Review Article

Liver Development and *In vitro* Differentiation of Embryonic Stem Cells to Hepatocytes

Behshad Pournasr, M.Sc.[1], Zahra Farzaneh, B,Sc.[1, 2], Mansoureh Shahsanvani, B.Sc.[1], Hossein Baharvand, Ph.D.[1, 2*]

1. Stem Cells and Developmental Biology Department, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran
2. Developmental Biology Department, University of Science and Culture, ACECR, Tehran, Iran

**** Corresponding Address: P.O.Box: 19395-4644, Stem Cells and Developmental Biology Department, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran***
Email: baharvand@royaninstitute.org

Received: 18/Jan/2009, Accepted: 7/Jun/2009

Abstract

Embryonic stem cells are characterized with two specific properties: self renewal and differentiation potential. Embryonic stem cells are pluripotent cells that can be differentiated into three kind of germ layers; ectoderm, endoderm, mesoderm. These properties make them ideal for developmental research, toxicology and transplantation in animal model of human diseases. These cells can be differentiated spontaneously into three germ layer cells, but in direct differentiation, molecules and growth factors involved in natural development of desired cells must well characterized to gain a proper differentiation *in vitro*.
There are increasing numbers of death because of liver disease and failure of organ transplantation in our country and the world. This made stem cell scientists to work on embryonic stem cell differentiation to hepatocyte like cells to create an accessible cell source in regenerative medicine of liver disease in the future, and also to establish stem cell derived hepatocyte for *in vitro* screening of drugs.
In this review we will summarize the process of liver development including molecules and growth factors incorporate in the liver development as a template for *in vitro* differentiation of mouse and human embryonic stem cells and then we will discuss the related studies and techniques for analyzing functionality of differentiated cells.

Keywords: Embryonic Development, Hepatocytes, Embryonic Stem Cells, Differentiation

Yakhteh Medical Journal, Vol 11, No 4, Winter 2010, Pages: 348-373

تکوین کبد و تمایز آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های کبدی

بهشاد پورنصر .M.Sc[1]، زهرا فرزانه .B.Sc[2،1]، منصوره شاهسونی .B.Sc[1]،
حسین بهاروند .Ph.D[2،1*]

۱. پژوهشکده رویان،مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران
۲. دانشگاه علم و فرهنگ جهاد دانشگاهی، گروه زیست شناسی تکوینی، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی
پست الکترونیک: Email: baharvand@royaninstitute.org

دریافت مقاله: ۸۷/۱۰/۲۹، پذیرش مقاله: ۸۸/۳/۱۷

چکیده

سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های پرتوانی هستند که توانایی تکثیر نامحدود در محیط آزمایشگاه و تمایز به انواع رده‌های سلولی را دارا می‌باشند. امروزه با توجه به توان بالای تمایز این سلول‌ها به سلول‌های عصبی، قلبی، کبدی و ... آنها را کاندید مناسبی جهت مطالعات تکوینی، داروشناسی، ناهنجاری‌شناسی و پیوند به مدل‌های حیوانی بیماری‌های انسانی نموده است که توانایی ترمیم بافت آسیب دیده توسط این سلول‌ها صورت می‌گیرد. تمایز این سلول ها در آزمایشگاه مستلزم دانستن وقایعی است که در طی تکوین طبیعی در ایجاد سه لایه جنینی رخ می دهد.

با توجه به نیاز بیماران کبدی به یک درمان مطمئن، همواره تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های کبدی، یکی از اهداف دانشمندان این عرصه تحقیقاتی جهت یافتن روش کار استاندارد این تمایز، استفاده از این سلول‌های تمایز یافته جهت درمان یا غربالگری داروهای مورد نیاز و موثر یک بیماری خاص بوده است. یک تمایز موفق، زمانی حاصل می‌شود که سلول در شرایط آزمایشگاهی همان کنام واقعی خود را در شرایط طبیعی تجربه نماید.

در این مقاله مروری سعی شده است طی مطالعات مختلف، با ارایه یک شمای کلی از روند تکوین طبیعی کبد و مکانیسم‌های مولکولی دخیل در آن، راهکارها و رویکردهای تمایز خودبه‌خودی و جهت‌دار سلول‌های بنادی جنینی موشی و انسانی، ارزیابی سلول‌های تمایز یافته، مشکلات موجود در روند تمایز و چشم‌انداز آن بحث گردد.

