اساسی در باروری موفق و تکوین مناسب جنین می‌باشد و محیط مناسبی را برای تکوین تخمک فراهم می‌کند(۱۱). از این رو در این مطالعه درصدد برآمدیم WJ-MSCs را با استفاده از محیط کشت حاوی مایع FF به سلول‌های شبه تخمک((Oocyte Like CellS (OLCs)) تمایز بدهیم.

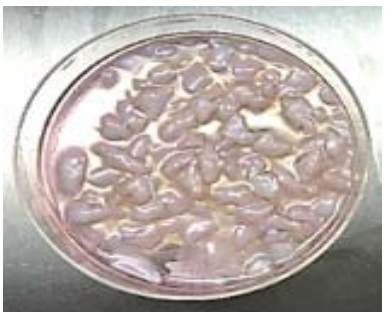
مواد و روش ها

مطالعه حاضر به روش تجربی انجام شده است.

جداسازی و کشت سلول‌های مزانشیمی ژله وارتون بندناف انسان

نمونه‌های بندناف به تعداد ۹ عدد از نوزادان سزارینی دختر که در بیمارستان آرش به دنیا آمدند، با رضایت آگاهانه مادران تهیه شدند و تحت شرایط استریل در محلول PBS(Phosphate-Buffered Saline) به وسیله فلاسک حاوی یخ به پژوهشگاه رویان منتقل گشتند. پس از شستشو و تخلیه کامل خون، هر بندناف به قطعات ۳ تا ۵ سانتی‌متری تقسیم شد و عروق داخل هر قطعه آن که شامل دو شریان و یک ورید هستند، جداسازی شد. بافت باقی‌مانده که به آن ژله وارتون می‌گویند، به قطعات ۰/۵ سانتی‌متری تقسیم شد (تصویر شماره ۱)، سپس هریک از قطعات همراه با محیط α-(Alpha Modification of Eagle's Medium) MEMکه حاوی FBS(Fetal Bovine Serum) به میزان ۱۰ درصد، L-Glutamineبه میزان ۱ درصد، (Basic Fibroblast Growth Factor)bFGFبه میزان ۰/۵

درصد، محلول پنی‌سیلین/استرپتومایسین به میزان ۱ درصد بود در ظروف ۲۴ خانه، در انکوباتور تحت شرایط دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد و میزان ۵ درصد CO2کشت داده شدند. تعویض محیط سلول‌های جدا شده، دو روز در میان انجام شد تا زمانی که سلول‌ها در هفته چهارم، به تراکم ۸۰ تا ۹۰ درصد رسیدند. سپس با استفاده از آنزیمTrypsin/EDTA ، سلول‌ها از کف ظروف کشت جدا و وارد پاساژ بعد شدند.



تصویر شماره ۱: قطعات ژله وارتون قبل از انتال به ظروف کشت

بررسی مارکرهای مزانشیمی با فلوسایتومتری

جهت اثبات بنیادی-مزانشیمی بودن سلول‌های استخراج شده بر اساس مارکرهای سطحی، از روش فلوسایتومتری استفاده شد. بدین منظور سلول‌های مزانشیمی در پاساژ سوم تحت آنالیز فلوسایتومتری قرار گرفتند. در این مرحله ابتدا سلول‌ها به واسطه-Trypsin EDTAاز کف جدا شده و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ RPM سانتریفیوژ شدند. سپس تعداد $۱۰^۶$ سلول در ۱ ml از محلول PBS در هر لوله فلوسایتومتری حل شده و تحت تأثیر آنتی‌بادی‌های مونوکلونال مربوط به مارکرهای مزانشیمی (CD73, CD90, CD105) و مارکر خونی (CD34-45) به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. میزان بیان مارکرها با دستگاه BD FACSCalibur خوانده، با استفاده از نرم افزار FlowJo کمی و آنالیز شدند.

