

The Study of Differential and Behavioral Characteristics of Manipulated Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells by Lentiviral Vector

Bahman Soufiani K*

Department of Laboratory Sciences and Microbiology, Faculty of Medical Sciences, Tabriz Medical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

* *Corresponding author.* Tel: +984136374107, Fax: +984136370944, E-mail: k_bahman@iaut.ac.ir

Received: May 31, 2022 Accepted: Aug 23, 2022

ABSTRACT

Background & objectives: Low immunogenicity and targeted migration of mesenchymal stem cells to inflammatory sites have introduced these cells as the best vehicle for the delivery of gene or therapeutic products. Lentiviral vectors can be used as an efficient vehicle for inserting ectopic genes into stem cells. Therefore, the evaluation of the effect of lentiviral vectors on the identity, behavior and functional characteristics of the stem cells can show that vectors are safe tools in cell manipulation and gene therapy.

Methods: At first, three vectors of lentivirus were added to HEK-293T cells using calcium phosphate method. After confirming the expression of GFP protein in more than 80% of HEK-293T cells, viral supernatant was collected and concentrated. Human adipose-derived mesenchymal stem cells (hASCs) were transduced with condensed viruses. After the elimination of the non-transduced cells by puromycin, transduced hASCs were evaluated for immunophenotyping and differentiation to adipocyte and osteocyte. Behavioral characteristics such as viability, migration and invasion were analyzed using MTT and transwell methods, respectively.

Results: In the current study, there was no significant difference in the expression of CD29, CD34, CD73 and differentiation to adipocyte and osteocyte in the test group when compared to the control group. Moreover, there was no significant difference between two study groups in the behavioral characteristics such as proliferation, invasion and migration.

Discussion: The findings of this study declare that lentiviral vectors do not have adverse effects on the identity and functional characteristics of stem cells. Therefore, they can be used in gene manipulation of the target cell.

Keywords: Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell; Lentiviral Vector; Gene Therapy

بررسی ویژگی‌های تمایزی و رفتاری سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسانی دستکاری شده با حامل لنتی ویروسی

کتابون بهمن صوفیانی*

گروه علوم آزمایشگاهی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۱۳۶۳۷۴۱۰۷ فاکس: ۰۴۱۳۶۳۷۰۹۴۴ پست الکترونیک: k_bahman@iaut.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: ایمونوژنیسیته کم و مهاجرت هدفمند سلول‌های بنیادی مزانشیمی به مناطق انتهایی، این سلول‌ها را به بهترین وسیله برای رساندن محصولات ژنی و یا درمانی معرفی نموده است. به منظور الحاق ژن اکتوپیک به داخل سلول‌های بنیادی، وکتورهای لنتی ویروسی بعنوان یکی از ابزارهای کارآمد مطرح می‌گردند. لذا ارزیابی تاثیر حامل‌های لنتی ویروسی بر ویژگی‌های هویتی، رفتاری و عملکردی سلول‌های بنیادی می‌تواند ایمن بودن استفاده از وکتورها را در دستکاری سلولی و ژن تراپی نشان دهد.

روش کار: در ابتدا سه وکتور لنتی ویروسی با روش کلسیم فسفات بر روی سلول‌های HEK-293T اضافه گردید. پس از تأیید بیان پروتئین سیر فلورسنتی در بیش از ۸۰ درصد سلول‌های HEK-293T، سوپ ویروسی جمع‌آوری و تغلیظ شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی انسانی (hASCs) با ویروس تغلیظ شده ترانسفکت شدند. پس از حذف سلول‌های ترانسدیوس نشده با پرومیسین، سلول‌های hASC ترانسدیوس شده از نظر ایمونوفنوتایپینگ و تمایز به آدیپوسایت و استئوسایت مورد ارزیابی قرار گرفتند. ویژگی‌های رفتاری مانند زنده بودن، مهاجرت و تهاجم به ترتیب با روش MTT و Transwell مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در مطالعه حاضر تفاوت معنی‌داری در بیان شاخص‌های تمایزی CD29، CD34، CD73 و تمایز به بافت استخوانی و چربی در بین دو گروه تست و کنترل دیده نشد. همچنین در بررسی ویژگی‌های رفتاری نظیر قدرت تکثیر، تهاجم و مهاجرت سلول‌های بنیادی، تفاوت معنی‌داری بین دو گروه مورد مطالعه وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان داد که وکتور لنتی ویروسی اثرات سوئی بر ویژگی‌های هویتی و عملکردی سلول‌های بنیادی ندارد. بنابراین می‌تواند در دستکاری ژنی سلول هدف مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسانی، وکتور لنتی ویروس، ژن درمانی

دریافت: ۱۴۰۱/۳/۱۰ پذیرش: ۱۴۰۱/۶/۱

مقدمه

سه رده آدیپوسایت، استئوسایت و کندروسایت شناسایی شدند [۱،۲]. کاپلان^۳ اثبات نمود که بازیافت مفصل و استخوان بوسیله MSC و محیط احاطه‌کننده MSC القا می‌شود. بنابراین واژه MSC پس از کار کاپلان و همکاران رایج شد [۳].

سلول‌های بنیادی مزانشیمی^۱ (MSCs) نخستین بار در سال ۱۹۶۸ توسط فریدن اشتاین^۲ به عنوان جمعیت سلولی چسبان و شبه فیبروبلاستی با قدرت تمایز به

^۱ Mesenchymal Stem Cells

^۲ Friedenstien

^۳ Caplan

کمک تحریکی مانند CD80، CD86 و یا CD40 از قدرت تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی برخوردار نمی‌باشند. این ویژگی‌های منحصر به فرد سبب شده است که کاربرد این سلول‌ها در پیوندهای آلوتزیک مطرح گردد [۷]. MSCها همچنین از ویژگی‌های عملکردی و تعدیل‌کنندگی سیستم ایمنی برخوردار می‌باشند، بطوری که سلول‌های MSC قادرند عملکرد سلول‌های ایمنی را در پی واکنش با سلول‌های T، B و سلول‌های دندریتیک تنظیم کنند [۸-۱۰].

