

## مقایسه سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان و سلول‌های مزوتلیومی مایع سروری از نظر میزان بیان مولکول‌های کمپلکس سازگاری نسجی اصلی (MHC)

طاهره فروتن<sup>۱</sup>، محمدامین عبدالهی فر<sup>۲</sup>، نریمان مصفا<sup>۳\*</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت معلم

<sup>۲</sup> گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

<sup>۳</sup> گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

### چکیده

**سابقه و هدف:** مزوتلیوم از سلول‌های مزوتلیال که بر روی یک غشاء پایه مستقرند و توسط بافت همبندی سروری حمایت می‌گردند، تشکیل شده است می‌تواند ساختار مفیدی برای تکمیل پدیده‌هایی همچون هوموستازیس، ترمیم زخم، انتقال مایعات و التهاب باشد. معرفی مایع دیالیز صفاقی در پرورده‌های درمانی نارسایی کلیوی، زمینه قابل توجهی را برای شناخت بیولوژی سلول‌های مزوتلیال صفاقی و سلول‌های بنیادی همراه آن فراهم می‌نماید.

**روش بررسی:** به منظور مطالعه ساختار و امکان بررسی نیروی بالقوه سلول‌های مزوتلیال و مزانشیمی اخذ شده از مایع دیالیز صفاقی بیماران که فاقد علامت تورم صفاق در طول درمان بودند، اقدام به شناسایی مارکرها سطحی شامل MHC کلاس I و II با تکنیک فلوروسیتومتری شد. هم‌زمان با کشت این سلول‌ها در ۴ پاساژ پی‌درپی، با یافته‌های مشابه از سلول‌های مزانشیمال مغز استخوان مقایسه شد.

**یافته‌ها:** هر دو گروه سلول‌های مزوتلیالی صفاقی و مزانشیمال مغز استخوان فاقد عرضه MHC کلاس II بودند. سلول‌های مزوتلیالی برخلاف مغز استخوان، عرضه بسیار کمتری از کلاس I را نشان دادند.

**نتیجه‌گیری:** استفاده از سلول‌های صفاقی به عنوان انتخاب مناسبی در طب جایگزین و درمان ترمیمی می‌تواند زمینه‌ای برای تحقیقات آینده و کاربردی نمودن نتایج آن باشد.

**واژگان کلیدی:** دیالیز صفاقی، سلول‌های مزوتلیال، سلول بنیادی، عرضه مجموعه سازگاری نسجی.

### مقدمه

مایع پریتونئال به عنوان منبع غنی از سلول‌های بنیادی مطرح گردیده است (۲). اخذ آنها از دیالیز صفاقی مبتلایان به نارسایی کلیوی به راحتی و فراوانی صورت می‌گیرد. لایه منفردی از سلول‌های مزوتلیالی بر غشاء پریتونئوم و لایه نازک پیوندی غنی از سلول‌های مزانشیمی با منشاء جنینی قرار دارند که پس از اندام‌زایی، هم‌چنان در محوطه صفاقی باقی می‌مانند و حتی وارد مایع صفاقی می‌گردند (۳-۵).

بهره‌گیری از سلول‌های بنیادی جنینی و بالغ به‌منظور ترمیم ضایعات بافتی و عضوی، روشی رایج و کارآمد تلقی می‌شود. تاکنون منابع سلولی مختلفی برای این منظور پیشنهاد گردیده است که یکی از متداول‌ترین آنها مغز استخوان است (۱). اخیراً

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه گروه

ایمنولوژی، دکتر نریمان مصفا (e-mail: mosaffansar@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۹/۲

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۹/۱۲/۱۱

منتقل شدند. به کمک گرادیان غلظتی وماده فایکول هپاک (۱۰۷۴ شرکت بهارافشان) محتویات سلولی تک هسته‌ای با سانتریفوژ ۴۰۰g به مدت ۲۵ دقیقه در ۲۰ درجه سانتی‌گراد تهیه گردید.

