مجله دیابت و متابولیسم ایران. آذر- دی ۱۳۹۲؛ دوره ۱۳ (شماره ۲) ۱۶۲-۱۵۳

بیان ایندول آمین ۲و۳ دی اکسیژناز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی اندومتر تحت تیمار با اینترفرون گاما

لیلا عینی[۱]، نگار نقاش[۱]، باقر لاریجانی[۲]، جعفر آی[۳]، کیوان مجیدزاده[٤]، اسماعیل صدرالدینی[۵*]، کبری امیدفر[۱]

چکیده

مقدمه: سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌عنوان یک منبع مهم سلول‌های بنیادی بالغ کاربرد فراوانی در مهندسی بافت و سلول درمانی پیدا کرده‌اند. این سلول‌ها پتانسیل تبدیل به انواع بافت‌های دیگر را داشته و در اغلب بافت‌های بدن از جمله اندومتر به‌عنوان سلول‌های حمایتی وجود دارند. با توجه به جایگاه آناتومیکی سلول‌های بنیادی اندومتر که آنان را در مواجه با جنین قرار می‌دهد تصور می‌شود این سلول‌ها عامل تولید فاکتورهای مهار ایمنی در طول زمان بارداری جهت تحمل جنین باشند. در تحقیق حاضر پتانسیل خاصیت مهارکنندگی سلول‌های مزانشیمی اندومتر مورد بررسی قرار گرفته است.

روش‌ها: جمعیت سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان و اندومتر کشت داده شده با تراکم حدود ۲×۱۰^{۵} سلول در هر میلی‌لیتر در مجاورت اینترفرون گاما با مقادیر IU/ml ۱۰۰ و IU/ml ۵۰۰ تیمار شدند و پس از گذشت ۷۲ ساعت بیان ایندول آمین ۲ و ۳ دی اکسی ژناز (IDO) با استفاده از روش‌های ایمنوسیتو شیمی و Real Time PCR بررسی شد.

یافته‌ها: داده‌های مطالعه حاضر نشان داد که بیان ایندول آمین ۲و۳ دی اکسیژناز در این سلول‌ها در مواجهه با اینترفرون گاما نسبت به حالت بدون مواجهه به‌صورت معنی‌داری افزایش داشته است و این میزان افزایشی بیان IDO (p=0.001) در سلول‌های مزانشیمی اندومتر در مقایسه با سلول‌های بنیادی مغز استخوان نیز بیشتر بود.

نتیجه‌گیری: اختلاف افزایشی بیان IDO در سلول‌های بنیادی مزانشیمی اندومتر در مقایسه با سلول‌های بنیادی مغز استخوان می‌تواند اشاره به پتانسیل بالای سلول‌های بنیادی اندومتر در مهار سیستم ایمنی در هنگام پیوند داشته باشد و این سلول‌ها را به‌عنوان کاندیدای مناسبی در سلول درمانی مطرح می‌نماید.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs)، ایندول آمین ۲ و ۳ - دی اکسیژناز (IDO)، سلول‌های مزانشیمی اندومتر، مهار سیستم ایمنی.

۱- مرکز تحقیقات بیوسنسور، پژوهشکده علوم سلولی- مولکولی غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۲- مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، پژوهشکده علوم بالینی غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳- گروه مهندسی بافت، دانشکده فن آوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، تهران، ایران
٤- گروه پژوهشی ژنتیک سرطان، پژوهشکده سرطان پستان جهاد دانشگاهی، تهران، ایران
۵- گروه زیست فناوری پزشکی، دانشکده فن آوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

***نشانی**: گروه زیست فناوری پزشکی، دانشکده فن آوری نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، خیابان ایتالیا، تهران، ایران تلفن: ۰۲۱۸۸۹۹۱۱۱۱۹، نمابر: ۰۲۱۸۸۹۹۱۱۱۱۷، پست الکترونیک: sadroddiny@tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۸/۰۱ تاریخ درخواست اصلاح: ۱۳۹۲/۰۸/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۹/۰۳

مقدمه

امروزه سلول درمانی در درمان ناهنجاری‌های مختلفی مورد استفاده قرار می‌گیرد. به‌طور مثال، می‌توان به استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در درمان نارسایی میوکاردیوم، جایگزینی سلول‌های بنیادی عصبی در اختلالات و درمان های بافت مغزی و نیز به‌کارگیری سلول‌های کشنده طبیعی پیوند شده در تومورها اشاره داشت. سلول درمانی را می‌توان به عنوان دسته‌ای از تکنیک‌ها یا تکنولوژی‌های جدید که بر مبنای جایگزینی سلول‌های بیمار یا سلول‌های مختل با سلول‌های سالم و کارا صورت می‌گیرد، تعریف نمود. هدف کلی این است که سلول‌های سالم در بدن تلفیق شده و شروع به فعالیت نمایند. پیوند سلول‌های بنیادی شاخه‌ای نوین در سلول درمانی می‌باشد که متعاقب شناخت سلول‌های بنیادی، انواع آنها، منابع مختلف بیولوژیک آنها و عملکرد و کارائی هر کدام از آنها اهمیت روز افزونی پیدا کرده است و به‌علت اهمیت روز افزون این دسته از سلول‌ها، جای خود را در بین روش‌های نوین پزشکی باز کرده است [۱] .از این رو شناخت قابلیت‌های بالقوه سلول‌های بنیادی می تواند افق های بیشتری از این نوع درمان را برای درمان بیماری‌هایی با پایه نقص سلولی مانند دیابت باز کند.