مهاجرت هدفمند سلول‌های بنیادی به مناطق التهابی، در پاسخ به فاکتورهای التهابی و سایتوکاین‌ها، این سلول‌ها را به بهترین ابزار کارآمد برای رساندن ملکول‌ها و یا فاکتورهای مختلف به جایگاه‌های التهابی معرفی نموده است. لذا برای انتقال ژن‌های مختلف توسط سلول‌های MSC، سیستم‌های کارآمدی نظیر وکتورهای ویروسی مطرح می‌گردد. لنتی ویروس‌ها از جمله وکتورهای کارآمدی می‌باشند که با وارد کردن ژن نابجا^۷ به ژنوم سلول بنیادی مزانشیمی می‌توانند به بیان دائمی ژن مربوطه در سلول هدف منجر شوند. در پی الحاق ژن نابجا به ژن سلول هدف این سوال مطرح می‌گردد که آیا وکتور لنتی ویروسی می‌تواند اثرات سوئی بر ویژگی‌های عملکردی و رفتاری سلول بنیادی مزانشیمی داشته باشد؟ به‌منظور پاسخ‌دهی به این سوال این ضرورت احساس می‌شود که ویژگی‌های رفتاری سلول‌های ترانسداکت‌شده مورد ارزیابی قرار گیرد تا با نشان‌دادن عدم تاثیرگذاری وکتورهای ویروسی بر ماهیت سلول‌های بنیادی مزانشیمی، این وکتورها در دستکاری‌های سلولی با اطمینان مورد استفاده قرار گیرند.

MSCها می‌توانند از هر بافتی نظیر پلاستما، خون بندناف، مایع آمنیوتیک، مغز استخوان، بافت چربی و کبد بدست آیند. تخمین زده می‌شود که MSCها تقریباً ۰/۰۱-۰/۰۱ درصد از سلول‌های هسته‌دار مغز استخوان را تشکیل می‌دهند که برخلاف تعداد کم MSCها، در طی روند کشت آزمایشگاهی می‌توانند در عرض ۱۰-۸ هفته به تعداد مناسبی افزایش یابند [۴،۵].

تفاوت در تعیین ویژگی‌های MSC در بین محققین سبب گردید تا استانداردهایی از سوی ISCT^۱ برای MSCهای انسانی تعیین گردد تا در تمامی مطالعات آزمایشگاهی و نیز مطالعات پیش بالینی در نظر گرفته شود [۶] که این موارد شامل: ۱) MSCها از قدرت چسبندگی به فلاسک کشت سلولی در شرایط کشت استاندارد برخوردار باشند. ۲) بیش از ۹۵ درصد جمعیت سلولی از لحاظ بیان شاخص‌های تمایزی^۲ یعنی CD105، CD73 و CD90 مثبت و از لحاظ بیان CD14، CD34، CD45 و یا CD11b، CD19، CD79a و HLA-II منفی باشند. ۳) این سلول‌ها، از قدرت تمایز به سه رده آدیپوسایت، استئوسایت و کندروسایت در محیط‌های تمایزی را دارا باشند.

سلول درمانی در دهه‌های اخیر در مطالعات پیش بالینی، درون تنی^۳، برون تنی^۴ و نیز مطالعات ارزیابی بالینی^۵ کاربرد وسیعی را پیدا کرده است. بطوری که سلول‌های بنیادی مزانشیمی با توجه به ویژگی‌های بیولوژیکی بی‌نظیرشان به عنوان یکی از موضوعات جذاب در پزشکی بازساختی مطرح می‌گردند.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی به خاطر بیان کم ملکول‌های کمپلکس سازگاری نسجی اصلی^۶ (MHC) کلاس I و فقدان عرضه MHC کلاس II و ملکول‌های

¹ International Society for Cellular Therapy

² Cluster of Differentiation

³ In vivo

⁴ In vitro

⁵ Clinical Trail

⁶ Major Histocompatibility Complex

⁷ Ectopic

روش کار

کشت رده‌های سلولی

Human Embryonic Kidney 293 Cell Line سلول‌های HEK-293T از بانک سلولی انیستیتو پاستور تهیه شد. این سلول‌ها با استفاده از محیط DMEM^۱ High Glucose همراه با FBS^۲ دکمپلمانه ده درصد کشت داده شدند.

Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسانی (hASCs) از سازمان انتقال خون ایران تهیه گردید. سلول‌ها با استفاده از محیط DMEM-F12 همراه با FBS دکمپلمانه ده درصد کشت داده شدند. فلاسک هر دو رده سلولی به دمای 37°C با دی اکسید کربن ۵ درصد منتقل و انکوبه شد. سلول‌های MSC به دو دسته ترانسداکت شده (تست) و ترانسداکت نشده (کنترل) تقسیم شدند.

ترانسفکشن و ترانسداکشن سلول‌های HEK-293T با

وکتور لنتی ویروس

سلول‌های HEK-293T به تعداد $10^5 \times 12$ در فلاسک T25 کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت به ترتیب با مقادیر 21 μg، 21 μg و 10.5 μg ازسازه لنتی‌ویروس PCDH (شرکت بیوساینس - ایالات متحده) به همراه دو پلاسمید ساختاری (psPAX، شرکت بیوساینس - ایالات متحده) و پوششی (pMD2، شرکت بیوساینس - ایالات متحده) و با روش کلسیم فسفات ترانسفکت شدند. ۱۶ ساعت پس از ترانسفکشن، سلول‌ها از لحاظ بیان ژن GFP^۳ در زیر میکروسکوپ اینورت فلورسنت‌دار مورد بررسی قرار گرفتند. با بیان پروتئین GFP در بیش از ۸۰ درصد سلول‌های HEK-293T در زیر میکروسکوپ اینورت، سوپ ویروسی در سه روز متوالی جمع‌آوری و اولتراسانتریفیوژ گردید. به منظور انجام ترانسداکشن، سوپ ویروسی تغلیظ شده بر جمعیت سلولی

HEK-293T در پلیت ۲۴ خانه‌ای اضافه گردید تا در روز چهارم سلول‌های ترانسداکت شده با دستگاه فلوسایتمتری مورد ارزیابی قرار گیرند.