بررسی پتانسیل تمایزی سلول‌های جدا شده از ژله‌وارتون

تمایز به سلول‌های استخوان و چربی

جهت القای تمایز W-MSCs به سلول‌های استخوان و چربی از محیط DMEM حاوی Ascorbic acid, Dexamethasone, b-glycerol phosphate جهت القای تمایز به استخوان وهم چنین از محیط DMEMحاوی ascorbic acid, dexamethasone, indomethacineجهت القای تمایز به چربی استفاده شد و سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با میزان ۵ درصد CO2 انکوبه شدند. محیط سلول‌ها هر دو روز یک بارتعویض شده و به مدت سه هفته تحت این شرایط کشت داده شدند. در پایان هفته سوم جهت ارزیابی تمایز به استخوان، سلول‌ها با متانول به مدت ۱۰ دقیقه فیکس شدند و تحت رنگ Alizarin Red ۱ درصد به مدت ۲ دقیقه، رنگ‌آمیزی شدند. جهت ارزیابی تمایز به چربی، سلول ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق به واسطه پارافرمالدئید ۴ درصد فیکس شدند و با رنگ Oil Red ۰/۵ درصد رنگ‌آمیزی و در نهایت با میکروسکوپ نوری معکوس مشاهده شدند.

فرآیند تخلیص مایع فولیکولی

هر نمونه مایع فولیکولی از یک بیمار تحت عمل IVF، از بخش درمان پژوهشگاه رویان دریافت شد و پس از انتقال به آزمایشگاه به مدت ۵ دقیقه و با سرعت ۴۰۰۰ rpm، سانتریفیوژ شد. سلول‌های خونی پس از سانتریفیوژ ته نشین شده و مایع کهربایی رنگ‌رویی، به طوری که سلول‌های خونی وارد مایع نشوند با استفاده از پیپت کشیده شده سپس با فیلتر۰/۲۲جهت حذف برخی ذرات پاتوژن، عمل فیلتراسیون آن انجام پذیرفت. هم‌چنین جهت غیر فعال سازی برخی از آنزیم‌های غیر ضروریFF ، به مدت ۱ ساعت با حرارت ۵۶ درجه سانتی‌گراد، بن ماری شده، سپس در دمای ۲۰- نگهداری شد.

تمایز WJ-MSCs به سلول‌های زایای جنس ماده با استفاده از FF

جهت تمایز WJ-MSCs به سلول‌های زایای جنس ماده تعداد ۶۰۰۰ سلول که در پاساژ سوم قرار داشتند با استفاده از محیط کشت پایه α-MEM) ، ۱٪ ال-گلوتامین و ۱٪ محلول پنی سیلین/استرپتومایسین (و ۱۰٪ FF، به مدت ۲۱ روز، تحت دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و میزان ۵ درصد CO2 با عنوان گروه تمایزی، کشت داده شدند. از آن‌جا که بسیاری از محتویات مایع فولیکولی بسیار مشابه محتویات سرم مورد استفاده در کشت معمول سلول می‌باشد از این رو در این مطالعه FF با غلظت ۱۰درصد جایگزین سرم با غلظت ۱۰درصد شد اما FF علاوه بر محتویات مشابه با سرم حاوی ترشحات فولیکول‌ها بوده و باعث می‌شود به عنوان یک القاکننده نیز عمل نماید. هم چنین انتخاب این میزان غلظت بدین منظور انجام پذیرفت که پس از بررسی دوزهای ۵درصد ، ۱۰درصد و ۲۰درصد از مایع فولیکولی، میزان زنده مانی سلول‌ها در دوز ۱۰درصد بیش‌تر مشاهده شد. محیط کشت هر دو روز در میان تعویض شد. سلول‌های کشت شده در محیط کشت پایه و ۱۰درصد FBS که در شرایط یکسان با گروه تمایزی قرار داشتند، به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند.

بررسی ریخت‌شناسی سلول‌های تمایز یافته با استفاده از میکروسکوپ نوری

سلول‌های تیمار شده باFF ، در روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ تمایز با سلول‌های گروه کنترل از نظر مورفولوژی و اندازه، به وسیله میکروسکوپ نوری مقایسه شدند.

