

بررسی مقایسه‌ای ویژگی‌ها و توانایی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان، بافت چربی و مایع آمنیوتیک به سلول‌های فیبر عدسی چشم

هما محسنی کوچصفهانی^۱ Ph.D.*، محمد نبیونی^۲ Ph.D.، نسیم اسلامی^۳ MD.، خدیجه بهره بر^۴ MD.،
پریسا غیبی^۳ MD.

- ۱- زیست شناسی تکوینی، دانشگاه خوارزمی تهران، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم جانوری
- ۲- زیست شناسی تکوینی، استادیار دانشگاه خوارزمی تهران، دانشکده علوم، زیستی، گروه سلولی و مولکولی
- ۳- کارشناسی ارشد زیست شناسی تکوینی، دانشگاه خوارزمی تهران، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم جانوری

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: kouchesfehni@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۰/۱۳

چکیده

هدف: در این مطالعه، اثر تمایزی مایع زجاجیه بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان، بافت چربی و مایع آمنیوتیک به سلول‌های شبه فیبر عدسی چشم مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این کار تجربی سلول‌های بنیادی از مغز استخوان ران و چربی از ناحیه کشاله ران موش های بالغ NMRI و مایع آمنیوتیک از جنین‌های ۱۳ روزه موش‌های NMRI جدا شده و کشت داده شد. مزانشیمی بودن سلول‌ها با مارکرهای سطحی CD31 و CD90 به روش فلوسیتومتری بررسی شد. سپس سلول‌ها تحت القای زجاجیه چشم گاو به مدت ۱۴ روز با درصد‌های مختلف ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ قرار گرفتند. بیان مارکرهای آلفا کریستالین در نمونه‌های تجربی و کنترل با روش ایمونوسیتوشیمی مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: آنالیز فلوسایتومتری مارکرهای سطحی نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و مایع آمنیوتیک و بافت چربی مارکر CD90 را (به ترتیب ۲۹/۲۹ درصد، ۰/۵۷ درصد، ۸۲ درصد) بیان می‌کنند. به‌علاوه سلول بنیادی مزانشیمی از هر سه منبع مارکر CD31 (به ترتیب ۳/۴۴ درصد، ۱/۵۳ درصد، ۰/۱ درصد) بیان می‌کنند. بررسی‌های ایمونوسیتوشیمی نشان داد که غلظت ۴۰ درصد از مایع زجاجیه بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی و مایع آمنیوتیک و غلظت ۱۵ درصد از مایع زجاجیه بر روی سلول‌های مغز استخوان نسبت به سایر غلظت‌ها اثر القایی بیشتری دارد.

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های این مطالعه، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از هر سه منبع در اثر عمل القایی مایع زجاجیه می‌توانند به سلول‌های فیبر عدسی چشم تمایز یابند.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، زجاجیه، کریستالین

مقدمه

بیان ژن‌های کریستالین، طویل شدن و تخصص یابی ساختاری در سلول‌های فیبری می‌گردند (۱۰). شواهد نشان می‌دهد که سلول‌های بافت پوششی عدسی تحت القاء FGF در محیط کشت تمایز پیدا کرده و ساختار مولکولی و مورفولوژی فیبرهای عدسی را کسب کرده‌اند (۱۱).

عمده‌ترین پروتئین‌های سلول‌های فیبر عدسی، کریستالین‌ها می‌باشند (۱۲) که به دو گروه عمده α و β تقسیم می‌شوند (۱۳). با افزایش سن مشکلات و بیماری‌های چشمی به‌ویژه پیرچشمی و آب مروارید در جوامع مختلف رو به افزایش است. بنابراین امروزه استفاده از سلول‌های بنیادی بعنوان یک راهکار برای ترمیم و یا جایگزینی سلول‌های عدسی و شبکه ضروری به‌نظر می‌رسد (۱۴). در این میان، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل دارا بودن خاصیت خودتجدیدی و توان تمایز به سایر سلول‌های دیگر به‌عنوان یک منبع مناسب و یک استراتژی برای جایگزینی ضایعات سلولی و ژن درمانی محسوب می‌شود (۱۵).

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان: در این تحقیق تجربی موش‌های نژاد NMRI با سن تقریبی ۴ تا ۶ هفته با روش جابه‌جای مهره‌های گردنی (cervical dislocation) بر اساس پروتوکول صادره از کمیته‌ی اخلاقی دانشگاه خوارزمی کشته شدند. در شرایط کاملاً استریل استخوان‌های ران و درشت نی جدا، داخل محیط DMEM قرار داده و به زیر هود منتقل شدند. دو سر استخوان با یک قیچی کاملاً استریل بریده شده و مغز استخوان از داخل کانال استخوان با استفاده از سرنگ حاوی محیط DMEM و عمل Flushing خارج شد. مغز استخوان در فالكون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته و سانتریفیوژ شد تا رسوب سلولی تشکیل شود. سپس محیط رویی تخلیه و سلول‌ها در ۲ میلی‌لیتر محیط کشت تازه معلق شدند. محیط مورد استفاده (DMEM (Dubleco, s modified eagles (medium; Gibco Germany حاوی ۱۵ درصد FBS (Fetal Bovine Serum; Gibco, Germany) و ۱۰۰ واحد بین‌المللی پنی‌سیلین (Gibco, Germany) و ۱۰۰ واحد بین‌المللی استرپتومایسین (Gibco, Germany) بود. سلول‌ها حاصل در فلاسک ۲۵ سانتی متری کشت داده شدند. محیط سلول‌ها هر ۳ روز یک‌بار به مدت دو هفته تعویض شد.

سلول‌های بنیادی سلول‌های تمایز نیافته‌ای هستند که توانایی تبدیل و تمایز به انواع مختلف سلول‌ها را دارند. سلول‌های بنیادی دارای دو ویژگی مهم هستند که سلول‌های بنیادی را از سایر سلول‌ها متمایز می‌کنند. این سلول‌ها، توانایی تکثیر نامحدود دارند و در حالت متمایز نشده باقی می‌مانند. علاوه بر این، سلول‌های بنیادی چنانچه در شرایط محیطی مناسب قرار بگیرند، قادرند به سلول‌های مورد نظر تبدیل شوند. سلول‌های بنیادی می‌توانند تحت تاثیر بعضی شرایط فیزیولوژیک یا آزمایشگاهی به سلول‌هایی با عمل‌کردهای اختصاصی مانند سلول‌های عضلانی قلب یا سلول‌های تولیدکننده انسولین در پانکراس تبدیل شوند (۱). سلول‌های بنیادی از لحاظ منشا به دو دسته عمده، سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی بالغ تقسیم می‌شوند (۲). سلول‌های بنیادی بالغ در بسیاری از بافت‌ها و اندام‌ها شامل مغز، مغز استخوان، ماهیچه اسکلتی، شبکه، قرنیه چشم، پالپ دندان، مغز، طناب عصبی، کبد، بافت چربی، پوست و روده وجود دارند (۳). از مهم‌ترین سلول‌های بنیادی بالغ، سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشند؛ سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای اولین بار در مغز استخوان در سال ۱۹۶۶ شناسایی شدند (۴). در سال‌های اخیر، مهم‌ترین منبع سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بوده است، اما سلول‌های بنیادی مزانشیمی را از منابع دیگر مثل بافت چربی، خون بند ناف، غشای آمیوتیک، پولپ دندان، خون محیطی، بافت پریوست و ماهیچه اسکلتی نیز جدا کرده‌اند (۵ و ۶). مغز استخوان منبع اصلی دو نوع از سلول‌های بنیادی به‌نام سلول‌های بنیادی خون‌ساز و سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد (۷).