ایمیونو فنوتایپینگ سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی انسانی (hASCs)

ابتدا سلول‌های hASC به کمک تریپسین از کف فلاسک جدا و سپس به کمک محیط کامل F12 خنثی، و پس از جمع‌آوری به داخل لوله فاکون منتقل و در دور 1500rpm سانتریفیوژ گردیدند. پس از خارج کردن قسمت روئی، رسوب سلولی در ۵۰۰ میکرولیتر PBS سرد به شکل سوسپانسیون سلولی و منفرد در آمد. 3×10^5 سلول با ۵ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های کونژوگه با فیکواریترین (ایالات متحده، BD Co) ضد CD29، CD34 و CD73 مجاور و بمدت ۲۰ دقیقه در دمای 4°C انکوبه گردیدند. نمونه‌ها پس از اضافه نمودن محلول ایزوتونیک با دستگاه فلوسایتمتری مورد خوانش قرار گرفتند. تعداد ۱۰۰۰۰ سلول در مقابل نمونه کنترل رنگ‌آمیزی نشده و بر اساس Mean Fluorescent Intensity آنالیز شدند. سه تکرار بیولوژیکی برای آنالیز شاخص‌های تمایزی انجام شد.

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی مشتق از

چربی انسانی (hASCs) به بافت استخوانی و چربی

در بررسی تمایز، ابتدا تعداد $10^3 \times 15$ سلول از هر نمونه به صورت تریپلیکت در پلیت‌های ۹ خانه‌ای و با ۵۰۰-۷۰۰ میکرولیتر از محیط DMEM کامل کشت داده شدند. در تراکم ۴۰ درصد، محیط کشت سلولی با محیط تمایزدهنده استخوان و چربی (ایده زیست Cat No: 1008, 1007) تعویض گردید. عمل تعویض محیط هر سه روز یکبار تکرار و این عمل به مدت سه هفته ادامه پیدا کرد. در پایان هفته سوم سلول‌ها با رنگ Oil Red و Alizarin Red رنگ‌آمیزی و در زیر میکروسکوپ به ترتیب از لحاظ تشکیل قطرات چربی و

⁴ Confluency

¹ Dulbecco's Modified Eagle Medium

² Fetal Bovine Serum

³ Green Fluorescent Protein

رسوبات کلسیم مورد بررسی قرار گرفتند. سه تکرار بیولوژیکی برای بررسی تمایز انجام شد.

ترانسداکت سلول‌های بنیادی مشتق از چربی انسانی (hASCs) با حامل لنتی ویروس

سلول‌های hASC در $MOI^1=20$ با ویروس‌های تغلیظ‌شده ترانسداکت گردیدند. سلول‌های ترانسداکت شده پس از ۴۸ ساعت در زیر میکروسکوپ اینورت فلورسنت‌دار از نظر شدت بیان GFP ارزیابی شدند. در روز چهارم و در ترانسداکشن بیش از ۸۰-۹۰ درصد، به منظور حذف سلول‌های ترانسداکت نشده، از آنتی بیوتیک پرومیسین استفاده شد. در روز ششم سلول‌ها برای بررسی ویژگی‌های هویتی و رفتاری مورد آنالیز قرار گرفتند.

تست MTT

تعداد 8×10^3 سلول بنیادی مزانشیمی ترانسداکت‌شده (تست) و یا ترانسداکت‌نشده (کنترل) در پلیت ۹۶ خانه‌ای با ۱۰۰ میکرولیتر محیط DMEM-F12 با ۱۰٪ FBS کشت داده شدند. پس از گذشت ۲۰ ساعت، محیط روئی پلیت با محلول 3-2-5 Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) (غلظت ۵ mg/ml) جایگزین گردید و ظرف کشت در تاریکی و در داخل انکوباتور $37^{\circ}C$ با دی اکسید کربن ۵ درصد قرار گرفت. پس از گذشت ۴ ساعت محیط داخل هر خانه خارج و با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول DMSO جایگزین و به آرامی پی پتاژ گردید تا بلورهای فورمازان (MTT-Formazan) به طور کامل انحلال یابند. جذب نوری^۲ هر خانه در طول موج ۵۷۰ نانومتر به کمک دستگاه ELISA Reader خوانش شد. هر نمونه در ۵ تکرار بیولوژیکی مورد ارزیابی قرار گرفت.

تست (Invasion) Transwell

ابتدا سلول‌ها در شرایط بی‌غذایی^۳ یعنی در محیط کشت DMEM-F12 فاقد FBS بمدت ۲۴ ساعت در