روش‌های مختلفی برای درمان دیابت پیشنهاد شده و تحقیقات روی آنها ادامه دارد، یکی از این روش‌ها، استفاده از سلول‌های بنیادی است. لزوم استفاده از روشی که بتوان سلول‌های از بین رفته انسولین ساز در دیابت نوع یک را به‌منظور درمان بیماری دوباره جایگزین کرد، دانشمندان را بر آن داشت تا از سلول‌های بنیادی استفاده کنند. سلول درمانی و جایگزینی سلول‌های تولیدکننده انسولین با سلول‌های بتا دارای عملکرد از اهداف بزرگ درمان دیابت نوع یک و در بسیاری موارد دیابت نوع دو می‌باشد [۲]. در این راستا تحقیقات زیادی با استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی صورت پذیرفته است [۳, ٤] اما با توجه به مشکلات کاربرد این سلول‌ها از جمله محدودیت‌های اخلاقی در به‌کارگیری آنها و شکل گیری تراتوما بعد از پیوند، سلول‌های بنیادی بزرگسال که از نظر قابلیت تمایزی سلول‌هایی چند توان هستند، می‌توانند گزینه‌ی دیگری برای استفاده در درمان دیابت به روش سلول درمانی باشند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی از دسته سلول‌های بنیادی بالغ بوده و توانایی تمایز به رده‌های مختلف سلولی و قابلیت سرکوب سیستم ایمنی را دارا می‌باشند [۵]. در بیماری دیابت که در آن حمله به سلول‌های خودی توسط سلول‌های ایمنی منجر به ایجاد بیماری می‌شود، تزریق سلول‌های بنیادی می‌تواند با تحریک ترشح انواع مختلفی از سایتوکاین‌ها و عوامل رشد باعث رفع یا کاهش آسیب سلول‌های پانکراس شود. بنابراین تنظیم و تعدیل سیستم ایمنی یکی از سازوکارهای پیشنهادی است و نیز استفاده از سلول‌های بنیادی با خاصیت تعدیل کنندگی سیستم ایمنی می‌تواند راهکاری نوین و قابل استفاده در این زمینه باشد. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی پاسخ ایمنی قابل توجهی را در لنفوسیت‌های آلوژن ایجاد نمی‌کنند. سازوکار چگونگی رخ دادن این پدیده به‌طور کامل شناخته نشده است. گرچه به میزان حضور HLA نوع دو و مولکول‌های کمکی در سطح سلول‌های مزانشیمی و البته مهار پاسخ ایمنی توسط این سلول‌ها ربط داده می‌شود [٦]. سلول‌های مزانشیمی فاقد MHC کلاس دو و بیان کننده MHC کلاس یک هستند. البته Le Blanc و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که این سلول‌ها مولکولMHC کلاس دو را به‌صورت داخل سلولی بیان می‌کنند و در صورت القا با اینترفرون گاما آن را در سطح خود نیز بروز خواهند داد. جالب اینکه همین سلول‌هایی که با اینترفرون گاما مواجه شده‌اند قادرند پاسخ ایمنی در لنفوسیت‌های آلوژن را مهار نمایند که این امر نقش مهم و اساسی اینترفرون گاما را در مهار پاسخ ایمنی با واسطه سلول‌های مز انشیمی نشان می‌دهد [۷].

سلول‌های بنیادی مزانشیمی اندومتر ($eMSC_S$) اخیراً به‌عنوان یک منبع مناسب سلول‌های بنیادی بالغ و نیز از نظر قابلیت تمایزی به انواع بافت‌های بالغ مورد توجه قرار گرفته‌اند [۸-۱۰] . این سلول‌ها در طول دوران باروری پس از هردوره ریزش دیواره رحم در قاعدگی سبب بازسازی جداره رحم می‌شوند. بافت اندومتر در رحم انسان بافتی بی‌نظیر است که فرآیندهای منظم و پویای رشد، تمایز، ریزش و تجدید شدن را در طی سال‌های باروری زنان طی می‌کند و در هر دوره قاعدگی ٤-١٤ میلی متر بافت موکوزا (ترشحی) را تولید می‌کند [۱۱]. تا امروز منابع سلولی که در

تجدید کامل بافت رحم شرکت می کنند به‌طور دقیق شناخته نشده است، اخیراً جمعیت کوچک مشخصی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی خود تجدید شونده و چند قوه‌ای با قدرت تکثیر فراوان در رحم انسان به‌عنوان کاندیدی برای جمعیت سلول‌های بنیادی/پروژنیتور در داخل بافت رحم مطرح شده‌اند [۱۲, ۱۳]. اولین شواهد منتشر شده برای وجود سلول‌های بنیادی اندومتری مربوط به مطالعه Chan و همکاران بود که در خصوص خاصیت کلونی‌زایی سلول‌های اپیتلیالی و استرومایی اندومتر و شناسایی آنها مطالعه کرده بودند [۱۲]. از آنجایی‌که اندومتر شامل غدد، سطح اپیتلیومی واسترومای حمایت کننده می‌باشد، این فرضیه مطرح می که سلول‌های بنیادی اپیتلیالی و استرومایی مسوول بازسازی و احیای اندومتر می‌باشند. چندین روش عملکردی برای شناسایی سلول‌های بنیادی بالغ در اندومتر انسان استفاده شده است و مطالعات متعددی بیان مارکرهای سلول‌های بنیادی را در اندومتر انسان مورد بررسی قرار داده‌اند [۱۲]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی کلونوژنیک بافت رحم مارکرهای سطحی معمول سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی(CD29 PDGFRb, CD146, CD105, CD90, CD73, CD44,) را بیان می‌کنند و فاقد بیان مارکرهای ($CD31^-$, $CD34^-$, $CD45^-$ و $Stro-1^-$) می‌باشند. این سلول‌ها در موقعیت اطرافی عروق و بافت‌های احاطه کننده عروق یافت شده‌اند. این امر پیشنهاد می‌کند که ممکن است این سلول‌ها زیر گروهی از سلول‌های پری سیت (سلول‌های ویژه طویل شده و قابل انقباض) باشند که در تنظیم ترمیم و رگزایی سلول‌های استرومای اندومتر نقش دارند [۱٤]

در کنار مزایای دیگری چون قابلیت بالای رگزایی و تکثیر و تمایز برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی اندومتر، اخیراً خاصیت ایمنومودولاتوری این سلول‌ها مورد توجه قرار گرفته است [۱۵]. قابلیت تحمل جنین در طول دوران بارداری و عدم فعال شدن سلول‌های ایمنی جداره رحم پدیده ایست که عمدتاً به عملکرد هورمون رها کننده کورتیکوتروپین (CRH) نسبت داده می‌شود [۱٦]. با این حال حضور سلول‌های بنیادی مزانشیمی اندومتر می‌تواند در فرایند تحمل جنین نقش موثری داشته باشد.