هر یک از دو گروه اخذ شده در بافر هنکس شستشو و سانتریفوژ گردیدند (۲۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد). ته نشین نهایی سلولی در فلاسک مخصوص (۲۵ سانتی‌متر مربع) حاوی محیط کشت کامل سلولی شامل DMEM (sigma)، FBS ۱۰ درصد (Gibco) و آنتی بیوتیک قرار گرفتند و در انکوباتور با جریان CO<sub>2</sub> ۵ درصد و رطوبت ۹۶ درصد انکوباسیون شدند. در طول سپری شدن مراحل کشت، با مشاهده پیوستگی رشد سلول‌ها در بستر، پاساژ سلولی و کشت گسترده انجام شد. در پاساژ مرحله چهارم حذف تدریجی سایر سلول‌های موجود در محتویات شامل ماکروفاژ، فیبروبلاست و سایر رده‌های لکوسیتی صورت گرفت. در حداکثر رشد لگاریتمی، شمارش و تعیین viability به کمک تریپان بلو ۴ درصد انجام پذیرفت. در خاتمه، سلول‌های چسبیده به کمک اسکرابر مخصوص از بستر کشت، برداشت گردیدند.

برای ایمونوفنوتایپینگ از مواد زیر استفاده شد:

الف- آنتی‌بادی‌ها: معرف‌های نشانه شده بر اساس آنتی‌بادی‌های مونوکلونال تحت عنوان

Mouse anti human class I (FITC conjugated) (sigma), mouse anti human class II (a:DR b:DQ) PE conjugated(sigma)

که با رقت ۱ در ۱۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه در یخچال انکوبه گردیدند.

ب- فلوسیتومتری: با خاتمه انکوباسیون، سلول‌ها با بافر مخصوص شامل PBS: BSA, I/100 که به میزان ۴ درصد با پارافرمالید و ۱٪ سدیم ازیاید مخلوط شده بود، فیکس گردیدند. به کمک دستگاه فلوسیتومتر PARTEC با version III، آنالیز مارکرهای بیان شده در روند خوانش دو رنگی، صورت پذیرفت. لازم به ذکر است که به منظور کاهش خطا و افزایش دقت کار، حداقل ۳ بار برای هر نمونه، مراحل مختلف شامل جداسازی، کشت و آنالیز فلوسیتومتری انجام پذیرفت.

واکنش غیر اختصاصی آنتی‌بادی‌ها به کمک پروسه Isotype matching مورد سنجش و هماهنگی قرار گرفت.

## یافته‌ها

در کشت اولیه سلول‌های مغز استخوان، تک هسته‌ای‌های مزانشیمی همراه با سایر رده‌های سلولی به خلوص کامل و

با وجود مطالعات وسیع در زمینه ایمنی‌زایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و اثبات بیان ضعیف آلوآنتی‌ژن‌ها در سطح آنها باز هم خطر رد پیوند در مقابل این منابع سلولی وجود دارد و مانع مهمی در کاربرد آنها به حساب می‌آید. به همین جهت توجه محققان به منابع دیگر این سلول‌ها سبب گردیده که تحقیقات جدیدی در زمینه امکان استفاده از آنها در سایر محوطه‌های بدن مطرح گردد. لازم است عوامل ایمنی‌زایی آنها نیز به طور دقیق مورد بررسی و مطالعه قرار گیرد. از آنجایی که اصلی‌ترین آلوآنتی‌ژن‌های دخیل در رد پیوند، فرآورده‌های ژن‌های گروه‌های خونی و کمپلکس سازگاری نسجی Major Histo compatibility complex (MHC) می‌باشند و فرآورده‌های کلاس یک و دو اهمیت ویژه‌ای در ایمنی‌زایی دارند، لازم است بیان این مولکول‌ها در تمامی رده‌های حاصل از سلول‌های بنیادی مورد بحث و بررسی قرار گیرد.