پلیت ۴ خانه‌ای کشت داده شدند. پس از طی مدت زمان مورد نظر، سلول‌ها با Trypsin-EDTA ۰.۲۵٪ از کف ظرف کشت کنده و شمارش شدند. Transwell-Insert از شرکت Corning با Cat.No:3428 خریداری شد. جنس آن پلی‌کربنات و دارای منافذی با اندازه ۸ میکرومتر می‌باشد. به‌منظور ایجاد شرایطی شبیه ماتریکس خارج سلولی^۴ از ژلاتین ۱٪/۱ استفاده شد. بدین منظور کف Insert با ۱۵۰ میکرولیتر ژلاتین ۱٪/۱ استریل پوشانده و بمدت ۳ ساعت در انکوباتور $37^{\circ}C$ قرار داده شد. تعداد 2×10^4 سلول از محیط DMEM عاری از FBS به داخل Insert که با ژلاتین ۱٪/۱ استریل پوشانده شده بودند، منتقل و کاشته شد. سپس Insert در داخل پلیت ۲۴ خانه‌ای که شامل ۵۰۰ میکرولیتر از محیط DMEM-F12 با ۱۰٪ FBS بود قرار داده شد. پلیت ۲۴ خانه‌ای حاوی Insert به داخل انکوباتور $37^{\circ}C$ با دی اکسید کربن ۵ درصد منتقل گردید. پس از گذشت ۲۴ ساعت Transwell Insert سه مرتبه با PBS شستشو داده شد. سلول‌های مهاجرت کرده به قسمت زیرین Transwell Insert با اتانول ۷۰ درصد فیکس و سپس با رنگ کریستال ویوله رنگ‌آمیزی شدند. قبل از مشاهده سلول‌های رنگ‌آمیزی شده در زیر میکروسکوپ اینورت، با کمک سواب سلول‌های مهاجرت نکرده حذف گردیدند. ۵ زمینه^۵ میکروسکوپی برای هر نمونه شمارش شد.

تحلیل آماری

مقادیر متغیرهایی نظیر شاخص‌های تمایزی، تعداد سلول‌های مهاجر و میزان جذب نوری بر اساس $Mean \pm SD$ محاسبه و تحلیل آماری با آنوا دوطرفه^۶ و آزمون تی و با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism-6 انجام پذیرفت. $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

⁴ Extracellular Matrix

⁵ Field

⁶ Two-way ANOVA

¹ Multiplicity of Infection

² Optical Density

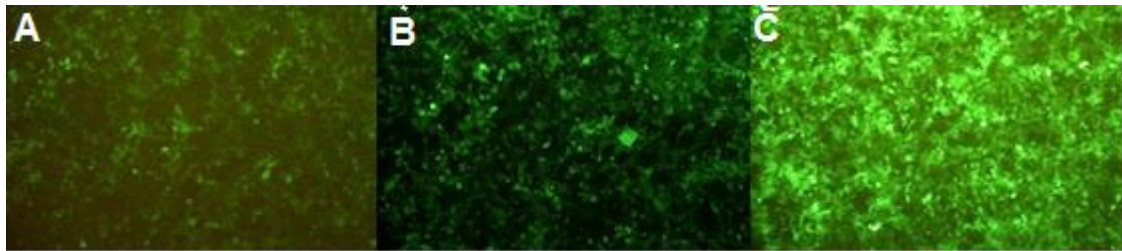
³ Starvation

یافته‌ها

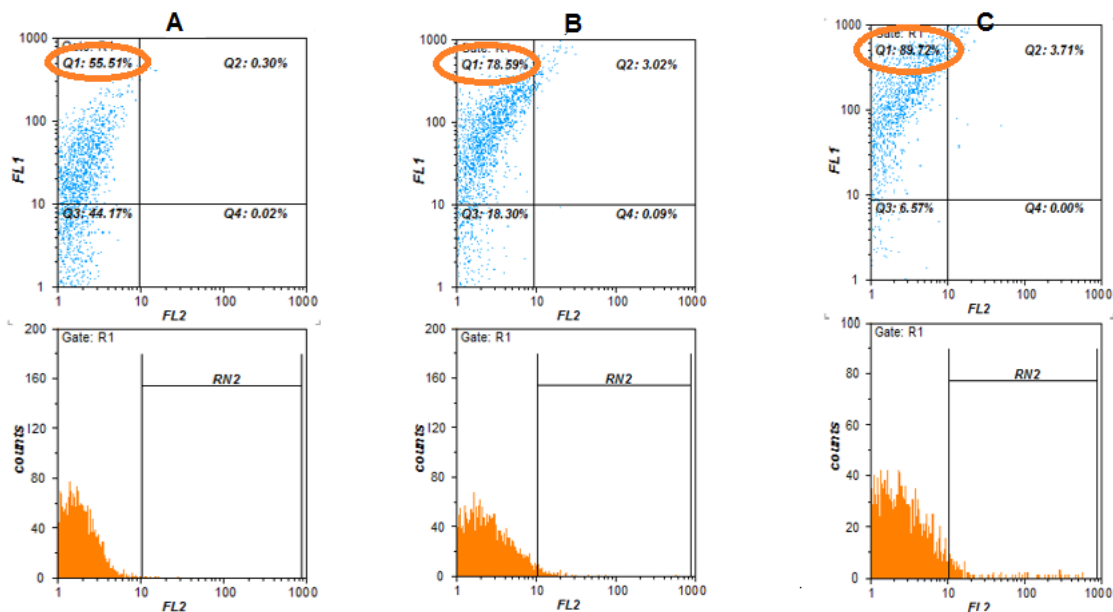
تأیید کیفیت ذرات لنتی ویروسی با روش
فلوسایتومتری

شکل ۱ ترانسداکت سلول‌های HEK-293T را با مقادیر ۱، ۴ و ۱۶ میکرولیتر را در روز دوم نشان می‌دهد. در ارزیابی سلول‌های ترانسداکت‌شده با

تکنیک فلوسایتومتری در روز چهارم مشاهده گردید (شکل ۲) که در مقادیر ۱، ۴ و ۱۶ میکرولیتر از حامل لنتی ویروسی، سلول‌های HEK-293T به ترتیب ۵۵/۵۱، ۷۸/۵۹ و ۸۹/۷۲ درصد ترانسدیوس شده بودند که نشانگر کیفیت و کارایی بالای ذرات ویروسی در ترانسداکشن سلول‌های فوق داشت.