مایع زجاجیه مایعی شفاف است که از جام بینایی منشا می‌گیرد و فضای پشت عدسی چشم را پر کرده است و در مسیر تمایزی عدسی چشم نقش ویژه دارد. در زجاجیه کندروایتین سولفات، هپاران سولفات و اسید هیالورونیک وجود دارند. اسید هیالورونیک تمایل بالایی برای جذب آب داشته و در نتیجه ۹۹ درصد وزن زجاجیه را آب تشکیل می‌دهد و بدین سبب اسید هیالورونیک یک حالت ژله‌ای به زجاجیه می‌دهد (۸). مهم‌ترین فاکتورهای موجود در مایع زجاجیه فاکتورهای رشد فیبروبلاستی (FGF) و FGF-۱ و FGF-۲ می‌باشد (۹). مطالعات تجربی نشان داده است که این فاکتورها در محیط کشت باعث القا و تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های عدسی می‌شود و همچنین باعث

گرفته شده از کشتارگاه کرج در PBS به آزمایشگاه منتقل شد و با آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و استرپتومایسین همراه با PBS استریل گردید. با فروکردن سر سرنگ ۱۶ گرم از ناحیه پشتی چشم، مایع زجاجیه بیرون کشیده شد و در دستگاه سانتریفیوژ با دور rpm ۱۴۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. مایع رویی فیلتر گردید و در فریزر ۴۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

بررسی بیان مارکرهای سطحی به روش فلوسیتومتری:

سلول‌های حاصل بعد از تریپسینه و سانتریفیوژ کردن در اپندورف ریخته و با PBS شسته شدند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. آنتی‌بادی‌های اولیه CD90 کونژوگه با PE (فیکواریترین) و کونژوگه CD31 با FITC (فلورسنس ایزوتیوسیانات) اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در یخچال قرار گرفت و برای کنترل منفی از آنتی‌بادی‌های FITC-IgG2b، PE-IgG2a استفاده شد. در مرحله بعد سلول‌ها پس از شستشو با PBS به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. سپس به سلول‌ها بافر فیکس کننده فرمالین ۱ درصد اضافه شد و با دستگاه فلوسیتومتری (Beckton Dickinson, Germany) آنالیز شدند.

تیمار سلول‌های جدا شده با مایع زجاجیه: پس از پاساژ سوم سلول‌ها بعد از شمارش سلولی، به تعداد 4×10^4 سلول در ۷ خانه‌ی پلیت ۲۴ خانه‌ای کشت داده شدند و پس از چسبیدن سلول‌ها به کف ظرف، گروه‌های تجربی با درصدهای مختلف ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ از مایع زجاجیه در محیط کشت تیمار شدند و گروه کنترل بدون تیمار با مایع زجاجیه و صرفاً با DMEM و FBS ۱۵ درصد و آنتی‌بیوتیک‌ها کشت داده شدند. این خانه‌ها به مدت ۱۴ روز تحت تیمار و کشت قرار گرفتند.

رنگ‌آمیزی سلول‌ها با مارکر کریستالین: در انتهای روز ۱۴، نمونه‌های تجربی و نمونه‌های کنترل، با آنتی‌بادی اولیه کریستالین alpha A+ alpha B crystalline antibody (anti-rabbit- IgG- AF8035) (ab28163) و آنتی‌بادی ثانویه (anti-rabbit- IgG- AF8035) (ab28163) fitc رنگ‌آمیزی شدند. به منظور انجام ارزیابی ایمونوسیتوشیمی، سلول‌های مزانشیمی تیمار شده به مدت ۱۵ دقیقه با پارافرمالدئید ۴ درصد در دمای اتاق تثبیت شدند. سپس با PBS شستشو و از بافر بلاک کننده حاوی Triton X-100 جهت نفوذ پذیری سلول‌ها برای ورود آنتی‌بادی استفاده شد. سپس Goat

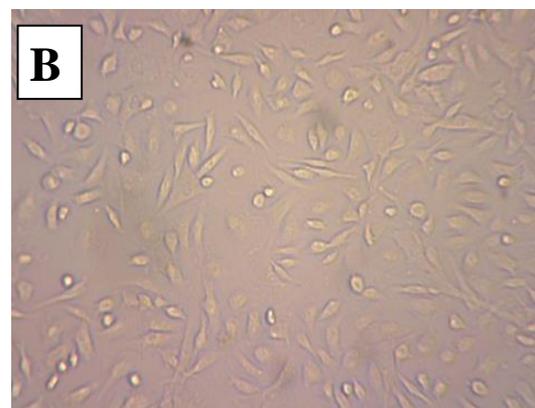
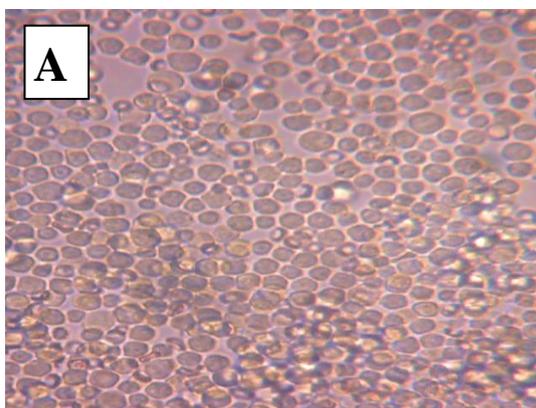
جداسازی و کشت سلول‌های مزانشیمی بافت چربی: در این تحقیق تجربی، موش‌های نژاد NMRI با سن تقریبی ۴ تا ۶ هفته با روش جابه‌جای مهره‌های گردنی کشته و سپس با استفاده از الکل ۷۰ درصد ضد عفونی شدند. بافت چربی از ناحیه پشت کتاله ران موش‌ها جدا شده و در محلول استریل phosphate-buffered saline (PBS) تحت شستشو قرار گرفت. سپس قطعات چربی به صورت مکانیکی با قیچی از هم جدا شدند و به قطعات دو میلی‌متری درآمدند. تمامی مراحل بالا بر روی یخ انجام گرفت. سپس تمامی PBS محیط کشیده شد و تکه‌های چربی تحت تاثیر ۰/۰۷۵ کلاناز نوع I (Merck) در PBS به مدت چهل و پنج دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO₂ ۵ درصد قرار گرفتند، با این توصیف که هر پنج دقیقه یکبار مواد داخل فالكون پیتاژ شد. سپس کلاناز با PBS خنثی گردید (با اضافه کردن ۱/۵ میلی‌لیتر PBS، رقت کلاناز آن قدر زیاد شد که فعالیت اولیه‌ی خود را از دست داد و خنثی گردید) و سپس فالكون در داخل سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۲۰۰ قرار گرفت. پس از اتمام سانتریفیوژ مایع رویی که حاوی تکه‌های چربی بود دور ریخته شد و رسوب سلولی با PBS شستشو داده شد و دوباره در سانتریفیوژ با دور rpm ۱۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. پس از این‌که دوباره مایع رویی حذف شد، محیط کشت DMEM به همراه FBS ۱۵ درصد و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین به نسبت ۱ به ۱۰۰ به رسوب سلولی اضافه شد و در فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربع بدون پوشش با درب فیلتردار کشت داده شد و هر ۲ روز یکبار تعویض محیط صورت گرفت.