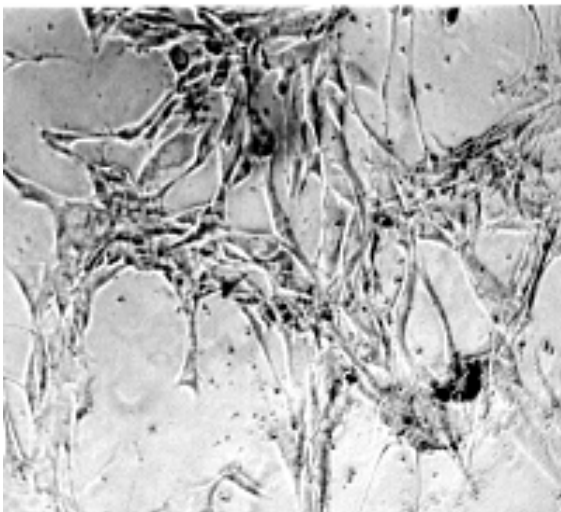
مطالعات بسیاری در زمینه آلوژنیسیته سلول‌های بنیادی مورد پیوند صورت گرفته و نتایج نشان دهنده خطر وقوع آلوژنیسیته در مقابل آنهاست. حال به منظور استفاده بهینه از این منابع سلولی و با توجه به جایگاه‌های استقرار بافتی آنها که می‌تواند متفاوت از یکدیگر باشند، لازم است تا میزان بیان این مجموعه‌های آنتی‌ژنیکی در ساختار سلولی آنها مورد ارزیابی قرار گیرد. در این مطالعه از منابع با ارزشی مانند مغز استخوان و محتویات سلولی مزوتلیال واقع در صفاق به عنوان سلول‌های بنیادی استفاده گردیده تا به طریق آنالیز فلوسیتومتری پس از کشت مناسب در شرایط آزمایشگاه به شدت ایمنی‌زایی آنها از طریق سنجش آنتی‌ژن‌های کلاس I و II پی برده و مورد مقایسه قرار گیرند. به عبارت دیگر این تحقیق با هدف ارزیابی و مقایسه بیان سطحی این مجموعه‌های دخیل در رد پیوند در دو منبع سلول بنیادی از مغز استخوان و مایع صفاقی طراحی گردید. سلول‌های اخذ شده از این دو منبع با ارزش به کمک آنالیز فلوسیتومتری مورد مقایسه قرار گرفتند. بدین ترتیب آلوآنتی‌ژنیسیته این دو گروه سلول از حیث بیان مارکرهای کلاس یک و دو (DR, DQ) و در نتیجه قدرت ایمنی‌زایی آنها مشخص شد.

## مواد و روشها

محتویات حاصل از مغز استخوان انسانی از بخش پیوند بیمارستان شریعتی تهیه گردید. اهداکنندگان از نظر بیماری‌های زمینه‌ای هماهنگ و بررسی گردیدند. مایع سروزی حاصل از دیالیز صفاقی بیماران مبتلا به نارسایی کلیوی نیز از بیمارستان طالقانی دریافت شد. نمونه‌ها در شرایط کاملاً استریل به آزمایشگاه کشت سلولی



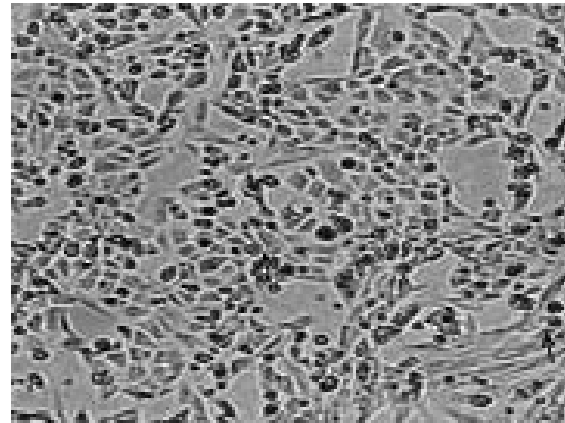
شکل ۳- کشت اولیه سلول‌های مزوتلیالی مایع پریتونئال انسان. بزرگنمایی ۱۰۰



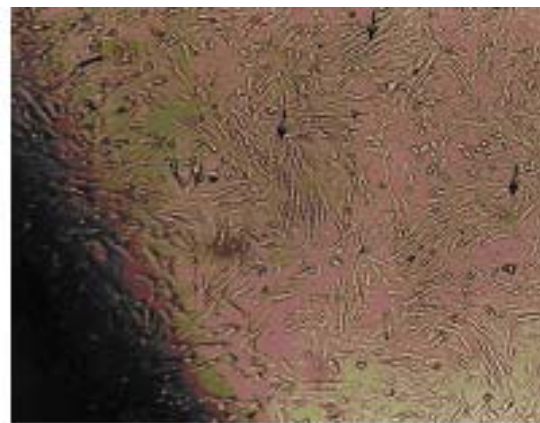
شکل ۴- سلول‌های پاساژ ۳ حاصل از مایع پریتونئال انسان. بزرگنمایی ۲۰۰

نتایج فلوسیتومتری سلول‌های مزانشیمی مایع سروزی، میزان بیان مولکول MHC I را ۳۳ درصد نشان داد، ولی عدم بیان MHC II ملاحظه گردید. بیان مولکول‌های MHC DR, DQ از دسته ۲ آنتی‌ژن‌های MHC در سلول‌های فوق مشاهده نگردید. در مورد سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان تقریباً هم‌میزان الگو تبعیت شدف با این تفاوت که میزان بیان مولکول‌های MHC I در سلول‌های حاصل از مغز استخوان بیشتر از سلول‌های حاصل از سروز بود.