شکل ۱. ترانسداکشن سلول‌های HEK-293T با مقادیر (A): ۱ میکرولیتر، (B): ۴ میکرولیتر، (C): ۱۶ میکرولیتر از ویروس تغلیظ شده و مشاهده با میکروسکوپ اینورت فلورسنت دار



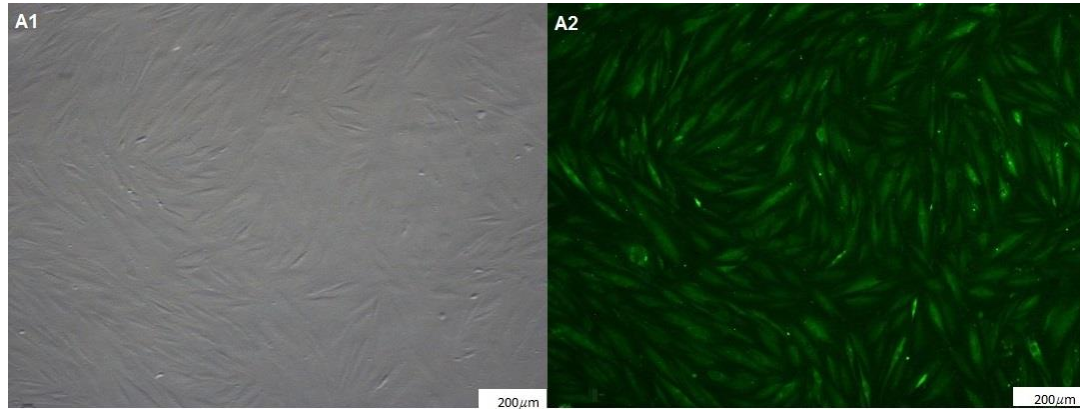
شکل ۲. درصد سلول‌های HEK-293T ترانسداکت شده با مقادیر (A) ۱ میکرولیتر، (B) ۴ میکرولیتر و (C) ۱۶ میکرولیتر از ویروس تغلیظ شده در روش فلوسایتومتری

تأیید سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی و عدم اثرگذاری وکتور لنتی ویروسی بر ایمونوفنوتایپینگ hASCs در تعیین و تأیید هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی (P3) علاوه بر قدرت چسبندگی به فلاسک کشت سلولی (شکل ۳)، مشاهده گردید که سلول‌های بنیادی

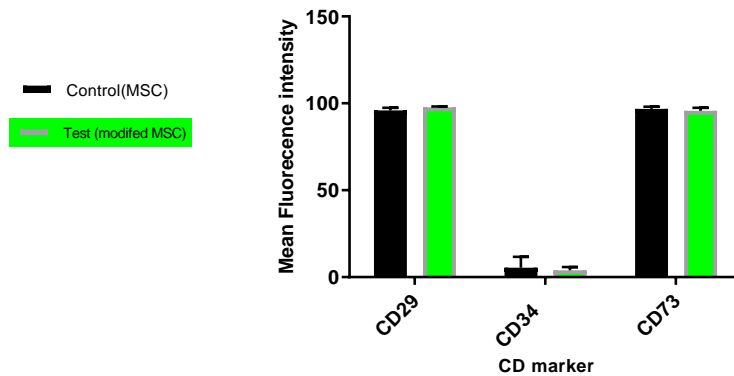
مورد نظر از لحاظ بیان شاخص‌های تمایزی یعنی CD34، CD73 و CD29 مطابق استانداردهای تعیین شده می‌باشند یعنی از نظر شدت بیان CD34 در حداقل و از لحاظ شدت بیان CD73 و CD29 بیشترین میزان بیان را دارند (شکل ۴).

کنترل (ترانسداکت نشده) ندارند. آنالیز آماری نشان داد که تفاوت معنی‌داری نیز از نظر شدت بیان CD های فوق بین دو گروه تست و کنترل با دستگاه فلوسایتومتری وجود ندارد (شکل ۴).

در بررسی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ترانسدیوس شده با وکتور لنتی ویروسی (گروه تست) با میکروسکوپ اینورت فلورسنت‌دار مشاهده گردید (شکل ۳) که سلول‌ها از لحاظ مورفولوژی و میزان چسبندگی به فلاسک کشت سلولی تفاوتی با گروه



شکل ۳. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی انسانی به صورت سلول‌های دوکی در زیر میکروسکوپ اینورت فلورسنت‌دار دیده می‌شوند. تصویر (A1) قبل از ترانسداکشن (کنترل)، تصویر (A2) پس از ترانسداکشن با وکتور لنتی ویروسی (تست)

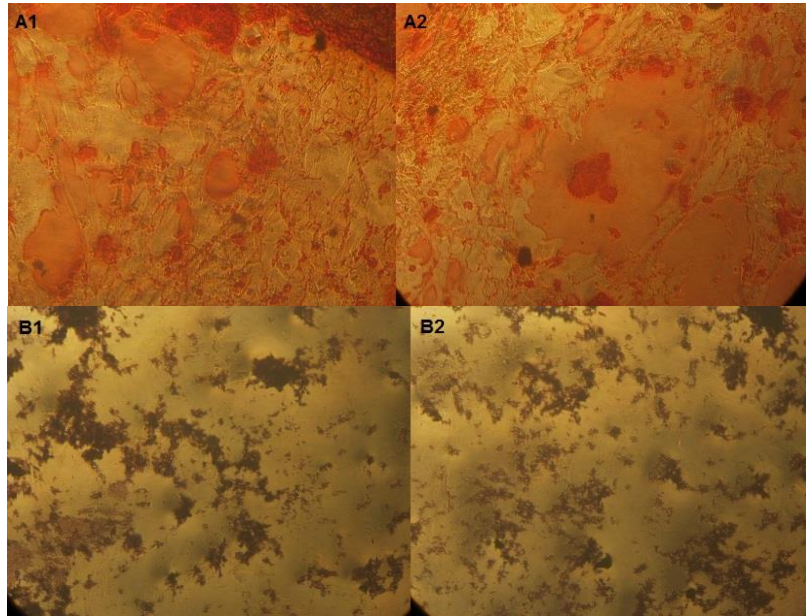


شکل ۴. ارزیابی نتایج ایمونوفلورسینس با تکنیک فلوسایتومتری و به کمک آنتی‌بادی‌های کوونزگه به فیکواریترین. آنالیز آماری شاخص‌های تمایزی براساس Mean Fluorescent Intensity نشان داد که تفاوت معنی‌داری در شدت بیان شاخص‌های تمایزی در بین دو گروه تست و کنترل وجود ندارد.