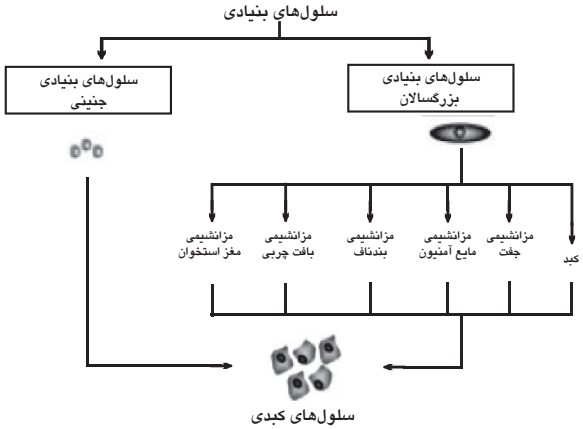
* **کلیدواژگان:** تکوین جنینی، سلول‌های کبدی، سلول های بنیادی جنینی، تمایز

فصلنامه پزشکی یاخته، سال یازدهم، شماره ٤، زمستان ۸۸، صفحات: ۳۷۳-۳٤۸

مقدمه

سلول‌های بنیادی سلول‌هایی با پتانسیل تمایزی در مراحل مختلف تکوینی هستند که می‌توانند در ترمیم و بازسازی یک بافت صدمه دیده عمل کنند. در شرایط مناسب این سلول‌ها توان تمایز به سایر سلول‌ها و بافت‌ها را دارا می‌باشند چون دارای ویژگی خود نوزایی بوده و برای مدت طولانی می‌توانند سلول‌های شبیه خود را تولید کنند. این ویژگی‌های منحصر به فرد، آنها را کاندید مناسب جهت استفاده درمانی در بیماری‌هایی مثل بیماری‌های مزمن کبدی، صدمات نخاعی، پارکینسون، آلزایمر و حتی دیابت نموده است .

کبد، ارگانی است که درمان بیماری‌های آن یکی از اهداف اصلی استفاده از سلول‌های بنیادی می‌باشد. اگرچه خود کبد، یک بافت با توانایی خودترمیمی بالا است اما در بعضی موارد این سلول‌های کبدی دچار نقص شده و نیاز به جایگزینی دارند. در جامعه پزشکی حذف قسمت از کار افتاده کبد تقریبا منسوخ شده است و تنها راه، پیوند کبد می‌باشد که با مشکلاتی از قبیل رد پیوند و محدود بودن دهنده‌ها همراه است. همین امر دانشمندان و محققان را به سمت یافتن منبعی جدید برای این سلول‌ها سوق داده است که سلول‌های بنیادی به دلیل توان تکثیر و تمایزی بالا به عنوان کاندید مناسب و منبع جدید برای تولید سلول‌های کبدی در آزمایشگاه می‌باشند. از طرف دیگر داشتن منبعی از سلول‌های کبدی که بتوان داروها و انواع ترکیبات درمانی را قبل از به کار بردن برای بیمار بر روی آن آزمایش نمود، محققان را به سمت ایجاد تولید سلول‌های کبدی از سلول‌های بنیادی سوق داده است. انواع سلول های بنیادی در شرایط آزمایشگاهی و در موجود زنده با روش کاربردهای متفاوت به سلول‌های کبدی تمایز داده شده‌اند (شکل ۱) (۱).



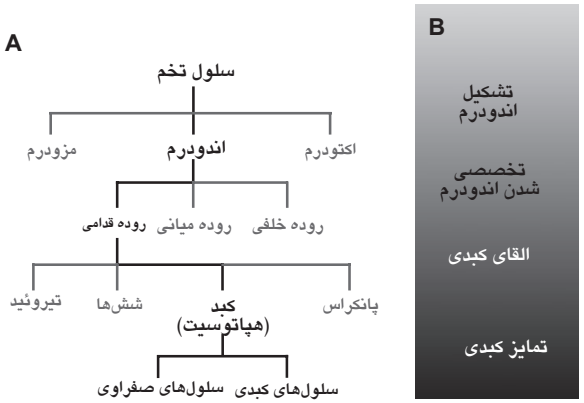
شکل ۱: تمایز انواع سلول‌های بنیادی به سلول‌های کبدی

از آن جایی که هنوز راه ثابتی برای این تمایز گزارش نشده است و نیاز به مطالعات بیشتر در این زمینه احساس می‌شود، در این مقاله سعی شده است تا با مروری بر تکوین کبد و مکانیسم‌های مولکولی آن - که درحقیقت الگوی مناسب جهت تمایز درون آزمایشگاهی است - مطالعات تمایز سلول‌های بنیادی جنینی موشی و انسانی به سمت

سلول‌های کبدی نیز ارایه گردد.