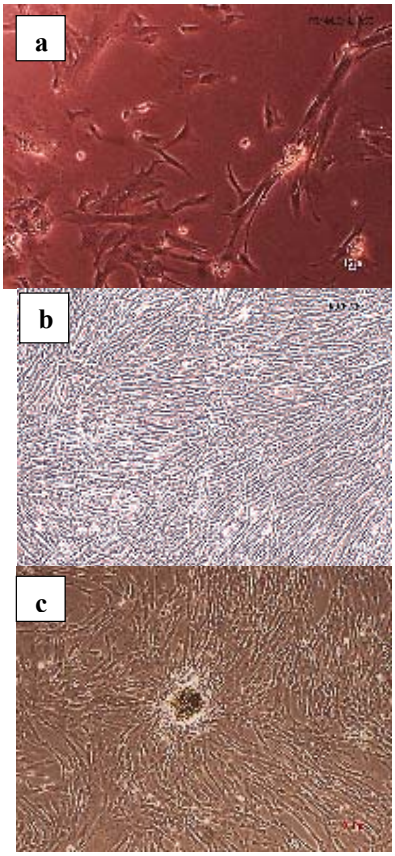
شناسایی مارکرهای زایا و تخمک با رنگ آمیزی ایمونوفلورسنت

پس از طی دوره تمایزی ۲۱ روزه، رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت برای شناسایی بیان یا عدم بیان مارکرهای اختصاصی سلول‌های زایا و تخمک (VASA, ZP3, SYCP3) انجام شد. در این مرحله ابتدا سلول‌ها با PBS شستشو داده شدند سپس با پارافرمالدئید ۴ درصد به مدت ۳۰ دقیقه فیکس شدند و پس از دو مرتبه شستشوی مجدد با محلول PBS-Tween (۰,۰۵ درصد) و هر مرتبه به مدت ۲ دقیقه، غشاء سلول‌ها با استفاده از Triton X100 (۰,۵ درصد) به مدت ۱۰ دقیقه نفوذپذیر شد. هم چنین آنتی‌ژن‌های مشترک دوگونه با استفاده از سرم میزبان ثانویه با رقت ۱/۱۰ در مدت زمان ۱ ساعت حذف شد. سپس سلول‌ها تحت آنتی‌بادی اولیه به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از ۳ مرتبه شستشو با PBS-Tween، سلول به مدت ۱ ساعت تحت آنتی‌بادی ثانویه قرا گرفتند. در نهایت پس از افزودن DAPI123 جهت رنگ‌آمیزی هسته به مدت ۱ دقیقه، سلول‌ها زیر میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شدند.

یافته ها

بررسی مورفولوژی سلول‌های جدا شده از ژله‌وارتون

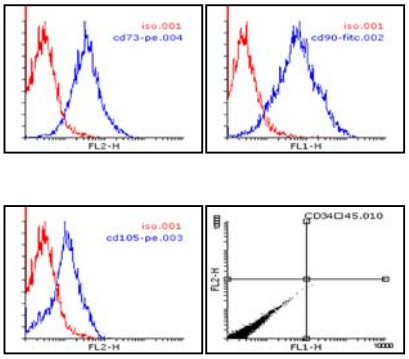
ظاهر سلول‌ها از پاساژ صفر تا پاساژهای بالاتر دوکی و شبه سلول‌های بنیادی مزانشیمی بوده و توانایی تقسیم متوالی و متعدد را تا پاساژهای بالا داشتند. قدرت کلونی‌زایی در سلول‌های مزانشیمی مشتق از ژله‌وارتون در پاساژهای ابتدایی وجود داشت (تصویر شماره۲).



تصویر شماره ۲: سلول‌های جدا شده دو هفته پس از کشت بافت ژله‌وارتون WJ-MSCs (a). در پاساژ دوم WJ-MSCs (b). در پاساژ سوم (c).