میکروسکوپ اینورت در hASC های ترانسداکت نشده (کنترل) و ترانسداکت شده با لنتی ویروس (تست) کاملاً مشهود بود (شکل ۵).

حفظ قدرت تمایز سلول‌های hASC ترانسداکت شده با وکتور لنتی ویروسی

در بررسی قدرت تمایز سلول‌های بنیادی، وجود قطرات چربی (A) و رسوبات کلسیم (B) پس از رنگ‌آمیزی با Oil Red و Alizarin Red در زیر



شکل ۵. ویژگی‌های تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی با میکروسکوپ اینورت نوری (10X). مشاهده رسوبات کلسیم پس از رنگ‌آمیزی با Alizarin Red در نمونه کنترل (A1) و نمونه تست (A2). مشاهده قطرات چربی پس از رنگ‌آمیزی با Oil Red در نمونه کنترل (B1) و نمونه تست (B2). قدرت تمایز به بافت استخوانی و چربی در نمونه تست مشابه نمونه کنترل، حفظ شده بود.

حفظ قدرت مهاجرتی در سلول‌های hASC

ترانسداکت شده با وکتور لنتی ویروس

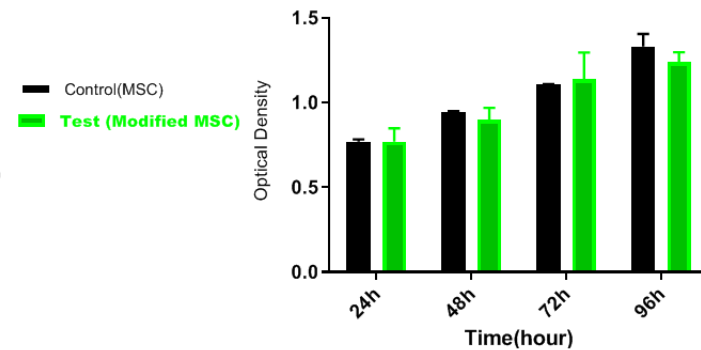
به منظور ارزیابی قدرت مهاجرت و تهاجم از روش شبیه‌سازی شده ماتریکس خارج سلولی استفاده شد. با استفاده از Transwell پوشیده شده با ژلاتین و رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله به بررسی سلول‌های مهاجر در زیر میکروسکوپ نوری اقدام گردید. در شمارش سلول‌های مهاجر پس از ترانسداکشن با وکتور لنتی ویروس در مقایسه با نمونه کنترل، تفاوت معنی‌داری در آنالیز آماری مشاهده نگردید (شکل ۷).

بررسی میزان رشد و زنده ماندن hASCs

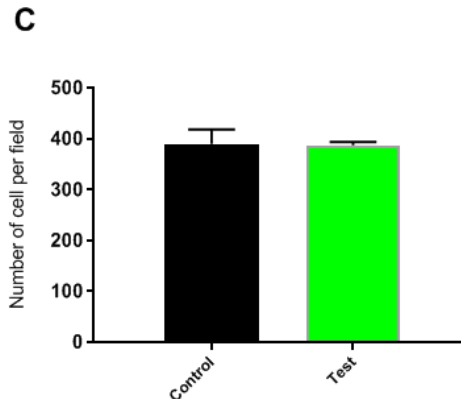
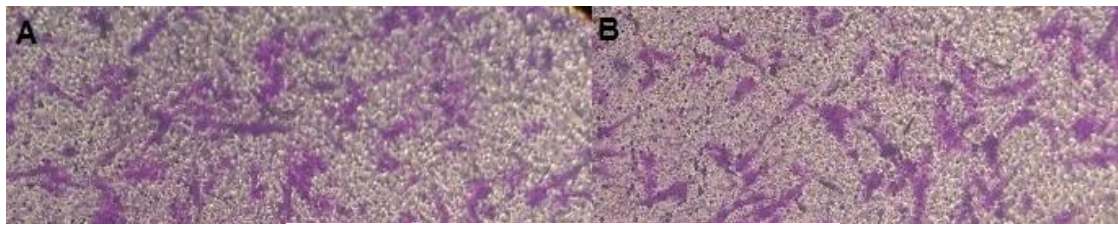
ترانسداکت شده با وکتور لنتی ویروس در روش

MTT

در بررسی میزان زنده ماندن مشاهده گردید که سلول‌های هر دو گروه تست و کنترل روند رو به رشدی را از ۲۴ ساعت به ۹۶ ساعت داشته‌اند که این وضعیت، عدم تاثیر اثرات مخرب سایتوتوکسیسیته وکتور لنتی ویروس بر سلول‌های hASC را نشان می‌دهد. آنالیز آماری نیز موید عدم تاثیرگذاری وکتور لنتی ویروس بر روند رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی را داشت (شکل ۶).



شکل ۶. نمودار ارزیابی زنده ماندن و رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی (hASCs) در دو نمونه مورد آزمایش در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت در تست MTT. تفاوت معنی‌داری در میزان رشد و زنده ماندن سلول‌ها در نمونه تست با کنترل در چهار بازه زمانی مشاهده نگردید.



شکل ۷. بررسی عبور سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی انسانی از بستر ژلاتینی ترانس ول در نمونه تست (A) و نمونه کنترل (B). تصویر C: نشانگر آنالیز آماری می‌باشد که تفاوت معنی‌داری را در عبور تعداد سلول‌های مهاجر از ماتریکس خارج سلولی در دو نمونه تست و کنترل نشان نداد.