جداسازی و کشت سلول‌های مزانشیمی مایع آمنیوتیک:

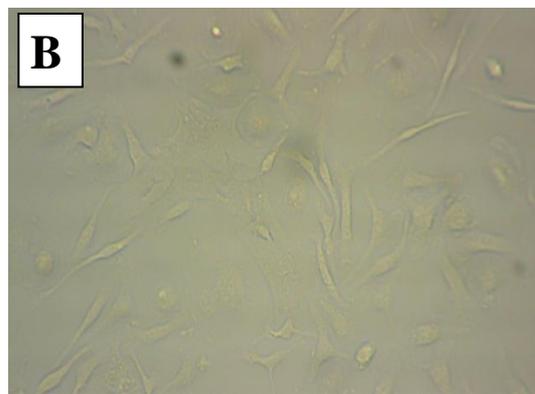
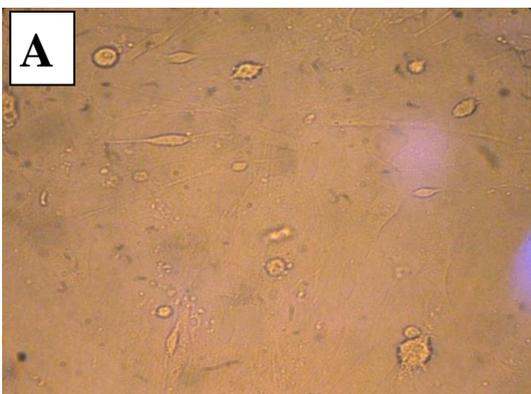
موش‌های NMRI در هفته دوم بارداری به روش جابه‌جای مهره‌های گردنی کشته شدند و جنین آن‌ها خارج و در ظرف حاوی HBSS قرار داده شد. سپس مایع آمنیوتیک احاطه کننده جنین به کمک پمپ پاستور کشیده شد. کلیه این مراحل در محیط استریل انجام شد. این مایع به همراه ۵ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM، FBS ۲۰ درصد و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و استرپتومایسین در فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مکعب در شرایط عادی کشت سلولی در داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار CO₂ ۵ درصد کشت داده شد. اولین تعویض محیط در روز ۲ و پس از آن تعویض محیط هر سه روز یکبار انجام شد.

نحوه گرفتن مایع زجاجیه: در این پژوهش چشم‌های گاو

به طوری که در پاساژ سوم اکثریت سلول‌ها دوکی شکل بودند. در ادامه پاساژهای بعدی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به صورت خالص در آمده بودند و سلول‌های مزانشیمی از لحاظ مورفولوژیکی بیشتر شبیه به سلول‌های فیبروبلاست (دوکی شکل) بودند. سلول‌های بنیادی بافت چربی بعد از کشت اولیه در زیر میکروسکوپ معکوس به صورت سلول‌های شبه فیبروبلاستی همراه با زوائد کوچکی در اطراف روئیت شدند که به ظرف کشت چسبیده بودند و سلول‌های مرده به صورت اجسام شفاف در سطح کشت نمایان بودند (شکل ۲A). بعد از یک هفته، تعداد سلول‌های مزانشیمی بافت چربی که دوکی شده بودند افزایش یافت (شکل ۲B). سلول‌های مایع آمنیوتیک در روز اول کشت شامل جمعیت هتروژنی از سلول‌ها بودند. در روز دوم، محیط کشت شامل جمعیتی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی چسبیده به کف ظرف با مورفولوژی فیبروبلاستی به همراه گروهی از سلول‌های غیر مزانشیمی شناور بودند (شکل ۳A). سلول‌های بنیادی مزانشیمی چسبیده به کف ظرف به سرعت تکثیر شدند و ظرف یک هفته به صورت یک تک لایه کف ظرف را پر کردند (شکل ۳B).



شکل ۱: کشت سلول‌های مغز استخوان گرفته شده از موش. (A) در روز اول کشت، سلول‌های مزانشیمی و غیر مزانشیمی به شکل ناهمگن دیده شدند. (B) در روز هفتم، سلول‌های مزانشیمی بیشتر به صورت دوکی شکل مشاهده شدند. (میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس با بزرگنمایی $\times 400$).



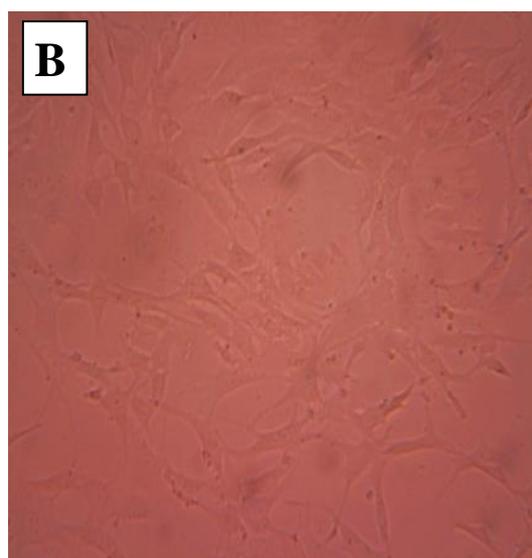
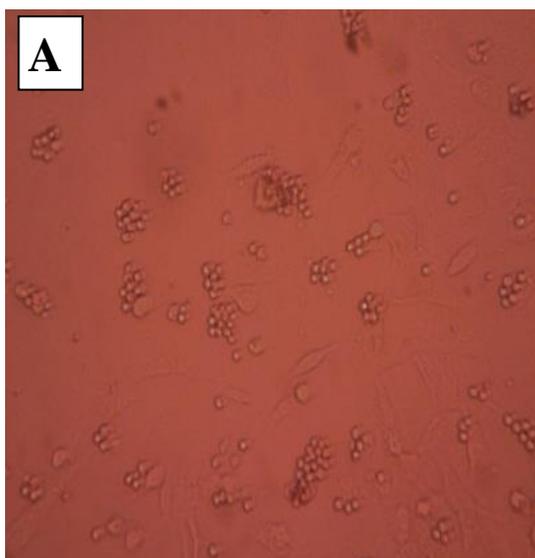
شکل ۲: کشت اولیه سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی (A) و کشت سلول‌ها بعد از یک هفته (B). (بزرگنمایی $\times 400$).

serum اضافه شد و پس از خارج کردن Goat serum آنتی‌بادی اولیه alpha A+ alpha B crystalline antibody رقیق شده در (BSA/PBST) Phosphate Buffered Saline (Bovine serum albumin/Tween-20) ۰/۲ درصد اضافه شد و سلول‌ها در این محلول به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. نمونه‌ها ۲ بار با PBS/Tween ۰/۱ درصد شستشو داده شدند. آنتی‌بادی ثانویه رقیق شده در BSA/PBST ۰/۲ درصد، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق اضافه شد. از میکروسکوپ معکوس فلورسانس جهت ارزیابی سلول‌ها استفاده شد.

نتایج

مورفولوژی سلول‌های کشت شده

در کشت اولیه، سلول‌های گرفته شده از مغز استخوان موش‌های NMRI به شکل گروه‌های سلولی ناهمگن و هتروژن دیده شدند (شکل ۱A). در روز هفتم، سلول‌ها با مورفولوژی متفاوت نظیر پهن، دوکی و چند وجهی مشاهده شدند (شکل ۱B). در پاساژهای بعدی تعداد سلول‌های دوکی شکل بیشتر شدند،



شکل ۳: جمعیت هتروژن سلول‌های کشت داده شده مایع آمنیوتیک در روز دوم (A) و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مایع آمنیوتیک در روز هفتم (B). (بزرگنمایی $\times 400$).