نتایج آنالیز فلوسایتومتری

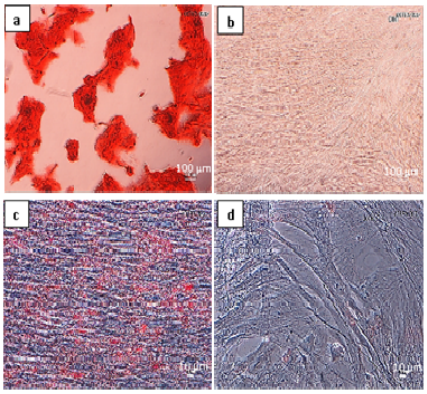
سلول‌های مشتق شده از قطعات بافت ژله وارتون که در پاساژ سوم قرار داشتند تحت آنالیز فلوسایتومتری بیان ۹۳ درصد ، ۹۱ درصد و ۷۴ درصد را به ترتیب برای مارکرهای مزانشیمی CD73، CD90 و CD105 نشان دادند، هم‌چنین مارکر ویژه سلول‌های خونی (CD34-45) در آن‌ها بیان نشد. این نشان می‌دهد که سلول‌های جدا شده منشأ مزانشیمی داشته و از سلول‌های خونی مشتق نشده‌اند (تصویر شماره ۳).



تصویر شماره۳: نتایج آنالیز فلوسایتومتری. بیان ۹۳ درصد ، ۹۱ درصد و ۷۴ درصد به ترتیب برای مارکرهای مزانشیمی CD73، CD90 و CD105 و عدم بیان مارکر ویژه سلول‌های خونی (CD34-45)

تمایز WJ-MSCs به سلول‌های استخوان و چربی

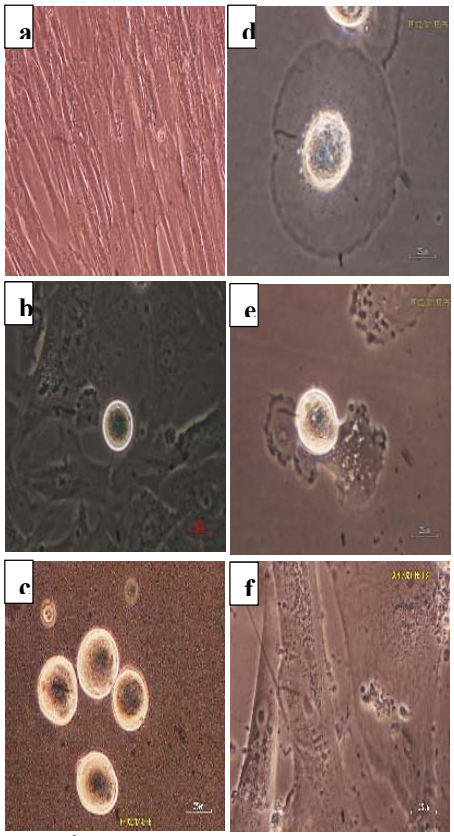
رنگ‌آمیزی Oil Red و Alizarin Red پس از ۲۱ روز، نشان داد که سلول‌های جدا شده از ژله وارتون قادرند به سلول‌های چربی و استخوان تمایز یابند (تصویر شماره ۴).



تصویر شماره ٤: سلول‌های تمایز یافته به استخوان پس از رنگ‌آمیزی Alizarin Red .(a) عدم تمایز و عدم دریافت رنگ قرمز پس از رنگ‌آمیزی Alizarin Red به واسطه سلول‌های تیمار نشده با محیط تمایز به استخوان. (b). تمایز به چربی و دریافت رنگ قرمز به واسطه واکوئل‌های چربی پس از رنگ‌آمیزی Oil Red. (c) عدم تمایز و عدم دریافت رنگ قرمز پس از رنگ‌آمیزی Oil Red به واسطه سلول‌های تیمار نشده با محیط تمایز به چربی (d).