IDO یک پروتئین حاوی هم می‌باشد و کاتابولیز کننده درون سلولی تریپتوفان است. فعالیت بالایی از این آنزیم در ریه، روده کوچک و جفت و بیضه دیده شده است. IDO در سلول‌های مختلفی نظیر ماکروفاژها، سلول‌های دندریتیک، سلول‌های اندوکرین و سیستم اعصاب مرکزی (CNS) بیان می‌شود. مهار تکثیر سلول‌های T از طریق کاتابولیسم تریپتوفان در ماکروفاژها، در مهار پاسخ‌های ناخواسته سلول‌های T اهمیت دارد و این فعالیت متابولیکی تریپتوفان توسط IFN-γ در ماکروفاژها القاء می‌شود. مهار تکثیر سلول‌های T از طریق حذف تریپتوفان از ریزمحیط سلولی توسط ماکروفاژها و آپوپتوز سلول‌های T با واسطه IDO توسط سلول‌های دندریتیک $CD8\alpha^+$ ، IDO را به‌عنوان یک تنظیم کننده ایمنی در شرایط in vivo مطرح می‌کند [۱۷].

IFN-γ که اثرات ایمونومدولاتوری و ضدتکثیری دارد، قوی‌ترین محرک بیان ژن IDO در سلول می‌باشد. پس بخشی از اثر ضدتکثیری IFN-γ را روی سلول‌های توموری و اثر مهاری آن را روی پاتوژن‌های داخل سلولی به حذف اسیدآمینه ضروریL–تریپتوفان از طریق القای IDO می‌توان نسبت داد [۱۸]. سایر محرک‌های IDO نظیر LPS ، TNF-α و IL-2 احتمالاً از طریق افزایش تولید IFN-γ سبب القای تولید IDO می‌شوند [۱۹].

در طی کاتابولیسم، تریپتوفان به کینورنین و ترکیبات مختلف دیگری تبدیل می‌شود که برخی از آنها نوروتوکسیک بوده و برخی دیگر جهت عملکرد سلول‌های عصبی ضروری‌اند. مثلاً اسید کوئینولنیک سبب بروز تشنج و افزایش تحریک‌پذیری می‌شود. از طرفی این ماده در کبد نهایتاً به NAD تبدیل می‌شود و در تولید انرژی مورد استفاده قرار می‌گیرد. برخی از متابولیت‌های تولید شده در این چرخه نیز سایتو توکسیک بوده و سبب القای آپوپتوز در سلولهای T می‌گردد [۲۰]. با توجه به نقش موثر حضور سلول‌های بنیادی مزانشیمی اندومتر در فرایند تحمل جنین، برای تایید این فرضیه بر آن شدیم تا ایمنی‌زایی سلول‌های مزانشیمی اندومتر و سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان را با بررسی بیان ایندول آمین ۲و۳ دی اکسیژناز IDO (Indoleamine2,3 dioxygenase) مورد بررسی قرار دهیم و با یکدیگر مقایسه کنیم. نتایج این تحقیق ممکن است در توصیف سازوکار

ایمنومودولاتوری سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کار گرفته شده و سلول‌های مزانشیمی اندومتر را به‌عنوان کاندیدای مناسبی در سلول درمانی مطرح نماید.

روش‌ها

آماده‌سازی محیط کشت

محیط کشتάMEM جهت سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان و محیط کشت DMEM جهت سلول‌های مزانشیمی اندومتر مورد استفاده قرار گرفت. به این محیط‌های کشت L- گلوتامین (۱ درصد) و استرپتومایسین و پنی سیلین (۱ درصد) وFCS (۱۰ درصد) افزوده شد.

آماده‌سازی سلول‌ها

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان: این سلول‌ها در پاساژ ۲ از مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی مؤسسه رویان خریداری و در فلاسک‌های کشت سلول، کشت داده شدند تا به تعداد لازم تکثیر یابند. سلول‌های بنیادی پاساژ ۳ و ٤ از این کشت‌ها برداشته شدند و در محیط کشت αMEM حاوی آنتی بیوتیک در غلظت حدود ۲×۱۰^{۵} سلول در میلی‌لیترو در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و $CO_۲$ ۵ درصد کشت داده شدند.

سلول‌های مزانشیمی اندومتر: این سلول‌ها در پاساژ ۲ از گروه مهندسی بافت دانشگاه علوم پزشکی تهران دریافت شد و در فلاسک‌های کشت سلول، کشت داده شدند تا به تعداد لازم تکثیر یابند. سلول ها در پاساژ ۳ و ٤ از این کشت‌ها برداشته شدند و در محیط کشت DMEM حاوی آنتی بیوتیک در غلظت حدود ۲×۱۰^{۵} سلول در میلی‌لیترو در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و $CO_۲$ ۵ درصد کشت داده شدند .

افزودن سایتوکاین

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و اندومتر در فلاسک T25 برای آنالیز mRNA و در پلیت ۹٦ خانه جهت انجام تست ایمنوسیتوشیمی کشت داده شدند و پس از رسیدن به تراکم مناسب، اینترفرون گاما (Sigma: I3265) با مقادیر ۱۰۰IU/ml و۵۰۰IU/ml به آنها اضافه گردید. در هر نمونه سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت با اینتر فرون کشت داده شدند و پس از آن میزان بیان ایندول آمین ۲و۳ دی اکسیژناز در سلول های مزانشیمی اندومتر و سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان با روش qRT-PCR، ایمنوسیتو شیمی اندازه‌گیری شد.

آزمون qRT-PCR

استخراج RNA تام از سلول‌ها

به‌منظور استخراج RNA سلولی جهت انجام qRT-PCR از کیت استخراج RNA(Vivantis,GF-TR-025) استفاده گردید و طبق پروتکل آن عمل شد: محیط کشت رویی سلول‌های اندومتر و مغز استخوان کشت داده شده (در مواجه با سایتوکاین و بدون مواجه با سایتوکاین) خارج گردید و سلول‌ها با بافر فسفات دو مرتبه شستشو داده شدند، تریپسینه شدند و مورد استفاده برای استخراج RNA قرار گرفت. در پایان غلظت RNA برای تعیین کمیت آن با اسپکتوفوتومتر در طول موج ۲٦۰ و۲۸۰ نانومتر تعیین شد. ژل آگارز ۰/۸ درصد با بافر TBE ساخته شد و نمونه ها با ولتاژ ۱۰۰میلی ولت الکتروفورز شد تا کیفیت RNA مورد استفاده برای ساخت cDNA[1] تایید شود. حضور باندهای S ۱۸ و S ۲۸ rRNA سالم بودن RNA تام استخراج شده را تایید می‌کرد.