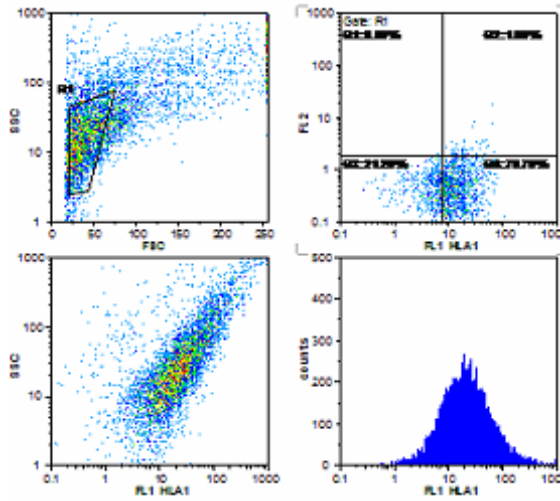
تکثیر پرداختند (شکل ۱). پس از چهارمین پاساژ، رشد و خلوص سلول‌های مزانشیمی فیبروبلاستوئیدی مشاهده شد، به طوری که سایر رده‌ها در طول این مدت حذف گردیدند (شکل ۲). کشت اولیه سلول‌های مزوتلیالی با مورفولوژی متفاوت حاصل از مایع پریتونئوم به خوبی انجام گرفت (شکل ۳). در این رده نیز پس از ۴ پاساژ متوالی، سلول‌های مزانشیمی پدیدار گردیده و مورفولوژی قابل ملاحظه‌ای را نشان دادند (شکل ۴).



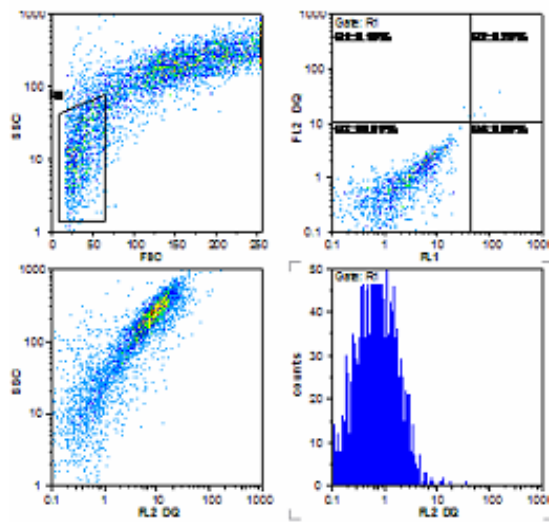
شکل ۱- کشت اولیه سلول‌های مغز استخوان انسان. بزرگنمایی ۱۰۰



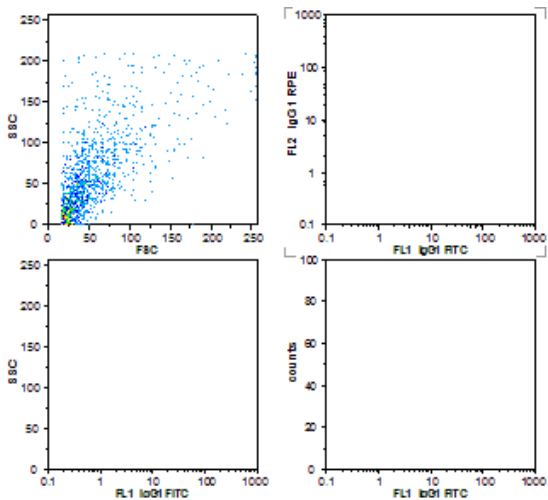
شکل ۲- سلول‌های پاساژ ۳ مغز استخوان انسان (پیکان). بزرگنمایی ۱۰۰