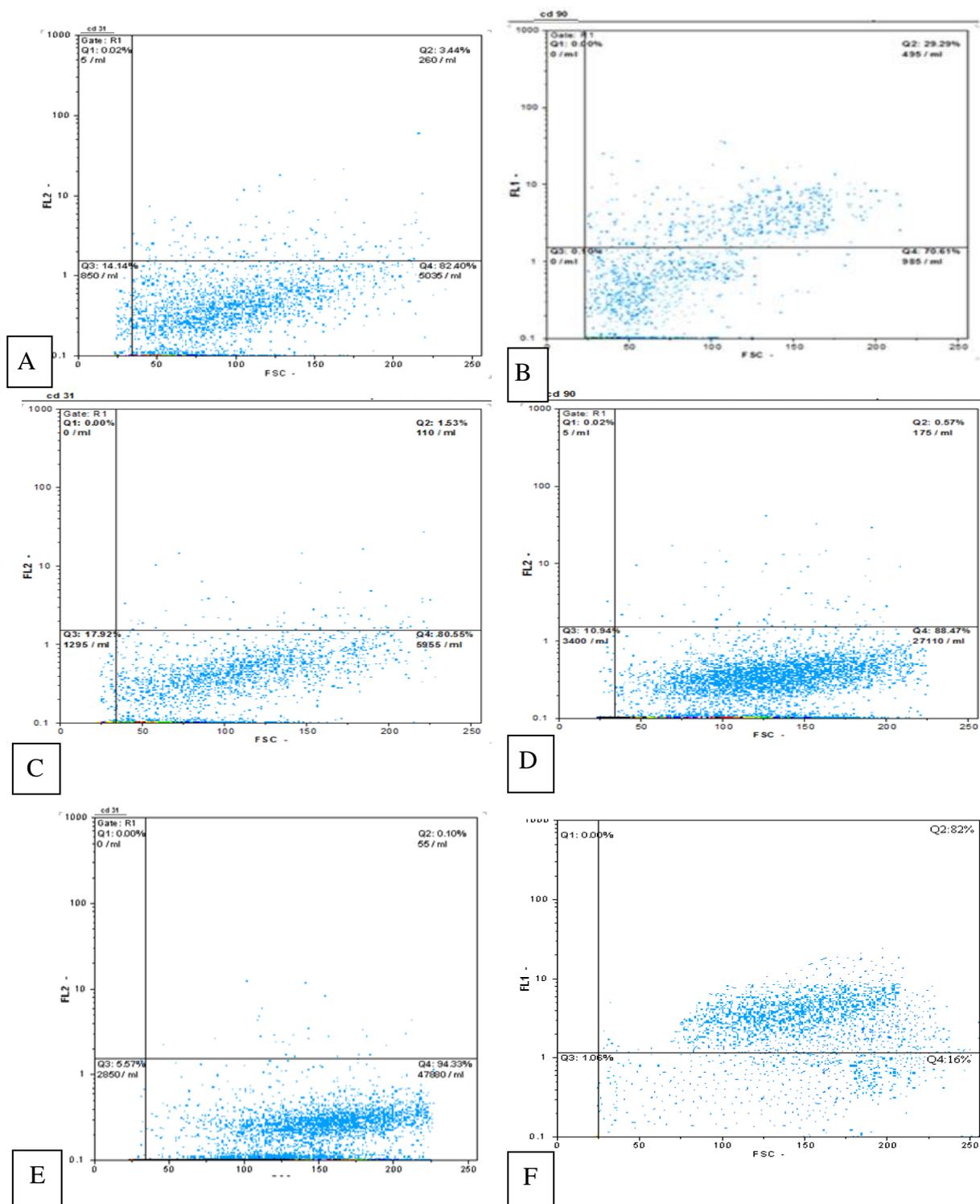
سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در غلظت ۱۰ درصد شباهت بسیاری به گروه کنترل (بدون مایع زجاجیه) داشتند در حالی که در غلظت ۱۵ درصد سلول‌ها کشیده تر و به صورت موضعی به موازات هم آرایش یافته بودند و پس از آن در غلظت‌های ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ درصد میزان مرگ و میر سلول‌ها بسیار زیاد گردید و آرایش سلولی از بین رفت. گروه‌های تجربی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مایع آمنیوتیک در غلظت ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۳۰ درصد شباهت بسیاری به گروه کنترل داشتند در حالی که در غلظت ۴۰ درصد سلول‌ها کشیده تر و به موازات هم آرایش یافته و دارای هستک‌های بیشتری در داخل هسته بودند و پس از آن در غلظت ۵۰ درصد میزان مرگ و میر سلول‌ها بسیار زیاد گردید و آرایش سلولی از بین رفت. روند اخیر در مورد سلول‌های مزانشیمی چربی نیز دقیقاً به همین صورت بوده و افزایش تعداد هستک‌های داخل هسته و موازی بودن سلول‌ها به صورت موضعی در غلظت ۴۰ درصد حاکی از تاثیر زجاجیه بر سلول‌های بنیادی و القا هدفمند آن داشته است (شکل ۵).

نتایج به دست آمده از بررسی بیان مارکرهای سطحی به روش فلوسیتومتری

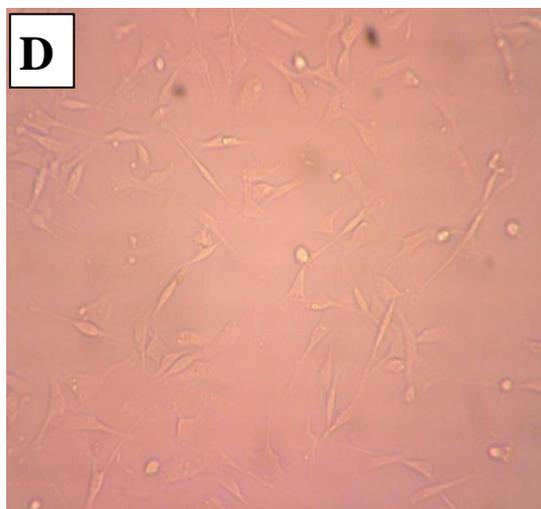
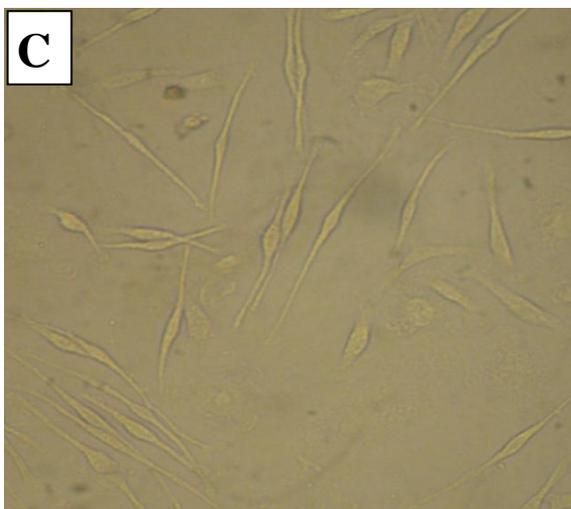
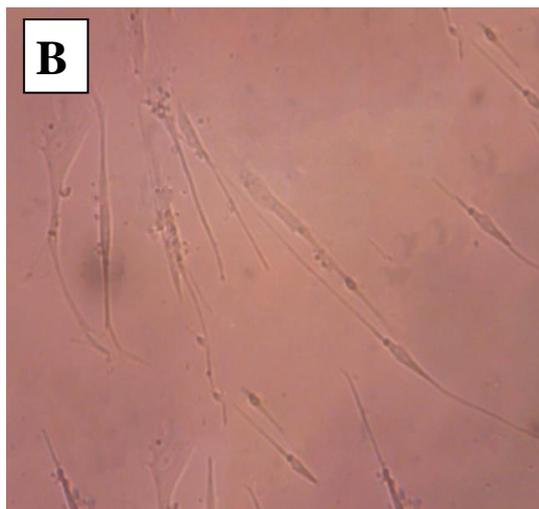
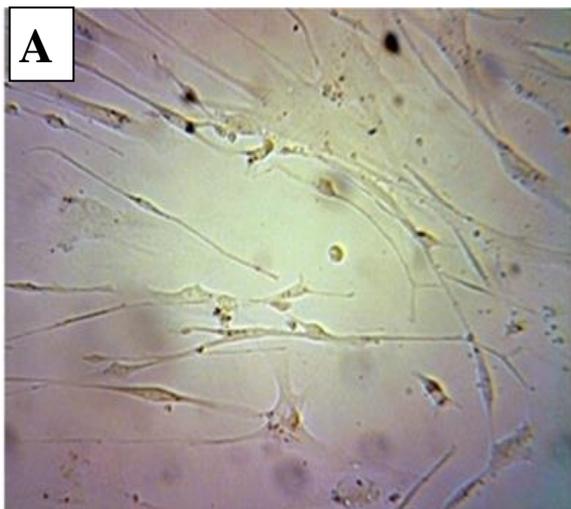
جهت اثبات ماهیت مزانشیمی بودن این سلول‌ها علاوه بر خاصیت چسبندگی آن‌ها به ظرف کشت، یکی دیگر از راه‌های شناسایی آن‌ها استفاده از مارکر سطحی می‌باشد که بعد از پاساژ اول و جداسدن سلول‌های بنیادی مزانشیمی از سایر سلول‌ها به روش فلوسیتومتری بررسی شد. در این بررسی سلول‌های بنیادی مزانشیمی هر سه منبع با دو مارکر CD90 و CD31 بررسی شدند. نتایج در مورد مارکر CD90 بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و مایع آمنیوتیک به ترتیب ۲۹/۲۹ درصد و ۰/۵۷ درصد بوده است (شکل ۴)، در حالی که سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی این مارکر را به میزان ۸۲ درصد بیان کردند (شکل ۴). در مورد مارکر CD31 هر سه منبع سلول‌های بنیادی آن را به میزان کم بیان کردند. همان‌طور که در شکل ۴ دیده می‌شود بافت‌های چربی، مغز استخوان و مایع آمنیوتیک مارکر CD31 را به ترتیب ۰/۱ درصد، ۳/۴۴ درصد، ۱/۵۳ درصد بیان می‌کنند.