تهیه cDNA از RNA استخراج شده

برای تولید cDNA از کیت (vivantis,2steps RT_PCR) استفاده گردید و طبق پروتکل آن عمل شد:

به‌طور خلاصه ۵-٦میکروگرم RNA تام استخراج شده و مقدار ۱ میکرولیتر پرایمر oligo d(T) و ۱ µl از dNTP mix و آب DEPC به حجم نهایی ۱۰µl رسید، سپس به مدت پنج دقیقه در دمای ٦۵ درجه سانتیگراد انکوبه شد.۱۰ µl مخلوط cDNA Synthesis طبق روش اشاره شده در کیت تهیه گردید و با استفاده از آب Nuclease-free به حجم نهایی ۲۰µl رسید. این مخلوط به مدت شصت دقیقه در ٤۲ درجه سانتیگراد، پنج دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتیگراد دردستگاه ترموسایکلر انکوبه شد .cDNA سنتز شده با دور ۲۰۰ g و به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ گردید و ذخیره گردید.

Real-Time PCR

برای بررسی بیان ژن ایندول آمین ۲و۳ دی اکسیژناز از پرایمرهای جدول ۱ استفاده شد و بیان ژن بتا اکتین به‌عنوان کنترل داخلی اندازه گیری شد. به ازا ی هر واکنش، ده میکرولیتر از 2X Power SYBR Green PCR master mix، ۰/۵ µl از Forward primerو ۰/۵ µl از Revers primer و ۱۰۰ ng/µl cDNA و۷µl آب دیونیزه استفاده شد و ده دقیقه در ۹۵ °C، ۱۵ ثانیه ۹۵ °C، سی ثانیه ۶۰ °C ، وآنالیز منحنی ذوب به‌منظور اختصاصی بودن منحنی تکثیر انجام شد و به تعداد ٤٠ چرخه تکرار شد. برای افزایش دقت، هر واکنش به صورت سه ریپلیکیت انجام گرفت. برای انجام واکنش‌های Real-Time PCR از دستگاه Applied Biosystem مدل ۷۵۰۰ استفاده شد. پس از پایان برنامه، با استفاده از CT های نمونه‌ها و آنالیز داده‌های نهایی به‌صورت Relativeو به روش مقایسه CT ها (روش $2^{-\Delta\Delta CT}$) انجام گرفت، ژن بتا اکتین به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. جهت آنالیز آماری داده‌ها نرم افزارهای Software (version ۷۵۰۰ ABI Applied Biosystem(2.01، LinReg PCR و rest-r1g.xls استفاده گردید.Efficiency داده‌ها بررسی شدند و بیان ژن IDO مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای استفاده شده برای Real-Time PCR

نام ژن	نام الیگونوکلئوتید	توالی
IDO	Forward primer	5´-GATGTCCGTAAGGTCTTGCCA - 3´
IDO	Reverse primer	5´-GGATCCTTTTTCTTCCAGTTTGC - 3´
ACTINB	Forward primer	5´-AGCCTCGCCTTTGCCGA - 3´
ACTINB	Reverse primer	5´-CTGGTGCCTGGGGCG - 3´

ایمنوسیتوشیمی

برای بررسی خاصیت ایمنومودولاتوری سلول‌های مزانشیمی، بیان IDO درسلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و سلول‌های مزانشیمی اندومتر در مواجهه با اینترفرون گاما نسبت به حالت بدون تیمار با روش ایمنوسیتو شیمی ارزیابی شد. سلول‌ها در پاساژ ۳ تا ۵ برای انجام تست مورد استفاده قرار گرفتند.

جهت آنالیز بیان پروتئین IDO سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و اندومتر در پلیت ۹٦ خانه کشت داده شد و پس از رسیدن به تراکم مناسب، اینتر فرون گاما به میزان ۱۰۰ IU/ml و۵۰۰ IU/ml به سلول‌ها اضافه گردید و به مدت ۷۲ ساعت با آن کشت داده شدند. پس از تیمار با اینترفرون به‌مدت ۷۲ ساعت، محیط کشت از چاهک‌های پلیت ۹٦ خانه خارج شد، سلول‌ها دو بار با بافر فسفات (PBS) شستشو داده شدند و با استفاده از پارافرمالدئید ٤ درصد در دمای اتاق و به مدت ۲۰ دقیقه تثبیت گردید. مجدداً شستشوی سلول‌ها با بافر فسفات (دوبار، هر بار پنج دقیقه) انجام شد. برای نفوذ پذیر نمودن سلول‌ها نسبت به آنتی بادی، ۱۰۰ Triton X- ۰,۲ % اضافه گردیدو در دمای اتاق و به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. شستشوی سلول‌ها با بافر فسفات (سه بار، هر بار پنج دقیقه) انجام شد. سلول‌ها با محلول BSA/ PBS۳% بلاک گردید و سپس آنتی بادی اولیه محلول در BSA/ PBS۱/۵% به چاهک‌های مربوطه اضافه گردید و به‌صورت یک شب (Overnight) در یخچال انکوبه شد. شستشوی سلول‌ها با بافر فسفات (دوبار، هر بار پنج دقیقه) انجام شد، آنتی بادی ثانویه محلول در BSA/ PBS۱/۵% در شرایط تاریکی به چاهک‌های مربوطه اضافه شد و به مدت ۱-۲ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت و پس از شستشوی مجدد با بافر فسفات، DAPI (٤′، – دی آمیدینو – ۲– فنیل اندول ۱:۵۰۰) به چاهک‌ها افزوده شد و پس از ۵–۱۰ دقیقه سلول‌ها با میکروسکوپ اینورت فلورسنت مورد ارزیابی قرار گرفت و با بزرگنمایی‌های X ۲۰ در میدان‌های دید مختلف تصویر تهیه گردید. آنتی‌بادی اولیه، آنتی‌بادی پلی کلونال علیه IDO بود که در خرگوش تولید شده بود (اهدایی جناب آقای دکتر زرنانی– پژوهشگاه ابن سینا (۲۰۰: ۱)) و آنتی بادی

ثانویه را Anti Rabbit IgG FITC تشکیل می داد. سلول‌ها در حضور و عدم حضور اینترفرون گاما با این تست ارزیابی شدند.