تمایز WJ-MSCs به سلول های زایای جنس ماده با استفاده از FF

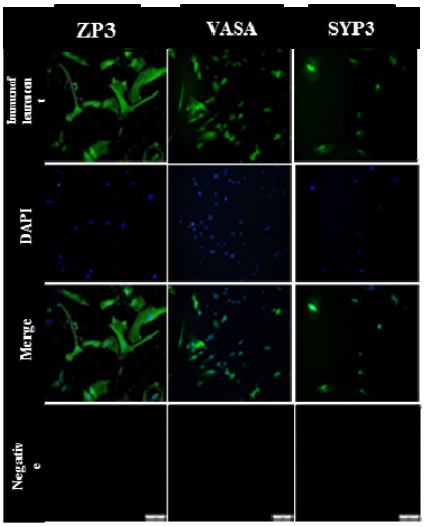
بررسی مورفولوژی نشان داد که سلول‌های مزانشیمی ژله‌وارتون که دارای ظاهر شبه فیبروبلاستی هستند قادرند تحت تیمار با FF به ظاهری مشابه با تخمک (سلول‌هایی گرد با اندازه‌ای بزرگ) تمایز یابند که در طی این فرآیند سلول‌های مزانشیمی ابتدا به صورت چسبیده به ظروف کشت ظاهر دوکی خود را به تدریج از دست داده و تبدیل به سلول‌های گرد شدند و در نهایت از کف ظرف کشت جدا و به صورت معلق و شناور با اندازه ۵۰mμ دیده شدند. در روز هفتم تمایز سلول‌های گرد با اندازه‌ای کوچک‌تر و تعداد کم تری نسبت به روز چهاردهم و روز بیست و یکم کشت مشاهده شدند (تصویر شماره ۵).



تصویر شماره ۵: روز صفر سلول‌های تیمار شده با مایع فولیکولی(a). روز هفتم تمایز با مایع فولیکولی(b) . روز چهاردهم تمایز با مایع فولیکولی(C) . روز بیست و یکم تمایز با مایع فولیکولی(d,e) . روز بیست و یکم کشت سلول‌های تیمار نشده با مایع فولیکولی که ظاهر دوکی خود را حفظ کرده‌اند. (f)

نتایج رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت در سلول‌های تیمار شده باFF

آنالیز ایمونو فلورسنت پس از ۲۱ روز برای سلول‌های مزانشیمی تحت تمایز با مایع فولیکولی نشان داد که این سلول‌ها قادرند پروتئین های اختصاصی تخمک (ZP3)، سلول‌های زایا (VASA) و کمپلکس سیناپتونمال میوزی (SYCP3) را بیان کنند.



تصویر شماره ٦: آنالیز ایمونو فلورسنت پس از ۲۱ روز و بیان مثبت پروتئین‌های اختصاصی تخمک (ZP3)، سلول‌های زایا (VASA) و میوز (SYCP3) (Scale: 100 µm)

بحث

این مطالعه نشان داد سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله‌وارتون که ظاهری دوکی شکل دارند پس از تیمار با محیط حاوی مایع فولیکولی قادرند به سلول‌های شبه زایای جنس ماده (شبه تخمک) تمایز یابند و سلول‌هایی گرد با اندازه بزرگ ۵۰ µm ایجاد کنند و این امر به واسطه رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت به اثبات رسید و سلول‌های تحت تیمار با مایع فولیکولی مارکرهای اختصاصی تخمک(ZP3) ، سلول زایا (VASA) و میوز (SYCP3)را بیان کردند و این یافته با مطالعه Qiu و همکارانش در سال ۲۰۱۳ تطابق دارد. چرا که