بحث

روش‌های متداولی برای دستکاری سلول‌ها وجود دارد که به دو روش غیربیولوژیکی و بیولوژیکی تقسیم می‌شوند. روش‌های غیربیولوژیکی شامل روش‌های فیزیکی و شیمیایی می‌باشند که از شانس کمی برای انتقال ژن‌ها برخوردارند. این در حالی است که در روش بیولوژیکی و با استفاده از وکتورهای ویروسی درصد موفقیت انتقال ژن و الحاق آن به ژنوم میزبان با افزایش چشمگیری همراه است [۱۳، ۱۴]. نتایج مطالعه‌ای نشان داد که میزان بیان ژن نابجا در سلول MSC در استفاده از روش ترانسفکشن با لیپید نزدیک به ۴۰-۳۰ درصد می‌باشد. نتایج همین کار تحقیقاتی نشان داد که وکتورهای لنتی ویروسی در مقایسه با سایر روش‌های دستکاری نظیر آدنوویروسها،^۱ AAV، لیپوزوم‌ها و الکتروپوریشن، کارایی^۲ بالایی را در انتقال و بیان ترانس ژن‌ها در MSC داشته‌اند [۱۵].

سلول‌های بنیادی به علت داشتن ظرفیت‌های بالا به‌عنوان سلول مهم در مهندسی بافت و پزشکی بازساختی مطرح می‌شوند. قابلیت تکثیر بالای سلول‌های بنیادی مزانشیمی، پایداری ژنتیکی، ایمونوژنیسیته کم، سازگاری با اصول مهندسی بافت، قدرت تمایز به رده‌های مختلف و برخوردار از خصوصیت تنظیم سیستم ایمنی و قدرت مهاجرت بالا در پاسخ به عوامل موجود در محیط التهابی، این سلول‌ها را به بهترین کاندید برای اهداف درمانی تبدیل نموده است. اولین کارآزمایی بالینی که در سال ۱۹۹۵ بر روی ۱۵ بیمار دریافت‌کننده سلول‌های اتولوکوس انجام گرفت، موید کاربرد درمانی این سلول‌ها می‌باشد [۱۱]. محققین امروزه نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی می‌توانند به‌عنوان ابزاری کارآمد در انتقال فاکتورهای مختلف در راستای تقویت و یا تضعیف پاسخ‌های ایمنی و نیز درمان بیماری‌ها بکار روند [۱۲].

¹ Adeno Associated Virus

² Efficacy

فیروبلاستی، به رشد نرمال خود در مقایسه با سلول کنترل در محیط کشت ادامه می‌دهند. در بررسی ویژگی‌های تمایزی همچنین مشاهده گردید که ترانسداکشن سلول‌های بنیادی مزانشیمی تأثیری بر قدرت چسبندگی و ویژگی‌های تمایزی به سلول‌های چربی و استخوان ندارد که این خود می‌تواند نشانگر این مهم باشد که مسیرهای تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی تحت تأثیر ذرات ویروسی لنتی ویروسی قرار نگرفته‌اند. روند افزایش زنده‌مانی و تکثیر سلول‌های بنیادی در دو گروه سلول‌های بنیادی ترانسدیوس شده و یا نشده در آزمون MTT و هماهنگی آن با رشد حداکثری سلول‌های بنیادی در پاساژهای بعدی، عدم اثرگذاری وکتورهای لنتی‌ویروسی را بیش از پیش نشان می‌دهد. نتیجه یک مطالعه تحقیقاتی نشان داده است که سلول‌های بنیادی ترانسدیوس شده، بدون هیچ‌گونه تغییری در مورفولوژی، به رشد و گسترش خود ادامه می‌دهند [۱۹].

در کنار حفظ ویژگی‌های تأییدکننده استم سلی، حفظ ویژگی‌های زنده‌مانی، مهاجرتی و نیز عبور از ماتریکس خارج سلولی، از دیگر شاخص‌های مطرح در مورد کاربرد MSC دستکاری شده در انتقال ترانس ژن‌ها به مناطق هدف می‌باشد. شواهد روز افزونی وجود دارد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی قادر به مهاجرت و پیوندشدن^۵ در جایگاه‌های التهابی می‌باشد. MSCها مهمترین سلول‌هایی هستند که در پاسخ به پیام‌های آسیب و یا استرس‌های سلولی با رسپتورهای جابگزینی‌شان^۶ نظیر CXCR4، سلکتین‌ها و اینتگرین‌ها به مناطق توموری، التهابی و آسیب دیده وارد می‌شوند [۶،۵]. در ارزیابی قدرت مهاجرتی سلول بنیادی ترانسدیوس شده با روش ترانس ول مشاهده گردید که سلول‌های بنیادی، قدرت مهاجرتی و مهاجرتی خود را حفظ نموده‌اند. بنابراین می‌توان بیان