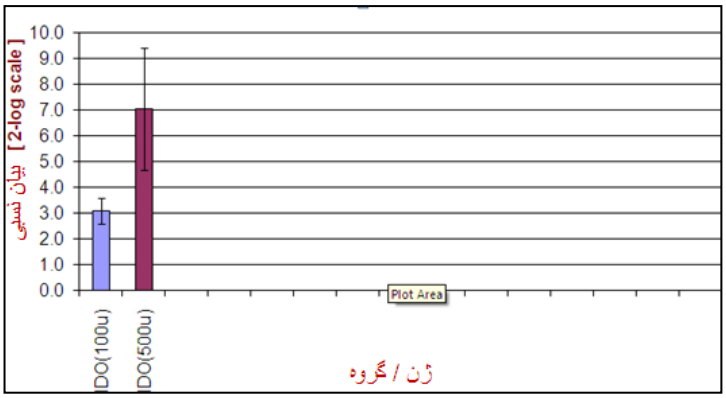
یافته‌ها

سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان با استفاده ازمحیط کشت άMEM و سلول‌های مزانشیمی اندومتردر محیط کشت DMEM در فلاسک T25 با تراکم ۲×۱۰^{۵} سلول پس از تیمار با اینترفرون به مدت ۷۲ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفتند.این سلول‌ها از نظر مورفولوژی ظاهری دوکی و کشیده داشته و پس از رسیدن به فاز لگاریتمی رشد نیاز به ۲-۳ بار پاساژ در هفته دارند. لازم به ذکر است سلول‌های مزانشیمی اندومتردر ساعات اول پس از تریپسینه به‌صورت پهن‌تر نسبت به سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان دیده می‌شوند.

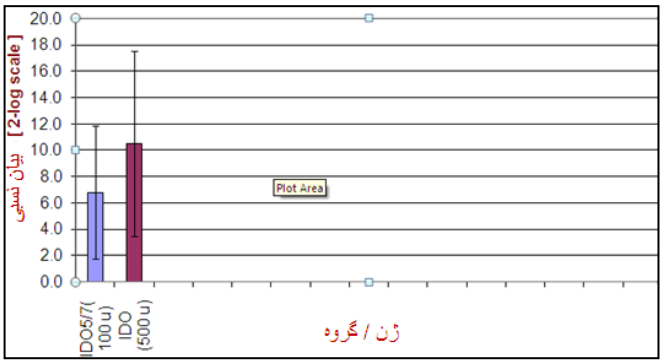
بیان ژن IDO در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و سلول‌های مزانشیمی اندومتر در مواجهه با اینترفرون گاما نسبت به حالت بدون تیمار با تکنیک Real-Time PCR:

الگوی بیان ایندول آمین ۲و۳ دی اکسیژناز درسلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و سلول‌های مزانشیمی اندومتر در مواجهه با اینترفرون گاما در مقایسه با گروه کنترل (بدون تیمار) مورد ارزیابی قرار گرفت. همان‌طور که در نمودار ۱ نشان داده شده ژن IDO درسلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در مواجهه با اینترفرون گاما بیان بالاتری را در مقایسه با گروه کنترل (بدون تیمار) دارا می‌باشد، به‌طوری‌که میزان بیان ژن IDO در گروه تیمار شده با اینترفرون (۱۰۰ IU/ml) مقدار ۸/۵۹۱ برابر افزایش داشت و افزایش بیان معنی‌داری را نشان می‌دهد (p=0.044) همچنین میزان بیان ژن IDO در گروه تیمار شده با اینترفرون (۵۰۰ IU/ml) مقدار ۵۰۳/۱۰۸ برابر افزایش نشان داد (p=0.044).

در سلول‌های مزانشیمی اندومتر میزان بیان ژن IDO در گروه تیمار شده با اینترفرون (۱۰۰ IU/ml)مقدار ۱۰۹/۷ برابر افزایش داشت و افزایش بیان معنی‌داری را نشان می‌دهد(p=0.001) همچنین میزان بیان ژن IDO در گروه تیمار شده با میزان(۵۰۰ IU/ml)مقدار ۶۰۶/۵ برابر افزایش نشان داد (p=0.001) (نمودار ۲).



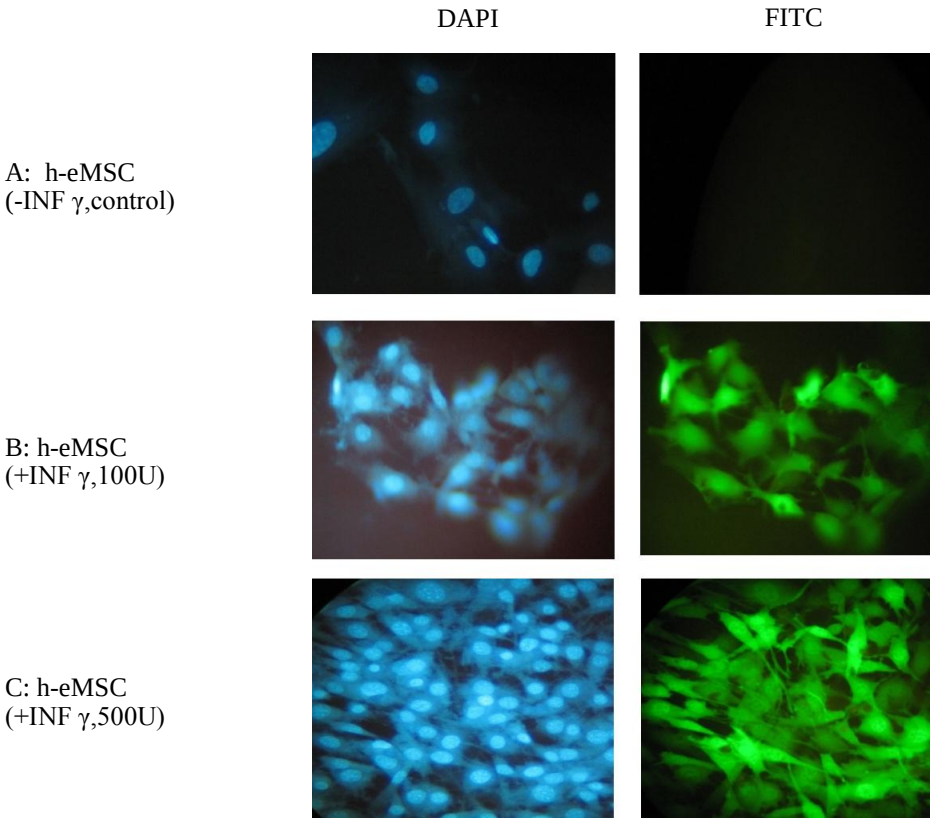
نمودار ۱- نمودار بیان نسبی ژنی توسط روش Quantitative Real Time PCR برای بیان ژن IDO درسلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در حالت مواجهه با اینترفرون گاما با غلظت های ۱۰۰ IU/ml و ۵۰۰ (محور افقی)در مقایسه با کنترل (p<0.05). داده‌ها بر اساس میانگین ± خطای معیار میانگین و برای سه ریپلیکیت در هر گروه نشان داده شده است.