خاصیت تمایزی WJ-MSCs دو جنس پسر و دختر را جهت تمایز به سلول‌های شبه تخمک با استفاده از گنادوتروپین‌ها و مایع فولیکولی با غلظت ۲۰درصد سنجیدند و نشان دادند که WJ-MSCs هر دو جنس در شرایط مشابهی به سلول‌های شبه تخمک تمایز می‌یابند(۱۲). اما مطالعه حاضر نشان داد مایع فولیکولی خود به تنهایی و در عدم حضور گنادوتروپین‌ها، هم‌چنین با غلظت پایین‌تری قادر است WJ-MSCs را به سمت سلول‌های شبه تخمک سوق دهد(۱۳). سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارای توان تکثیر بالا و تمایز به چند رده مختلف و ویژگی‌های متعادل کننده سیستم ایمنی بدن (Immunomodulatory)هستند(۱۴). این سلول‌ها اولین بار از مغز استخوان جداسازی شدند و از آن زمان به عنوان جزئی مهم در طب بازساختی به شمار می‌آیند(۱۵). اما جدا سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان روشی تهاجمی بوده و پروسه‌ای پیچیده و دردناک است(۱۶). سلول‌های بنیادی ژله‌وارتون بندناف دارای قدرت تمایز بالایی به سلول‌های سه رده زاینده دارند و جداسازی آن ها نسبت به جداسازی سلول‌های بنیادی بالغ بافت‌هایی نظیر استخوان و چربی آسان‌تر است و به عنوان یک منبع در دسترس شناخته می‌شود، زیرا به طور معمول پس از تولد به عنوان یک بافت زاید دفع می‌شود.Wang و همکارانش در سال ۲۰۱۲، این سلول‌ها را به صورت داخل وریدی به پریمات‌های غیر انسان هر دو هفته در میان به مدت شش هفته تزریق کردند. اما هیچ اثر سمیت وابسته به پیوند WJ-MSCsگزارش نکردند و هم چنین تمامی نواحی تزریق و اندام‌های مورد مطالعه، فاقد تومور بودند(۱۷). بنابراین سلول‌های بنیادی ژله‌وارتون می‌توانند برای اهداف مربوط به سلول درمانی مناسب باشند، چرا که سرعت تکثیر بالا، عدم ایمنی‌زایی، عدم نگرانی‌های اخلاقی و خواص غیر توموزای آن‌ها باعث شده است این دسته از سلول‌ها بسیار ایده‌آل، جهت استفاده اتولوگ و آلوژن در پزشکی بازساختی باشند(۱۸).

اخیراً مطالعاتی جهت تمایز این گروه از سلول‌ها به سلول‌های شبه زایا صورت گرفته است. چرا که نیمی از ناباروری‌ها به دلیل عدم تولید سلول زایا و یا کافی نبودن آن ها و نیز عدم وجود تخمک کارآمد می‌باشد. هم‌چنین مطالعات متعددی نشان داده اند سلول‌های بنیادی جنینی و بالغ قادرند در in vitro سلول‌های زایا و شبه تخمک را ایجاد نمایند(۱۹). از طرفی بافت ژله‌وارتون با سلول‌های زایای بدوی منشأ تمایزی یکسان دارند، بنابراین انتظار می‌رود که سلول‌های بنیادی ژله وارتون پتانسیل مناسبی جهت تمایز به سلول‌های زایا داشته باشند(۲۰). جهت تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های زایا، نیاز به عواملی است که در دستگاه تولیدمثل نقش مؤثری در فرآیندهای تحریکی تخمک دارند از جمله مایع فولیکولی که دارای نقشی اساسی در باروری موفق و تکوین مناسب جنین است و محیط مناسبی را برای تکوین تخمک فراهم می‌کند(۲۱). تا کنون مطالعاتی توانسته‌اند نقش مؤثر این دو ماده را در القای سلول‌های بنیادی به سمت سلول‌های شبه تخمک نشان بدهند.