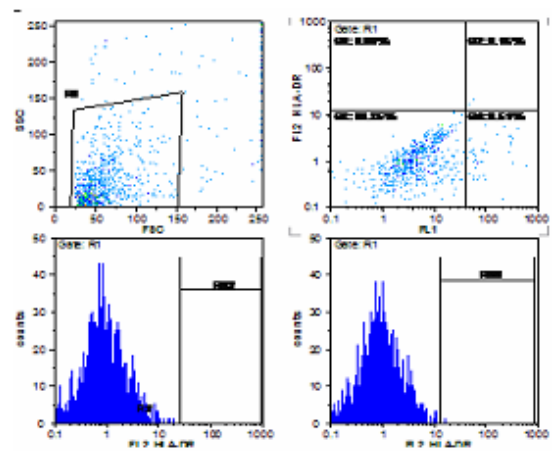
د



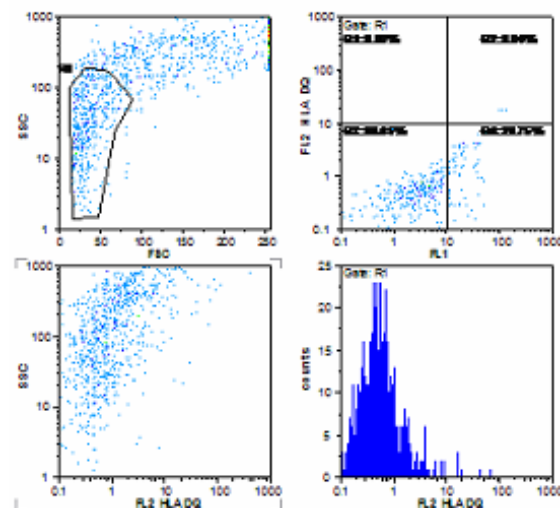
الف



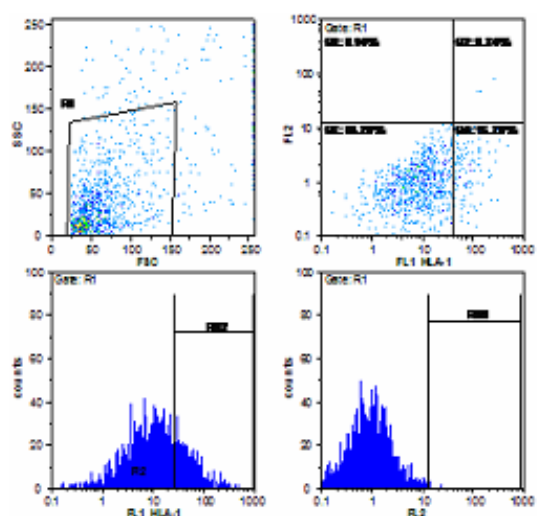
ب



ج



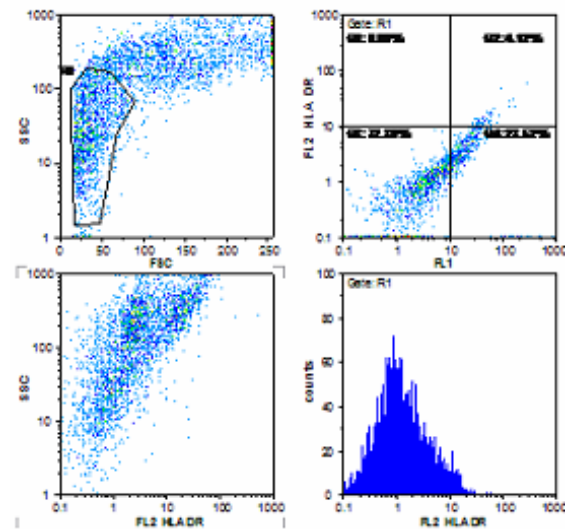
د



ز

سلول‌های با ایمونوژنیسیته کم در اختیار قرار دهد، اهمیت بسیار ویژه‌ای دارد. منابع باارزشی همچون مغز استخوان از این نظر، بارها مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته‌اند. بیان MHC I و عدم عرضه MHC II بارها مورد تاکید قرار گرفته است. منبع سهل الوصول و قابل دسترسی همچون سلول‌های محوطه پریتونئال، اخیراً مورد توجه قرار گرفته است. مطالعه حاضر با هدف مقایسه عرضه و بیان مارکرهای سازگاری نسجی در دو منبع حاصل از مغز استخوان و مایع صفاقی، سعی در معرفی سلول‌هایی با خطر ایمنی‌زایی کمتر نموده است.