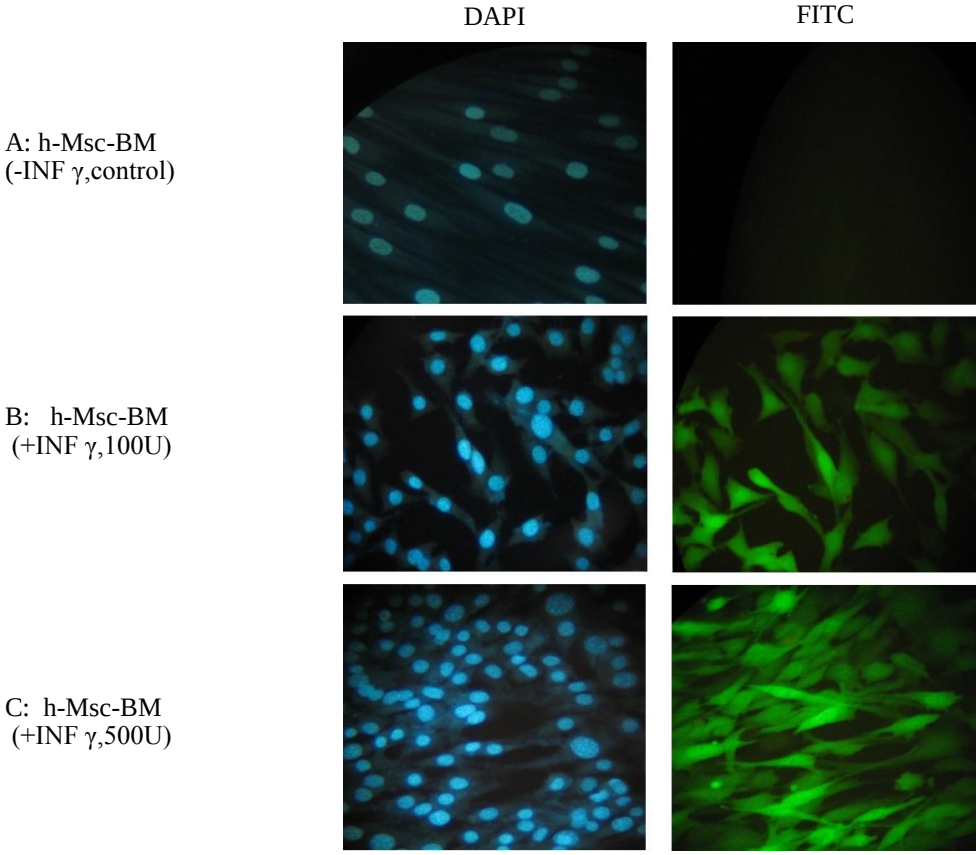
نمودار ۲- نمودار بیان نسبی ژنی توسط روش Quantitative Real Time PCR برای بیان ژن IDO در سلول‌های بنیادی مزانشیمی اندومتر در حالت مواجهه با اینترفرون گاما با غلظت های ۱۰۰ IU/ml و ۵۰۰(محور افقی) در مقایسه با حالت کنترل($p<0.05$). داده‌ها بر اساس میانگین ± خطای معیار میانگین و برای سه ریپلیکیت در هر گروه نشان داده شده است.

بررسی بیان پروتئین IDO با تکنیک ایمنوسیتوشیمی

سلول‌های مزانشیمی مشتق از اندومتر و مغز استخوان با تراکم ۲×۱۰^{۵} سلول در هرمیلی لیتر در پلیت های ۹۶ خانه کشت سلولی، کشت داده شد. در مجاورت INFγ (اینترفرون گاما) با مقادیر ۵۰۰ IU/ml و ۱۰۰ IU/ml به مدت ۷۲ ساعت تیمار شدند و با حالت بدون تیمار مقایسه گردید. نتایج نشان داد سلولها در شرایط تیمار با INFγ، ایندول آمین ۲و۳ دی اکسیژناز که پروتئینی داخل سیتوپلاسمی است را بیان می‌کنند (شکل ۲ و ۱).



شکل ۱- بیان پروتئین IDO در سلول‌های مزانشیمی اندومتر. آنتی بادی ثانویه متصل با رنگ فلورسنت (FITC) بوده و برای رنگ آمیزی هسته‌ها از رنگ DAPI استفاده شده است (تصویرها با بزرگنمایی x۲۰ نشان داده شده است) .A: سلول‌های گروه کنترل بدون مواجهه با اینترفرون، B و C: به‌ترتیب سلول‌های مزانشیمی در مواجهه با اینترفرون با مقادیر ۱۰۰IU/ml و IU/ml ۵۰۰. h-eMSC: سلول‌های مزانشیمی اندومتر انسانی، INF γ+ : اینترفرون گاما.



شکل ۲- بیان پروتئین IDO در سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان. آنتی بادی ثانویه ی متصل با رنگ فلورسنت (FITC) بوده و برای رنگ آمیزی هسته‌ها از رنگDAPI استفاده شده است (تصویرها با بزرگنماییx ۲۰ نشان داده شده است). A: سلول‌های گروه کنترل بدون مواجهه با اینترفرون، B وC: به‌ترتیب سلول‌های مزانشیمی در مواجهه با اینتر فرون با مقادیر ۱۰۰IU/ml و ۵۰۰ IU/ml. h-MSC-BM : سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان انسانی، γ INF+ : اینتر فرون گاما.