در سال ۲۰۱۱، Hua و همکارانش نشان دادند که سلول‌های بنیادی بندناف قادرند به سلول زایا تمایز یابند که در این مطالعه جهت تمایز WJ-MSCs به سلول زایا از رتینوئیک اسید و (Bone Morphogenetic Protein 4) BMP4استفاده شد و نشان دادند که پس از تمایز، تعداد محدودی از سلول‌های شبه زایا از نظر بیان مارکر زایایی (VASA) و میوزی (SYCP3) مثبت هستند(۲۲). در سال ۲۰۱۴، لطیف پور و همکارانش نشان دادند هنگامی که WJ-MSCs، در محیط حاوی BMP4 و رتینوئیک اسید کشت داده می‌شوند، قادرند به سلول‌های شبه سلول‌های زایای بدوی تمایز یابند و این امر را به واسطه بیان مارکرهای اختصاصی (Primordial Germ Cells

(PGCs) اثبات کردند(۲۳). در سال ۲۰۱۴، عسگری و همکارانش از سلول‌های جفت (شامل سلول‌های کوریونیک و آمنیوتیک) به عنوان یک بستر مغذی استفاده کردند و پس از ۱۴ روز مشاهده نمودند که بیان مارکرهای اختصاصی سلول‌های زایا (OCT4 و VASA) به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته است(۲۴). با توجه به قابلیت‌های ذکر شده و سایر مطالعاتی از این قبیل که در سال‌های اخیر توسط محققین متعدد انجام شده است به نظر می‌رسد، ژله‌وارتون منبع مناسبی از سلول‌های بنیادی جهت تولید سلول‌زایا باشد(۲۵)، چرا که این مطالعه و مطالعات پیشین محققین نشان داده است، WJ-MSCs می‌توانند تحت یک بستر القایی مناسب به سلول‌های شبه زایا تمایز یابند، از این رو می‌توان به کاربردهای WJ-MSCs در پزشکی بازساختی، به ویژه با رویکرد درمان ناباروری در آینده‌ای نه چندان دور امیدوار بود. از طرفی مطالعه حاضر نشان داد سلول‌های تحت تمایز بیش ترین تغییر مورفولوژی خود را در روز چهارده و بیست و یک کشت نشان می‌دهند اما چون بستر تمایزی نمی‌تواند سلول‌های تغییر مورفولوژی یافته (سلول‌های شبه تخمک) شناور را حمایت کند، این سلول‌ها وارد فرآیند آپاپتوز می‌شوند. از این رو برای مطالعات بعدی در آینده پیشنهاد می‌شود سلول‌های شبه تخمک حاصل از تمایز، به محیط اختصاصی تخمک جهت ایجاد تخمک بالغ منتقل گردند .هم‌چنین بررسی اثر in vivo سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله‌وارتون در درمان ناباروی مورد مطالعه قرار گیرد تا بتوان با استفاده از نتایج این دسته از مطالعات به شناخت عمیق‌تری در حوزه علوم بیولوژی سلول‌های بنیادی و سلول‌های زایا دست یابیم.

سپاسگزاری

جهت همیاری تمامی عزیزان در پژوهشگاه رویان، دانشگاه علوم دارویی و بیمارستان آرش بویژه اساتید بزرگوارم جناب آقای دکتر فتحی و سرکار خانم دکتر ناجی، صمیمانه قدردانی می‌نمایم.

References

1. Adamson GD, de Mouzon J, Lancaster P, Nygren KG, Sullivan E, Zegers-Hochschild F. World collaborative report on in vitro fertilization, 2000. Fertil Steril. 2006;85(6):1586-1622.
2. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. PLoS Med. 2012;9(12):e1001356.
3. Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La Fuente R, et al. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. Science .2003;300(5623):1251-1256.
4. Nikoozad Z, Ghorbanian MT, Rezaei A. Comparison of the liver function and hepatic specific genes expression in cultured mesenchymal stem cells and hepatocytes. Iran J Basic Med Sci. 2014;17(1):27-33.
5. Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. Cell Transplant. 2011;20(1):5-14.
6. Greco SJ, Liu K, Rameshwar P. Functional similarities among genes regulated by OCT4 in human mesenchymal and embryonic stem cells. Stem cells (Dayton, Ohio). 2007;25(12):3143-3154.