در مطالعه حاضر، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در پاساژ ۳ و سلول‌های مزوتلیالی بدست آمده از مایع دیالیزی در پاساژ ۳ برای انجام تست فلوسیتومتری انتخاب شد. نتایج فلوسیتومتری سلول‌های بنیادی مغز استخوان میزان بیان مولکول MHC I را بیش از سلول‌های پریتونئال نشان داد. این در حالی بود که آنتی‌ژن‌های سطحی MHC II (DR-DQ) بیان نشدند. این یافته‌ها با نتایج دیگر محققین در این زمینه مطابقت داشت (۱۴،۱۳). چنانچه می‌دانیم MHC I در کلیه سلول‌های هسته دار ظاهر می‌گردد، اما MHC II اعم از DR، DQ و DP فقط در گروه کوچکی از سلول‌ها به نام سلول‌های ارائه کننده آنتی ژن (APC یا antigen presenting cell) بیان می‌گردد، بنابراین طبیعی است که انتظار عدم بیان آنها را در هر دو گروه داشته باشیم. عده‌ای از محققین در سال ۲۰۰۷ تفاوت خواص ایمونولوژیک سلول‌های مغز استخوان و بافت چربی را قبل از تمایز و بعد از آن بررسی نمودند (۱۳). نتایج آنها نشان داد که الگوی بیان آنتی ژن سطحی در مغز استخوان و سلول چربی شبیه هم بودند. در مطالعه ما نتایج فلوسیتومتری سلول‌های مزانشیمی مایع سروزی میزان بیان مولکول MHC I را ۳۳ درصد نشان داد. در اینجا نیز عدم بیان MHC II ملاحظه گردید. بیان مولکول‌های MHC DR، DQ از دسته ۲ آنتی‌ژن‌های MHC در سلول‌های فوق مشاهده نگردید. در مورد سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان تقریباً همین الگو تبعیت شد، با این تفاوت که میزان بیان مولکول‌های MHC I در سلول‌های حاصل از سروز بود. نحوه بیان مولکول‌های MHC I توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی بسیار مهم است، زیرا بیان این مولکول‌ها در سلول‌های بنیادی مزانشیمی، این سلول‌ها را در مقابل سلول‌های کشنده طبیعی محافظت می‌کند و عدم بیان مولکول‌های MHC II این امکان را به وجود می‌آورد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی از تحت شناسایی قرار گرفتن توسط سلول‌های TCD4 فرار کنند. درتابیداین یافته نیز در



ز

شکل ۵- نتایج آنالیز فلوسیتومتری در نمونه‌های مورد مطالعه.

- الف: MHC II, DQ از سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان در پاساژ ۳  
 ب: MHC II, DR از سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان در پاساژ ۳  
 ج: MHC I از سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان در پاساژ ۳  
 د: MHC II, DQ از سلول‌های مزانشیمی مایع پریتونئال در پاساژ ۳  
 ه: MHC II, DR از سلول‌های مزانشیمی مایع پریتونئال در پاساژ ۳  
 و: MHC I از سلول‌های مزانشیمی مایع پریتونئال در پاساژ ۳  
 ز: گروه کنترل

## بحث

پزشکی ترمیمی به کمک تجویز و کاربرد سلول‌های بنیادی روزبه روز در حال گسترش و توسعه می‌باشد و لازمه فراوانی کاربرد آن، دست یابی به منابع جدید علاوه بر مغز استخوان می‌باشد. علی‌رغم تحقیقات بسیار در این زمینه، هنوز ابهامات چندی پیرامون نحوه عملکرد این سلول‌ها وجود دارد. دسترسی به سایر منابع سلولی آن هم بافت‌هایی غیر از مغز استخوان شامل بافت چربی، پوست، قرنیه و خون محیطی می‌تواند بسیاری از مشکلات و محدودیت‌های اخلاقی را در کاربرد سلول‌های بنیادی جنینی برطرف سازد. سلول‌های بنیادی واقع در بافت‌های بالغ مدت‌ها به حالت تمایز نیافته در لابلا سلول‌های بالغ حضور دارند و در شرایط جداسازی و کشت آزمایشگاهی همچنان قادر به تجدید و خود تکثیر می‌باشند. هرچند که دغدغه امکان ایمنی‌زایی آنها در بدن افراد گیرنده متعاقب پیوند هنوز مطرح می‌باشد. در این موارد نیز یکی از مشکلات موجود، پاسخ‌های ایمنی‌زایی در برابر تزریق آنهاست. وقوع آلوایمیونسیته در مقابل آنها یکی از خطرات غیر قابل اجتناب می‌باشد. انتخاب منبعی که بتواند