نتایج حاصل از بررسی مورفولوژی سلول‌ها در طی تمایز

پس از پاساژ سوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان، بافت چربی و مایع آمنیوتیک تحت القا درصدهای مختلف ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ از مایع زجاجیه نسبت به محیط کشت، به مدت ۱۴ روز قرار گرفتند. گروه‌های تجربی



شکل ۴: نتایج فلوسیتومتری برای A سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان که مارکر سطحی CD31 را ۲/۴۴ درصد بیان کردند. B سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان که مارکر سطحی CD90 را ۲۹/۲۹ درصد بیان کردند. C سلول‌های بنیادی مزانشیمی مایع آمنیوتیک که مارکر سطحی CD31 را ۱/۵۳ درصد بیان کردند. D سلول‌های بنیادی مزانشیمی مایع آمنیوتیک که مارکر سطحی CD90 را ۰/۵۷ درصد بیان کردند. E سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی که مارکر سطحی CD31 را ۰/۱ درصد بیان کردند. F سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی که مارکر سطحی CD90 را ۸۲ درصد بیان کردند.



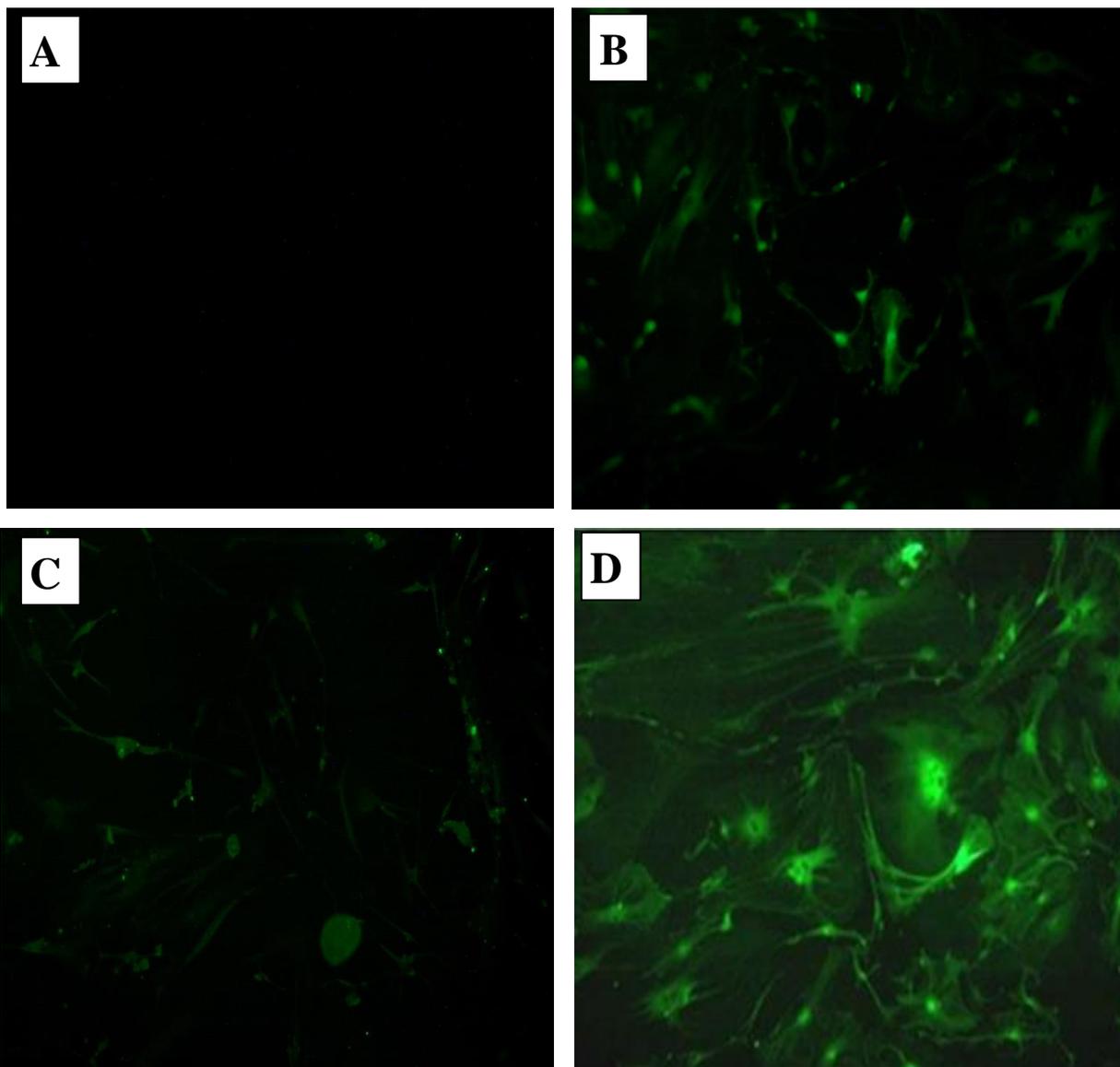
شکل ۵: (A): سلول‌های بنیادی مزانشیمی در گروه کنترل است که پس از ۱۴ روز کشت بدون مجاورت با مایع زجاجیه علائمی از کشیدگی سلولی در آن‌ها دیده نمی‌شود. (B): سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی پس از ۱۴ روز کشت با غلظت ۴۰ درصد مایع زجاجیه که سلول‌ها نسبت به گروه کنترل کشیده‌تر شده‌اند. (C) سلول‌های بنیادی مزانشیمی مایع آمینوتیک پس از ۱۴ روز کشت با غلظت ۴۰ درصد مایع زجاجیه نسبت به محیط کشت که سلول‌ها نسبت به گروه کنترل کشیده‌تر شده‌اند. (D) سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان پس از ۱۴ روز کشت با غلظت ۱۵ درصد مایع زجاجیه نسبت به محیط کشت که سلول‌ها نسبت به گروه کنترل کشیده‌تر شده‌اند. در هر سه نمونه B, C و D سلول‌های تیمار شده کشیده‌تر و فیبری شکل شده‌اند و به سمت آرایش موازی پیش می‌روند. (بزرگنمایی ۴۰۰X)