بحث و نتیجه‌گیری

پزشکی ترمیمی به کمک تجویز و کاربرد سلول‌های بنیادی روزبه روز در حال گسترش و توسعه می‌باشد. با این حال مشکلاتی مانند محدود بودن منابع سلولی و تحریک سیستم ایمنی گیرنده همواره موانع جدی در پیش روی این روش بوده‌اند. دسترسی به سایر منابع سلولی غیر از مغز استخوان شامل بافت چربی، پوست و خون محیطی و غیره می‌تواند بسیاری از مشکلات و محدویت‌های اخلاقی را در کاربرد سلول‌های بنیادی جنینی برطرف سازد. سلول‌های بنیادی واقع در بافت‌های بالغ مدت‌ها به حالت تمایز نیافته در لابلای سلول‌های بالغ حضور دارند و در شرایط جداسازی و کشت آزمایشگاهی همچنان قادر به تجدید و خود تکثیری می‌باشند. هرچند که دغدغه امکان ایمنی‌زایی آنها در بدن افراد گیرنده متعاقب پیوند هنوز مطرح می‌باشد. انتخاب منبعی که بتواند سلول‌های با ایمونوژنیسیته کم در اختیار قرار دهد، اهمیت بسیار ویژه‌ای دارد در این راستا خاصیت ایمونومودولاتوری سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخوان مورد توجه بوده و امروزه به عنوان منبعی در سلول درمانی از آن استفاده می‌شود [۵] .

سلول‌های بنیادی مزانشیمی اندومتر اخیرا مورد توجه قرار گرفته است. این سلول‌ها به‌دلیل مواجهه با جنین در طول زمان بارداری ممکن است در فرایند تحمل جنین نقش اساسی داشته باشند [۸-۱۰].

در بیماری دیابت که در آن حمله به سلول‌های خودی توسط سلول‌های ایمنی منجر به ایجاد بیماری می‌شود، تزریق سلول‌های بنیادی می‌تواند با تحریک ترشح انواع مختلفی از سایتوکاین‌ها و عوامل رشد باعث رفع یا کاهش

آسیب سلول‌های پانکراس شود لذا استفاده از سلول‌های بنیادی با خاصیت تعدیل کنندگی سیستم ایمنی می‌تواند راهکاری نوین و قابل استفاده در این زمینه باشد. با توجه به جایگاه آناتومیکی سلول‌های بنیادی اندومتر که آنها را در مواجه با جنین قرار می‌دهد تصور می‌شود این سلول‌ها عامل تولید فاکتورهای مهار ایمنی در طول زمان بارداری جهت تحمل جنین باشند. اگرچه فرایندهای مولکولی سیستم ایمونومودولاتوری هنوز به درستی شناخته نشده‌اند با این حال مولکول ایندول آمین دی اکسیناژ به دلیل فعالیت کاتالیتیکیش در تخریب تریپتوفان به‌عنوان کاندید مناسبی در کاهش واکنش‌دهی سلول‌های لنفوسیتی در پاسخ به آنتی‌ژن مطرح است [۱۷]. مطالعه حاضر با هدف مقایسه بیان ایندول آمین ۲و۳ دی اکسیژناز در سلول‌های مزانشیمی اندومتر و سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان سعی در معرفی سلول‌هایی با خاصیت ایمنومودولاتوری در جهت کاربرد بالینی نموده است.

درمطالعه حاضر، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و سلول‌های مزانشیمی اندومتر در پاساژ ۳ تا ۵ برای انجام تست انتخاب شدند. نتایج تست‌های ایمنوسیتو شیمی و Real Time PCR نشان داد که بیان ایندول آمین ۲و۳ دی اکسیژناز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در مواجهه با سایتوکاین اینترفرون گاما نسبت به حالت بدون مواجهه با سایتوکاین افزایش داشته است. این یافته‌ها با نتایج دیگر محققین در این زمینه مطابقت داشت [۲۱]. همچنین نتایج تست‌های ایمنوسیتو شیمی و Real Time PCR در مورد سلول‌های مزانشیمی اندومتر نشان داد که بیان ایندول آمین ۲و۳ دی اکسیژناز در این سلول‌ها نیز در مواجهه با سایتوکاین اینترفرون گاما نسبت به حالت بدون مواجهه با سایتوکاین افزایش داشته است. این نتیجه تاکنون توسط گروه‌های دیگر به‌دست نیامده و برای اولین بار گزارش می‌شود.

با وجود تمام مزایای ذکر شده برای این که سلول‌های مزانشیمی اندومتر وارد مراحل بالینی شوند لازم است که مطالعاتی در مورد تأثیر آنها روی سلول‌های مختلف بدن و به‌ویژه سلول‌های سیستم ایمنی صورت گیرد. مطالعات انجام شده در این زمینه انگشت شمار است. در یکی از اولین مطالعاتی که در مورد این سلول‌ها در سال ۲۰۱۲ در مورد ظرفیت ایمنومودولاتوری انجام شد نشان داده شد که این سلول‌ها خاصیت ایمنومودولاتوری از خود نشان می‌دهند [۱۵].

در مطالعه‌ای که توسط Spitzer و همکاران در سال ۲۰۱۲ صورت گرفت پتانسیل کلونوژنیک، چند توانی و موقعیت کنار عروقی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی اندومتر مورد بررسی قرار گرفت و بررسی نقشه بیان ژن در مورد این سلول‌ها منجر به آشکار شدن این مساله گردید که سلول‌های بنیادی مزانشیمی اندومتر دارای فنوتیپی خود تجدید شونده و چندتوان هستند و خاصیت ایمنومودولاتوری و لانه گزینی دارند. همچنین آنها نشان دادند که دودمان مشترکی برای سلول‌های مزانشیمی و استرومایی اندومتر وجود دارد [۱۵].

به‌طور خلاصه این مطالعه اختلاف افزایشی بیان IDO در سلول‌های بنیادی مزانشیمی اندومتر در مقایسه با سلول‌های بنیادی مغز استخوان را نشان داده که این یافته می‌تواند اشاره به پتانسیل بالای سلول‌های بنیادی اندومتر در مهار سیستم ایمنی در هنگام پیوند داشته باشد و این سلول‌ها را به‌عنوان کاندید مناسبی در سلول درمانی مطرح می‌نماید.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بدین‌وسیله از جناب آقای دکتر امیر حسن زرنانی بابت تامین آنتی بادی IDO و جناب آقای دکتر جعفر آی بابت تامین سلول‌های بنیادی اندومتریال کمال قدردانی و تشکر را می‌نمایند.