فرآورده‌های حاصل از بلع گوارشی و ورود مواد مختلف با پایین‌ترین سطح پاسخ‌های ازدیاد حساسیتی و واکنش‌های دفاعی روبرو هستیم، این توجیه را به دنبال دارد که دلیل عرضه پایین آنتی‌ژن‌های سازگاری نسجی در سطح سلول‌های مشتق از مزوتلیوم همین شرایط منحصر بفرد محوطه صفاقی می‌باشد.

به منظور انجام هرچه دقیق‌تر پژوهش‌های بعدی بهتر است با استفاده از روش‌های سلولی و مولکولی با تایید حضور مارکرهای اصلی مربوط به سلول‌های بنیادی و مشخص نمودن خلوص سلول‌های جداسازی شده اقدام به کشت هدفمند سلولهای مایع سروزی نموده و با انجام بررسی‌های بالینی در نمونه‌های حیوانی نتایج حاصل از پیوند این منابع سلولی را ارزیابی نماییم.

سال ۲۰۰۲ مشخص شد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان می‌توانند تکثیر سلول‌های مختلط لنفوسیتی و تحریک شده با فعال کننده پلی کلونال را مهار کنند (۱۵).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که با وجود عدم بیان MHC II در هردو منبع سلولی، شاهد حضور پایین‌تری از عرضه MHC I در سلول‌های با منشاء سروزی بودیم. می‌توان نتیجه گرفت که امکان وقوع رد پیوند سلولی در کاربرد این نوع سلول بنیادی در مقایسه با مغز استخوان، خطر ایمنی‌زایی کمتری داشته و وقوع واکنش‌های سیتوتوکسیتی توسط لنفوسیت‌های T فرد گیرنده را به حداقل میزان کاهش می‌دهد.

دستیابی به این یافته شرایط ویژه حاضر در فضای صفاقی را که مرتبط با اصول تحمل گوارشی است را حمایت می‌نماید. این واقعیت که به دلیل تماس دائم این فضا با انواع ترکیبات و

## REFERENCES

- Jahangiri L, Moallem A, Foroutan T, Hosseini A. Characterization and transdifferentiation of human mesothelial progenitor/stem cell of peritoneal cavity. *J Biol Sci* 2007; 7: 1179-86.
- Gotilouib L, Gotilouib LC, Khrizman V. The use of peritoneal mesothelium as a potential source of adult stem cells. *Int J Artif Organs* 2007; 30: 501-12.
- Minguel JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cell. *Exp Biol Med* 2001; 226: 507-21.
- Song L, Tuan R. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cell derived from bone marrow. *Faseb* 2004; 18: 980-82.
- Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pleasez F, Stedeford T. Adult bone marrow stromal cells differentiate to neural cells in vitro. *Exp Neurol* 2000; 164: 247-56.
- Khodadadi L, Baharvand H. Immunogenicity of stem cells. *Yakhteh Medical Journal* 2007; 32: 276-303.
- Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, et al. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cell. *Hepatology* 2004; 40: 1275-84.
- Herriek SE, Mutsars SE. The potential of mesothelial cells in tissue engineering and regenerative medicine application. *Int J Artif Organs* 2007; 30: 527-40.
- Turksen K. Embryonic stem cells. Totowa, New Jersey: Human Press; 2002.
- Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *PNAS* 2003; 100: 5807-12.
- Gay I, Chen S, Macdougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofac Res* 2007; 10: 149-60.
- Niemeyer P, Kornacker M, Mehlhorn M, Seckinger A. Comparison of immunological properties of bone marrow stromal cells and adipose tissue – derived stem cells before and after osteogenic differentiation in vitro. *Tissue Exp* 2007; 13: 111-21.
- Hanyneworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human bone marrow derived mesenchymal stem cell are detected by monoclonal antibody. *Bone* 1992; 13: 69-80.
- Chiefetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massagué J. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human epithelial cell. *J Biol Chem* 1992; 267: 19027-30.
- Dinicola M, Carlo-stella C, Magni M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or non-specific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99: 3838-43.