نتایج بررسی بیان مارکرهای آلفا کریستالین به روش

ایمونوسیتوشیمی

نتایج بررسی‌های ایمونوسیتوشیمی سلول‌های گروه تجربی و گروه کنترل با آنتی‌بادی پلی‌کلونال alpha A+ alpha B crystalline antibody پس از ۱۴ روز نشان داد که در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان میزان بیان کریستالین در سلول‌های تیمار شده با غلظت ۱۵ درصد مایع زجاجیه نسبت به سایر غلظت‌های مایع زجاجیه بیشتر بود،

چنانچه در غلظت ۱۰ درصد فقط تعداد کمی از سلول‌ها رنگ پذیرفته بودند و در غلظت‌های دیگر مرگ و میر سلولی مانع رنگ‌گیری شده و اثری بر صفحه مشاهده نشد. در سلول‌های تیمار شده، بافت چربی و مایع آمینوتیک با غلظت ۴۰ درصد نسبت به سایر غلظت‌های مایع زجاجیه میزان بیان کریستالین بیشتر بوده و در غلظت ۵۰ درصد صفحه سیاه بود و اثری از رنگ‌پذیری سلول‌ها دیده نشد. در حالی که در غلظت‌های زیر ۴۰ درصد اندک رنگی در نواحی روئیت شده بود (شکل ۶).



شکل ۶: بررسی ایمنوسیتوشیمی بیان آلفا کریستالین‌ها در سلول‌های گروه کنترل (A) پس از ۱۴ روز کشت بدون مجاورت با مایع زجاجیه که هیچگونه سیگنالی مبنی بر بیان کریستالین‌ها را نشان نمی‌دهد. در سلول‌های بنیادی گروه تجربی مایع آمیوتیک (B) و بافت چربی (C) که تحت القای ۴۰ درصد مایع زجاجیه نسبت به محیط کشت پس از ۱۴ روز بوده اند و بیان آلفا کریستالین‌ها با رنگ سبز مشاهده می‌شود و همچنین سلول‌های بنیادی مغز استخوان (D) که تحت القا ۱۵ درصد مایع زجاجیه نسبت به محیط کشت به مدت ۱۴ روز قرار گرفتند و بیان آلفا کریستالین‌ها با رنگ سبز قابل رویت است. (بزرگنمایی $\times 200$)

بحث

سلول‌های فیبروبلاستی می‌شوند (۱۹ و ۲۰). اما تعویض محیط کشت مانع از چسبیدن سلول‌های غیر مزانشیمی و خونی به پلیت پلاستیکی کشت می‌شود. در این مطالعه بدون کمترین استرس بر سلول‌ها و با بهبود روش چسبیدن به ظرف کشت پلاستیک از طریق تعویض سریع محیط کشت در ساعات اولیه از کشت سلول‌های مغز استخوان موش، از چسبیدن سلول‌های غیر مزانشیمی به ظرف کشت جلوگیری گردید. سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت چربی، سلول‌هایی هستند که چند توان بوده

جداسازی و خلوص سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش به‌علت تعداد کم سلول‌های مزانشیمی در مغز استخوان و رشد ناخواسته سلول‌های غیر مزانشیمی به‌مراتب مشکل‌تر از دیگر گونه‌های جانوری است (۱۶). سلول‌های مغز استخوان شامل فیبروبلاست‌ها، سلول‌های اجدادی خونی (۱۷)، ماکروفاژها، سلول‌های اندوتلیالی و چربی می‌باشند (۱۸). مطالعات قبلی نشان دادند این سلول‌ها در کشت باقی مانده و باعث آلوده‌سازی

در این مطالعه بیان برخی مارکرهای سطحی نظیر CD31 و CD90 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، بافت چربی و مایع آمنیوتیک به روش فلوسیتومتری مورد بررسی قرار گرفت که نتایج این تحقیق نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و مایع آمنیوتیک مارکر CD90 را به میزان کم به ترتیب ۲۹/۲۹ درصد و ۰/۵۷ درصد بیان کردند، اما سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی این مارکر را به میزان بالا به مقدار دقیق ۸۲ درصد بیان کردند. بیان مارکر CD31 در بافت‌های چربی، مغز استخوان و مایع آمنیوتیک به ترتیب ۰/۱ درصد، ۳/۴۴ درصد، ۱/۵۳ درصد می‌باشد که نشانگر بیان اندک این مارکر در سلول‌های بنیادی هر سه منبع است.

بیان CD31 و CD90 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مایع آمنیوتیک آن قدر اندک است که عملاً موید عدم بیان این مارکرهاست. این نتایج در راستای مطالعات محققین قبلی است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مایع آمنیوتیک را فاقد مارکرهای CD31 و CD90 می‌دانند.

در این تحقیق، توانایی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، بافت چربی و مایع آمنیوتیک به سلول‌های فیبر عدسی چشم بررسی گردید. به این منظور سلول‌های مزانشیمی از مغز استخوان، بافت چربی و مایع آمنیوتیک موش جدا شد و به مدت ۱۴ روز با مایع زجاجیه چشم گاو تیمار شد. Eleanor و همکارانش (۲۹) بر روی رشد و تمایز سلول‌های اپی‌تلیومی عدسی انسان مطالعه کردند. آن‌ها این سلول‌های اپی‌تلیومی را جدا کرده و به مدت ۱۵ روز در محیط دارای FGF-2 کشت دادند. در نهایت مشاهده کردند که مورفولوژی آن‌ها تغییر یافته و اجسام لنتوئیدی (lentoid) (مجموعه دستجات چند سلولی گرد و دارای خاصیت انکسار بالا) ظاهر شدند. آن‌ها برای اثبات ادعای خود در مورد تمایز این سلول‌ها به عدسی چشم از مارکر آلفا کریستالین‌ها با روش RT-PCR استفاده کردند. در تحقیق حاضر سلول‌های بنیادی مزانشیمی که به مدت ۱۴ روز تحت القای مایع زجاجیه چشم قرار داشتند از نظر بیان آلفا کریستالین توسط روش ایمونوسیتوشیمی مورد بررسی قرار گرفتند که پاسخ مثبت این سلول‌ها بیانگر تمایز آن‌ها به سمت ایجاد سلول‌های فیبر عدسی و بیان ژن‌های خاص عدسی می‌باشد.