تکوین کبد

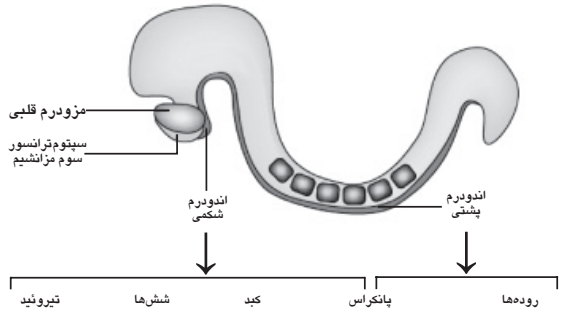
کبد، ارگانی با فعالیت‌های مختلف در دوران جنینی و بلوغ است که از لایه اندودرمی جنین منشا می‌گیرد (شکل ۲) (۲).



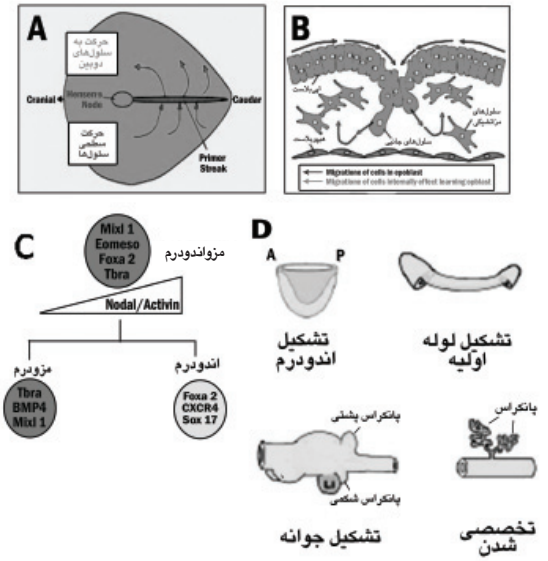
شکل ۲: منشا جنینی پارانشیم کبدی، تکوین دودمان هپاتوسیت و سلول‌های صفراوی از اندودرم جنینی

تشکیل اندودرم

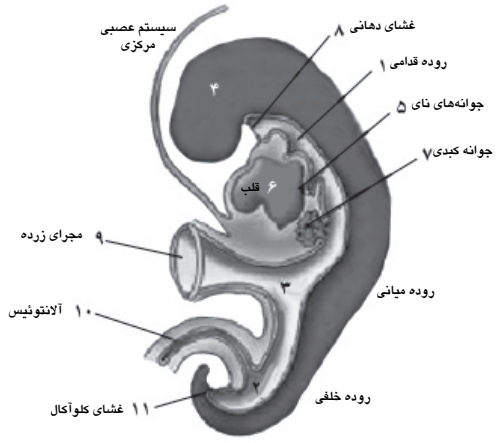
در طی گاسترولاسیون لایه‌های اندودرمی، مزودرمی و اکتودرمی در روزهای ۷-۶/۵ از سلول‌های پرتوان اپی‌بلاست جنینی مشتق می‌شود (شکل ۳). در ابتدای فاز گاسترولاسیون شیار اولیه که لایه ضخیم سلولی است در قسمت پشتی اپی‌بلاست ایجاد می‌شود، سپس به سمت جلو حرکت می‌کند. اولین سلول‌هایی که شیار اولیه را ترک می‌کنند و جایگزین اندودرم اولیه می‌شوند، داخلی‌ترین لایه یعنی اندودرم قطعی (Definitive Endoderm)، را می‌سازند. از این اندودرم گاه به اندودرم قدامی نیز یاد می‌شود زیرا زمان ایجاد آن همراه با تخصصی شدن قدامی- خلفی (Anterior - Posterior) آن است. اندودرم قطعی، شش‌ها، کبد ،پانکراس و معده را خواهد ساخت. در تخصصی شدن این لایه فاکتورهای رونویسی مثل Mixer، Sox17 و ... نقش دارند. سلول‌هایی که بعدا مهاجرت می‌کنند و بین اکتودرم و اندودرم قرار می‌گیرند، مزودرم را ایجاد می‌کنند. نشان داده شده است که در طی تکوین، یک جد سلولی دو توانه وجود دارد که بعد از مهاجرت از شیار اولیه بر اثر هم‌کنش‌های محیط و سلول‌های اطراف، مزودرم و اندودرم را تولید می‌کند و بر اساس میزان بیان ژن نودال (Nodal)، در اپی‌بلاست و اندودرم احشایی زیرین، این دو دودمان از هم جدا می‌شوند. غلظت بالای پروتئین‌های نودال موجب بیان ژن‌های اندودرم قطعی مثل ژن *Sox17* (برای پیشبرد، شکل‌گیری وتخصصی شدن اندودرم) و بیان ژن‌های *FOXa2*، *CXCR4* (که به ترتیب برای تکوین اندودرم قدامی و میانی) ضروری هستند، می‌شود در غلظت پایین سبب بیان ژن‌های مزودرمی مثل *T* و *Brachury* می‌شود. اکتیوین (Activin) هم که یک پروتیین وابسته به نودال است با غلظت بالا همین نقش را در تکوین اندودرم قطعی ایفا می‌کند (شکل ۳، ۴) (۲، ۳).