مأخذ

1. Cortesini R. Stem cells, tissue engineering and organogenesis in transplantation. Transpl Immunol. 2005; 15(2):81-9.
2. Limbert C, Path G, Jakob F, Seufert J. Beta-cell replacement and regeneration: Strategies of cell-based therapy for type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2008; 79(3):389-99.
3. Baharvand H, Jafary H, Massumi M, Ashtiani SK. Generation of insulin-secreting cells from human embryonic stem cells. *Dev Growth Differ* 2006; 48(5):323-32.
4. D'Amour KA, Bang AG, Eliazer S, Kelly OG, Agulnick AD, Smart NG, et al. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2006; 24(11):1392-401.
5. Dazzi F, Horwood NJ. Potential of mesenchymal stem cell therapy. *Curr Opin Oncol* 2007; 19(6):650-5.
6. Krampera M, Pasini A, Pizzolo G, Cosmi L, Romagnani S, Annunziato F. Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6(4):435-41.
7. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2003; 31(10):890-6.
8. Meng X, Ichim TE, Zhong J, Rogers A, Yin Z, Jackson J, et al. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *Journal of Translational Medicine* 2007; 5(1):57.
9. Wolff EF, Wolff AB. Demonstration of multipotent stem cells in the adult human endometrium by in vitro chondrogenesis. Reproductive Sciences. 2007;14(6):524.
10. Gargett CE, Masuda H. Adult stem cells in the endometrium. *Molecular human reproduction* 2010; 16(11):818.
11. Ernst Knobil JDN. *Physiology of Reproduction, Oviduct and endometrium: cyclic changes in primate oviduct and endometrium*. 3rd ed: Academic Press; 2005.
12. Chan RW, Schwab KE, Gargett CE. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biol Reprod* 2004; 70(6):1738-50.
13. Gargett CE, Schwab KE, Zillwood RM, Nguyen HP, Wu D. Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. *Biol Reprod* 2009; 80(6):1136-45.
14. Schwab KE, Gargett CE. Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Hum Reprod* 2007; 22(11):2903-11.
15. Spitzer TL, Rojas A, Zelenko Z, Aghajanova L, Erikson DW, Barragan F, et al. Perivascular human endometrial mesenchymal stem cells express pathways relevant to self-renewal, lineage specification, and functional phenotype. *Biol Reprod* 2012; 86(2):58.
16. Makrigiannakis A, Zoumakis E, Kalantaridou S, Mitsiades N, Margioris A, Chrousos GP, et al. Corticotropin-releasing hormone (CRH) and immunotolerance of the fetus. *Biochemical pharmacology* 2003; 65(6):917-21.
17. Kudo Y, Boyd CA. Human placental indoleamine 2,3-dioxygenase: cellular localization and characterization of an enzyme preventing fetal rejection. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1500(1):119-24.
18. Mellor AL, Munn DH. Tryptophan catabolism prevents maternal T cells from activating lethal anti-fetal immune responses. *J Reprod Immunol* 2001; 52(1-2):5-13.
19. Widner B, Ledochowski M, Fuchs D. Interferon-gamma-induced tryptophan degradation: neuropsychiatric and immunological consequences. *Curr Drug Metab* 2000; 1(2):193-204.
20. Dang Y, Dale WE, Brown OR. Comparative effects of oxygen on indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan 2,3-dioxygenase of the kynurenine pathway. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(4):615-24.
21. Croitoru-Lamoury J, Lamoury FM, Caristo M, Suzuki K, Walker D, Takikawa O, et al. Interferon-gamma regulates the proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells via activation of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO). *PLoS One* 2011; 6(2):e14698.

EXPRESSION OF INDOLEAMINE 2 3-DIOXYGENASE IN ENDOMETRIAL MESENCHYMAL STEM CELLS TREATED WITH GAMMA INTERFERON

Leila Eini[1,] Negar Naghash1, Bagher Larijani[2], Jafar Ai[3], Keivan Majidzadeh[4], Esmaeil Sadroddiny[5*], Kobra Omidfar[1]

1. *Biosensor Research Center, Endocrinology and Metabolism Molecular -Cellular Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
2. *Endocrinology and Metabolism Research Center, Endocrinology and Metabolism Clinical Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
3. *Department of Tissue engineering, School of Advance Technologies in medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
4. *Cancer Genetics Research Group, Breast Cancer Research Center (BCRC), ACECR, Tehran, Iran*
5. *Department of Medical Biotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical sciences, Tehran, Iran*

ABCTRACT

Background: Mesenchymal stem cells (MSCs), also known as mesenchymal stromal cells, are considered as an important source of adult stem cells in tissue engineering and cell therapy. They are present in various tissues such as, endometrium as the supportive cells. According to anatomical position of endometrial mesenchymal stem cells that put them in neighborhood of the fetus, they may have a significant role in fetus tolerance during pregnancy.
This study was conducted to evaluate the molecular mechanism of immunosuppressive affect of endometrial mesenchymal stem cells.
Methods: Mesenchymal Cells from bone marrow and endometrium were cultured at density of 2×10^5 cells/ml at presence of 100IU/ml and 500IU/ml INF-γ (IFN-gamma) and expression of indoleamine 2 3-dioxygenase (IDO) were studied after 72 hours by real-time PCR and immunocytochemistry.
Results: The study showed that IDO expression in cells exposed to IFN-γ was increased compared to the cells in the absence of IFN-γ ($p<0.05$). Additionally, up regulation of IDO expression was higher in endometrial cells than bone marrow cells.
Conclusion: From these results it is concluded that endometrial mesenchymal stem cells may be used as a good candidate for cell therapy.

Keywords: Mesenchymal stem cells (MSCs), Indolamine 2,3dioxygenase (IDO), Endometrial mesenchymal stem cell, Inhibit the immune system ASSOCI

* Department of Medical Biotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical sciences, Tehran, Iran, Tel: +98 (0)21 88991119-24, Fax: +98 (0)21 88991117, Email: Sadroddiny@tums.ac.ir