Michael و همکارانش (۳۰) دو بافت اپی‌تلیومی از دو عدسی مجزا را بر روی هم در محیط کشت مخلوط با زجاجیه گاوی (۱:۱) کشت دادند و علاوه بر بررسی‌های میکروسکوپی و تعیین

و از نوع بنیادین بالغ می‌باشند (۲۱). این سلول‌ها همانند سلول‌های بنیادی مغز استخوان به کف ظرف پلاستیکی کشت می‌چسبند و از لحاظ بررسی مارکرها حدوداً مشابه عمل می‌کنند. این سلول‌ها نسبت به مارکرهای سطحی سلول‌های خون ساز منفی عمل کرده و نسبت به مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مثبت هستند (۲۲). در تحقیقات گذشته نشان داده شد که سلول‌های بنیادی مایع آمنیوتیک در مقایسه با سلول‌های بنیادی مغز استخوان، قدرت تکثیر و خودنوزایی بالاتری دارند (۲۳ و ۲۴). در این مطالعه نیز تکثیر بالای سلول‌های بنیادی مایع آمنیوتیک در مقایسه با سایر سلول‌ها موید مطالعات محققین قبلی بود.

یکی دیگر از روش‌های شناسایی این سلول‌ها استفاده از مارکر سطحی است. Baddoo و همکارانش (۲۵) مارکرهای سطحی، CD48, CD105, CD34, CD11b, CD81, CD106, CD31 و CD31 را در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش بررسی کردند که نتایج این بررسی نشان داد که این سلول‌ها مارکرهای CD105, CD106, CD81 را به میزان بالایی بیان کردند، در حالی که مارکرهای CD11b, CD34, CD48, CD45, CD31 و CD31 به میزان کمی بیان شدند. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی مارکرهای سطحی متفاوتی مانند CD29, CD44, CD54, CD73 (SH3), CD90, CD105 (SH2), CD106, CD146, CD166 را بیان می‌کنند، ولی فاقد مارکرهای دیگری مانند CD14, CD31, CD34, CD45, CD133, CD144, HLA-DR, STRO-1 می‌باشند. آنالیز فلوسایتومتری از مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان و بافت چربی نشان داده است که این سلول‌ها مارکرهایی مانند CD13, CD29, CD44, CD90, CD105 (SH2), CD73 (SH3), را بیان می‌کنند در حالی که این سلول‌ها بیان متفاوتی از CD49d, CD54, CD34 و You (۲۶) و همکارانش (۲۷) بر روی سلول‌های بنیادی مایع آمنیوتیک انسانی مارکرهای سطحی CD29 و CD31 و CD45 را بررسی کردند که نتایج این بررسی نشان داد که این سلول‌ها مارکرهای CD29 را بیان می‌کنند اما CD31 و CD45 به میزان خیلی کم بیان می‌کنند. Liu و همکارانش (۲۸) مطالعه‌ای بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مایع آمنیوتیک موشی انجام دادند که مشخص شد که این سلول‌ها فیبروبلاستی شکل مارکر CD44 را بیان می‌کنند اما مارکرهای CD31, CD90, CD45 را بیان نمی‌کنند.

زجاجیه حاکی از توان تمایزی متفاوت سلول‌های بنیادی گرفته شده از منابع متفاوت می‌باشد.

نتیجه گیری

در کل از یافته‌های این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که بر اساس تغییرات مورفولوژیکی و بیان مارکرهای خاص عدسی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان، بافت چربی و مایع آمنیوتیک در اثر تیمار با زجاجیه توان تمایز در جهت تشکیل سلول‌های فیبری عدسی را دارند. تخلیص سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان به علت هتروژن بودن نسبت به بافت چربی و مایع آمنیوتیک از مزیت کمتری برای کشت برخوردار است و از طرف دیگر تکثیر سلول‌های مایع آمنیوتیک بسیار بالاتر از دو بافت دیگر است، اما با توجه به این که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان در دوز پایین‌تری نسبت به دو بافت دیگر القا شدند بافت مناسب‌تری می‌باشند. با توجه به ویژگی‌های مشابه سلول‌های موش و انسانی می‌توان امیدوار بود که سلول‌های بنیادی انسانی نیز این قابلیت را داشته باشند که در این صورت می‌توان از این سلول‌ها در درمان بیماری‌های چشمی استفاده کرد. تخلیص سلول‌هایی با منشاهای متفاوت موجب می‌شود تا دست محققان و پزشکان در امر درمان بازتر باشد تا اگر تهیه سلول از یک بافت با مشکل مواجه شد امکان جایگزینی با روش مناسب تر را داشته باشند.

تشکر و قدردانی

از همکاری آقای دکتر امیر آتشی مدیر گروه سلولی شرکت بن یاخته و همچنین مساعدت نمودن دانشگاه علوم پزشکی ایران و انستیتو پاستور ایران جهت انجام آنالیز فلوسایتومتری صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایم.

منابع

1. Baksh D, Davis JE, Zandstra PW. Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent survival and expansion. *J ISEH*. 2003; 31: 723-732.
2. Ulloa-Montoya F, Catherine M. Verfaillie and Wei-shou Hu. Culture systems for Pluripotent Stem Cells. *JBioscience and bioengineering*. 2005; 100: 12-27.

میزان توانایی این ساختار عدسی مانند، نشان دادند که در این شرایط این سلول‌ها بعد از ۳۰ روز کشت شکلی مشابه سلول‌های فیبر عدسی پیدا کرده و شفاف شده اند و قادر به متمرکز کردن نور گردیده‌اند. در نتیجه مایع زجاجیه گاوی فاکتورهای مناسب برای تمایز به سمت سلول‌های عدسی را داراست.

در تحقیق حاضر از مایع زجاجیه چشم گاو با دوزهای متفاوت استفاده شد. بررسی‌های مورفولوژیکی نشان داد که در سلول‌های گروه تجربی، می‌توان تغییرات قابل مقایسه‌ای را نسبت به گروه‌های کنترل مشاهده کرد. تغییرات مورفولوژیکی مشاهده شده در این تحقیق عبارتند از کشیدگی زیاد سلول‌ها، به موازات هم قرارگیری آن‌ها، افزایش تعداد هستک‌ها و از دست دادن هسته سلولی که همه این نتایج مورفولوژیکی بیانگر شروع تمایز این سلول‌ها به سمت ساختارهای شبه فیبر عدسی بوده و با نتایج Michael و همکارانش مطابقت دارد.

ملکی و همکارانش (۳۱) سلول‌های بنیادی بند ناف موش سوری را جدا کرده و در مجاورت مایع زجاجیه چشم گاو کشت دادند و بیان پروتئین‌های کریستالین αA و αB را بعد از ۱۴ روز کشت در دوز ۲۵ درصد با استفاده از روش Western blot analysis مشاهده نمودند.

در مطالعه‌ی حاضر، دوزهای مختلفی از مایع زجاجیه با محیط کشت آماده گردید تا روند تاثیرگذاری میزان زجاجیه بر القا سلولی مشخص گردد. این دوزها در ابتدا از ۵۰ درصد شروع شد اما چون نتیجه‌ی مطلوب حاصل نشد و مرگ و میر سلولی بسیار بالا بود در نتیجه میزان دوز از ۱۰ درصد آغاز گردید که در این روند با بررسی کامل سلول‌های تحت القا سلول‌های بنیادی مزانشیمی مایع آمنیوتیک و بافت چربی مارکر کریستالین‌ها را در دوز ۴۰ درصد و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در دوز ۱۵ درصد بیان کردند. در این بررسی دیده شد که در دوز ۵۰ درصد، مرگ و میر سلولی بسیار بالا بود. این مطلب نشان دهنده‌ی کشنده بودن مایع زجاجیه در غلظت‌های بالا برای سلول‌ها می‌باشد. این نتایج همانند کار ملکی و همکارانش (۳۱) نشان دادند که تحت القا فاکتورهای رشد موجود در مایع زجاجیه چشم، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان، بافت چربی و مایع آمنیون می‌توانند به ساختاری مشابه به فیبر عدسی تمایز یابند که در هر دو تحقیق مارکر تمایزی آلفا کریستالین بیان شدند. بیان آلفا کریستالین‌ها در انواع مختلف سلول‌های بنیادی تحت القا دوزهای متفاوت مایع