7. Ding DC, Shyu WC, Chiang MF, Lin SZ, Chang YC, Wang HJ, et al. Enhancement of neuroplasticity through upregulation of beta1-integrin in human umbilical cord-derived stromal cell implanted stroke model. Neurobiol Dis. 2007;27(3):339-353.
8. Fong CY, Gauthaman K, Cheyyatraivendran S, Lin HD, Biswas A, Bongso A. Human umbilical cord Wharton's jelly stem cells and its conditioned medium support hematopoietic stem cell expansion ex vivo. J Cell Biochem. 2012;113(2):658-668.
9. Campard D, Lysy PA, Najimi M, Sokal EM. Native umbilical cord matrix stem cells express hepatic markers and differentiate into hepatocyte-like cells. Gastroenterology. 2008;134(3):833-848
10. Moodley Y, Atienza D, Manuelpillai U, Samuel CS, Tchongue J, Ilancheran S, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce fibrosis of bleomycin-induced lung injury. Am J Pathol. 2009;175(1):303-313.
11. Fahiminiya S, Gerard N. [Follicular fluid in mammals]. Gynecol Obstet Fertil. 2010;38(6):402-404.
12. Qiu P, Bai Y, Pan S, Li W, Liu W, Hua J. Gender depended potentiality of differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into oocyte-Like cells in vitro. Cell Biochem Funct. 2013;31(5):365-373.
13. Basuino L, Silveira CF, Jr. Human follicular fluid and effects on reproduction. JBRA Assist Reprod. 2016;20(1):38-40.
14. Dulak J, Szade K, Szade A, Nowak W, Jozkowicz A. Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. Acta Biochim Pol. 2015;62(3):329-337.
15. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999;284(5411):143-147.
16. Ding DC, Shyu WC, Lin SZ, Li H. Current concepts in adult stem cell therapy for stroke. Curr Med Chem. 2006;13(29):3565-3574.
17. Wang Y, Han ZB, Ma J, Zuo C, Geng J, Gong W, et al. A toxicity study of multiple-administration human umbilical cord mesenchymal stem cells in cynomolgus monkeys. Stem Cells Dev. 2012;21(9):1401-1408.
18. Ding DC, Chang YH, Shyu WC, Lin SZ. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy. Cell Transplant. 2015;24(3):339-347.
19. Panula S, Medrano JV, Kee K, Bergstrom R, Nguyen HN, Byers B, et al. Human germ cell differentiation from fetal- and adult-derived induced pluripotent stem cells. Hum Mol Genet. 2011;20(4):752-762.
20. Subramanian A, Shu-Uin G, Kae-Siang N, Gauthaman K, Biswas A, Choolani M, et al. Human umbilical cord Wharton's jelly mesenchymal stem cells do not transform to tumor-associated fibroblasts in the presence of breast and ovarian cancer cells unlike bone marrow mesenchymal stem

cells. J Cell Biochem. 2012;113(6):1886-1895.

21. Malekshah AK, Moghaddam AE. Follicular fluid and cumulus cells synergistically improve mouse early embryo development in vitro. J Reprod Dev. 2005;51(2):195-199.
22. Hua J, Qiu P, Zhu H, Cao H, Wang F, Li W. Multipotent mesenchymal stem cells (MSCs) from human umbilical cord: potential differentiation of germ cells. Afr J Biochem. Res. 2011;5(4):113-123.
23. Latifpour M, Shakiba Y, Amidi F, Mazaheri Z, Sobhani A. Differentiation of human umbilical cord matrix-derived mesenchymal stem cells into germ-like cells. Avicenna J Med Biotechnol. 2014;6(4):218 -227.
24. Asgari HR, Akbari M, Abbasi M, Ai J, Korouji M, Aliakbari F, et al. Human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells express oocyte developmental genes during co-culture with placental cells. Iran J Basic Med Sci. 2015;18(1):22-29.
25. Xie L, Lin L, Tang Q, Li W, Huang T, Huo X, et al. Sertoli cell-mediated differentiation of male germ cell-like cells from human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in an in vitro co-culture system. Eur J Med Res. 2015;20:9.