لنتی ویروس‌ها ابزارهای سودمندی برای انتقال ژن به سلول‌های در حال تقسیم، غیرتقسیم^۱ و حتی سلول‌های پیر می‌باشند [۱۵]. این وکتورها با وارد کردن ژن مورد نظر در ژنوم سلول میزبان به بیان طولانی ترانس ژن می‌توانند سبب گردند. استفاده از وکتورهای لنتی ویروسی در تحقیقات و پروتکل‌های ژن درمانی در سال‌های اخیر رشد چشمگیری را به خود اختصاص داده است. بطوری‌که استفاده از وکتورهای ویروسی در کارآزمایی بالینی سال ۲۰۱۱ بالغ بر ۱۲ درصد گزارش شده است [۱۶]. اگرچه وکتورهای لنتی ویروسی جایگاه خود را به عنوان ابزاری با ارزش و انعطاف‌پذیر برای انتقال ژن به دست آورده‌اند اما سوالات اساسی در این زمینه نظیر ایمن‌بودن، کم توکسیک بودن و همچنین عدم غیرفعال کردن سلول هدف توسط لنتی وکتورها از جمله سوالاتی است که باید مورد مطالعه قرار گیرد [۱۷]. در مطالعه‌ای که توسط نویسندگان و همکاران انجام شده بود [۱۸] برای ساخت ذرات ویروسی علاوه بر وکتور PCDH، از دو وکتور کمکی نیز یعنی psPAX و pMD2 استفاده شد. وکتور pMD2 با داشتن ژن VSV-G^۲ اتصال ذرات ویروسی به هر سلولی من جمله HEK-293T و سلول بنیادی مزانشیمی را سبب می‌شود. ترانسفکت کردن همزمان این سه وکتور به درون سلول بسته‌بندی‌کننده^۳ مناسبی نظیر سلول HEK-293T به تولید ذرات ویروسی منجر می‌شود که با مکانیسم جوانه‌زدن^۴ از سلول مورد نظر خارج می‌شوند [۱۸].

به‌دنبال تأیید کیفیت ذرات ویروسی تولیدی با روش فلوسایتومتری، ترانسداکشن سلول‌های بنیادی مزانشیمی در MOI=20 انجام شد [۱۸]. مطالعه حاضر نشان داد که در شرایط برون تنی، سلول‌های MSC ترانسدیوس شده با حفظ مورفولوژی شبه

¹ Dividing and Non-dividing

⁴ Vesicular Stomatitis Virus G

³ Packaging Cell

⁴ Budding Off

⁵ Engraft

⁶ Homing Receptor

تضعیف‌کننده‌ای بر ویژگی‌های رفتاری و هویتی سلول‌های بنیادی ندارد و می‌توان از این گونه حاملین برای وارد کردن ترانس ژن به ژنوم MSC در کاربردهای درمانی استفاده کرد.
(کد اخلاق: IR.TMU.REC.1395.500)

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع وجود ندارد.

کرد که وکتور لنتی ویروسی بر ویژگی‌های هویتی و بنیادی^۱ سلول‌های بنیادی تاثیر سوئی نداشته است. بطوری که نتایج مطالعه مک‌مان^۲ و همکاران با نتایج مطالعه فوق کاملاً همسو می‌باشد [۱۵].

نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان داد که ترانسداکشن سلول‌های بنیادی با وکتور لنتی ویروسی اثرات مخرب و

¹ Stemness

² McMahan

References

- 1- Fridenshtein AI, Petrakova KV, Kuralesova AI, Frolova GI. Precursor cells for osteogenic and hemopoietic tissues. Analysis of heterotopic transplants of bone marrow. Tsitologiya. 1968;10(5): 557-567. [Full text in Russian]
- 2- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues: cloning in vitro and retransplantation in vivo. Transplantation. 1974 Apr;17(4):331-40.
- 3- Caplan AI. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res. 1991 Sep;9(5):641-650.
- 4- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999 Apr;284(5411):143-7.
- 5- Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. Stem cells. 2010 Mar;28(3):585-96.
- 6- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006;8(4):315-317.
- 7- Guo M, Sun Z, Sun QY, Han Q, Yu CL, Wang DH, et al. A modified haploidentical nonmyeloablative transplantation without T cell depletion for high-risk acute leukemia: successful engraftment and mild GVHD. Biol Blood Marrow Transplant. 2009 Aug;15(8):930-937.
- 8- Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. Blood. 2007 Nov; 110(10):3499-506.
- 9- Weyand B, Dominici M, Hass R, Jacobs R, Kasper C. Mesenchymal stem cells: Basic and clinical application II: German, springer; 2013: 199-208.
- 10- Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, Kitagawa Y, Tompkins RG, Kobayashi N, et al. Mesenchymal stem cells: mechanisms of immunomodulation and homing. Cell transplant. 2010;19(6):667-79.
- 11- Otto WR, Wright NA. Mesenchymal stem cells: from experiment to clinic. Fibrogenesis Tissue Repair. 2011 Sept;4:20.
- 12- Hong IS, Lee HY, Kang KS. Mesenchymal stem cells and cancer: friends or enemies? Mutat Res. 2014 Oct;768:98-106.
- 13- McGinley L, McMahan J, Strappe P, Barry F, Murphy M, O'Toole D, et al. Lentiviral vector mediated modification of mesenchymal stem cells & enhanced survival in an in vitro model of ischaemia. Stem Cell Res Ther. 2011 Mar;2(12):1-18.
- 14- Escors D, Breckpot K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. Arch Immunol Ther Exp (warsz). 2010 Apr;58(2):107-19.

- 15- McMahon JM, Conroy S, Lyons M, Greiser U, O'shea C, Strappe P, et al. Gene transfer into rat mesenchymal stem cells: a comparative study of viral and nonviral vectors. *Stem Cells Dev.* 2006 Feb;15(1):87-96.
- 16- Tomás HA, Rodrigues AF, Alves PM, Coroadinha AS. Lentiviral Gene Therapy Vectors: Challenges and Future Directions. *Gene Therapy - Tools and Potential Applications.* InTech Publisher. 2013 Feb;287-317.
- 17- Kumar S, Chanda D, Ponnazhagan S. Therapeutic potential of genetically modified mesenchymal stem cells. *Gene Ther.* 2008 Mar;15:711-715.
- 18- Bahman Soufiani K, Pourfathollah AA, Nikougofar Zarif M, Arefian E. Gene manipulation of human adipose-derived mesenchymal stem cells by miR-34a. *Med Sci.* 2021 Spring;31(1):70-78. [Full text in Persian]
- 19- Lee K, Majumdar MK, Buyaner D, Hendricks JK, Pittenger MF, Mosca JD. Human mesenchymal stem cells maintain transgene expression during expansion and differentiation. *Mol Ther.* 2001 Jun;3(6):857-66.