3. Musina RA, Egorov EE, Beliavski AV. Stem cells: properties and perspectives of therapeutic use. *J Mol Biol(mosk)*. 2004; 38: 563-77.
4. Friedenstein AJ, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J.Embryol. J exp. Morph.* 1966; 16(3): 581 -390.
5. Baghaban Eslaminejad MR, Taghiya L. Mesenchymal Stem Cell Purification from the Articular Cartilage cell culture. *J Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2007; 10: 146-153.
6. Alexanian Arshak R. Neural stem cells induce bone- marrow-derived mesenchymal stem cells to generate neural stem-like cells via juxtacrine and paracrine interactions. *J xperimental Cell Research*. 2005; 310(2): 383-391.
7. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *J Science*. 1999; 284(5411): 143-7.
8. Oyser Clyde W. The human eye: structure and function. Published by Sinauer Associates, Inc. 1999; 530 -531.
9. Majima K. Presence of growth factor in human vitreous. *J Ophthalmologica*. 1997; 211(4): 226–228.
10. McAvoy JW. Beta- and gamma-crystallin synthesis in rat lens epithelium explanted with neural retinal. *J Differentiation*. 1980; 17 (2):85–91.
11. Zhao H, Rossant J, Ornitz DM, Beebe DC, et al. Different FGFR genes play an essential but redundant role in postinduction lens development. *Invest Ophthalmol Visual Sci*. 2003; 44: 954-963.
12. Bloemendal H, de Jong W, J aenickeR, Lubsen NH, et al. Ageing and vision :structure ,stability and function of lens crystallines. *J Prog. Biophys. Mol. Biol*. 2004; 86(3): 407-485
13. Horwitz J. Alpha -Crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*. 1992; 89(21): 10449-1045.
14. BehfarA, Yamada S, Crespo-Diaz R, NesbittJJ, et al. Guided Cardiopoiesis Enhances Therapeutic Benefit of Bone Marrow Human Mesenchymal Stem Cells in Chronic Myocardial Infarction. *Am Coll Cardiol*. 2010; 56: 721-734.
15. Pitchford SC, Hahnel MJ, Jones CP, Rankin SM. Troubleshooting: Quantification of mobilization of progenitor cell subsets from bone marrow in vivo. *J Pharmacological and Toxicological Methods*. 2010; 61(2): 113–121.
16. Eslaminejad MB, Nikmahzar A, Taghiyar L, Nadri S, et al. Murine mesenchymal stem cells isolated by low density primary culture system. *Dev Growth Differ*. 2006; 48: 361-70.
17. Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation.. *J Cell Biochem*. 1999; 72(4): 570-85.
18. Zuckerman KS, Wicha MS. Extracellular matrix production by the adherent cells of long-term murine bone marrow cultures. *J Blood*. 1983; 61(3): 540-7.
19. Meirelles Lda S, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol*. 2003; 123(4): 702-11.
20. Xu CX, Hendry JH, Testa NG, Allen TD. Stromal colonies from mouse marrow: characterization of cell types, optimization of plating efficiency and its effect on radiosensitivity. *J Cell Sci*. 1983; 61: 453-66.
21. Ian Freshney R, Stacey Glyn N, Auerbach Jonathan M. Culture of human stem cells. chapter 13: Tissue culture of adipose derived stem cells. *J Wiley-Interscience*. 2007; 304-305.
22. Lidong G, Shaoqing LI, Yunfang W, Huimin Y, et al. In vitro differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells into endothelial-like cells. *Chinese Science Bulletin*. 2006 ; 51(15): 1863—1868.
23. Zheng YB, Gao ZL, Xie C, Zhu HP, et al. Characterization and hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human amniotic fluid and human bone marrow: a comparative study. *Cell Biol Int*. 2008; 32: 1439-1448.
24. Nadri s, Soleimani M. Comparative analysis of mesenchymal stromal cells from murine bone marrow and amniotic fluid. *cytotherapy* 2007; 9(8): 729-737.
25. Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, Gaupp D, et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem*. 2003; 89(6): 1235-49.
26. De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, Elbarbary A, et al. Differential expression of stem cell mobilization associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett*. 2003; 89(2-3): 267-270.
27. You Q, Cai L, Zheng J, et al. Isolation of human mesenchymal stem cells from third-trimester amniotic fluid. *Int J Gynaecol Obstet*. 2008 ; 103: 149-152.
28. Liu ZSh, Xu YF, Feng ShW, Li Y, et al. Baculovirus transduced mouse amniotic fluid-derived stem cells maintain differentiation potential. *Ann. Hematol*. 2009; 88: 565-572.

29. Eleanor AB, Kathleen AB, Polly YC, McNamara Morgan P, et al. Growth and differentiation of human lens epithelial cells in vitro on matrix. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2000; 41(12): 3893-3907.
30. Connor O, Michael D, W.Acavoy J. In vitro generation of function lens-like structures with relevance To age-related nuclear cataract. *Invest ophthalmol Vis Sci*. 2007; 48 (3):1245-1252.
31. Maleki M, Kazem P, Nabiyouni M, Parichehr Y, et al. Induction of Alpha-Crystallins Expression in Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells. *Iranian Journal of Ophthalmology*. 2010; 22(2): 67-71.

Characterization and Lens Fiber like Cells Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue and Amniotic Fluid: A Comparative Study

Mohseni kouchesfehani H, Ph.D.^{1*}, Nabiuni M, Ph.D.², Eslami N , MD.³,
Bahrebar KH, MD.³, Gheibi P , MD.³

1. Department of Animal Biology, Faculty of Biology Science, kharazmy University, Tehran, Iran, 1571914911
2. Department of Cell & Molecular, Faculty of Biology Science, kharazmy University, Tehran, Iran, 1571914911
3. Master of science, Department of Animal Biology, Faculty of biological Science, kharazmy University, Tehran, Iran, 1571914911

* Email corresponding author: kouchesfehani@yahoo.com

Received: 2 Jan. 2013

Accepted: 14 Jan. 2014

Abstract

Aim: In this study the effect of vitreous humor on the mesenchymal stem cells (MSCs) derived from bone marrow, adipose tissue and amniotic fluid to lens like cells was investigated.

Material and methods: In this experimental study collected stem cells from femurs bone marrow and inguinal fat pads of mature NMRI mice and amniotic fluid of 13 days embryos of NMRI mice were cultured. The mesenchymal character of these cells was proven by flow cytometry markers like CD90, CD31. This experiment took place for 14 days with different dosages 10, 15, 20, 30, 40, 50 % of bovine vitreous humor. Express of crystalline markers were detected by immunocytochemistry in experimental and control groups.

Results: The flow cytometric analyses of surface markers were shown expression of CD90 by bone marrow and amniotic fluid stem cells and adipose tissue stem cells (29/29%, 0/57%, 82%, respectively). Moreover, mesenchymal stem cells from these 3 sources had expression of CD31 (3/44%, 1/53%, 0/1%, respectively). Immunocytochemistry results revealed that 40 % vitreous humor in culture media fluid more inducing effect on adipose and amniotic fluid mesenchymal stem cells and 15 % vitreous humor on bone marrow stem cells in order to differentiate.

Conclusion: According to the findings of this study, it can be concluded that MSCs derived from all sources can differentiate into lens fiber like cells by inducing effect of vitreous humor.

Keywords: Mesenchymal Stem Cells, Vitreous Body, Crystalline