شکل ۳: جنین موش در مرحله ۶ سومایتی (مربع‌های کوچک) زمانی که اندودرم قطعی شروع به شکل‌گیری می‌کند.

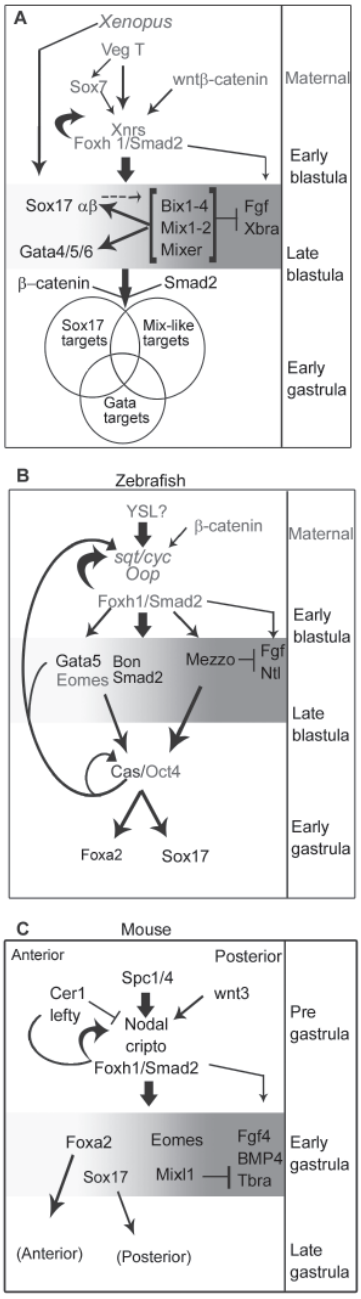


شکل ۴: فرمگیری اندودرم قطعی، A: مهاجرت سلول‌های اندودرم و مزودرم از میان شیار اولیه، B: برش عرضی از منطقه شیار اولیه، سلول‌های مهاجر در ابتدا بطری شکل هستند ویا با سلول‌های اندودرم احشایی زیرین جایگزین شده و اندودرم را تولید می‌کنند ویا در بین دو لایه باقی می‌مانند و تبدیل به سلول‌های مزودرمی می‌شوند. C: تشکیل اندودرم یا مزودرم از جد مزواندودرمی تحت غلظت متفاوت اکتیوین/ نودال و بیان ژنی آنها، D:خلاصه‌ای از تولید اندودرم تا شروع تواید یک اندام اندودرمی



شکل ۵: بخش‌های ایجاد شده بعد از چین‌های سری - دمی و جانبی

بعد از اینکه صفحه اندودرم قطعی تشکیل شد، جنین از سری، دمی و طرفین تحت فشار مایع آمنیون، چین خورده و خمیدگی پیدا می‌کند که این خمیدگی در قدام جنین باعث چین سری، در خلف چین دمی و از طرفین سبب ایجاد دیواره‌های جانبی و شکمی می‌شود. در این زمان صفحه اندودرمی به لوله گوارش اولیه تبدیل می‌شود که آن را بر اساس محور سری – دمی به لوله گوارش پیشین، میانی، پسین و بر اساس محور شکمی – پشتی به اندودرم شکمی و پشتی نام‌گذاری می‌کنند. منطقه قدامی – شکمی در اندودرم پیشین در روز ۹/۵–۸/۵ جوانه‌هایی برای تولید کبد، شش، تیروئید و قسمت شکمی پانکراس ایجاد می‌کند (شکل ۵).

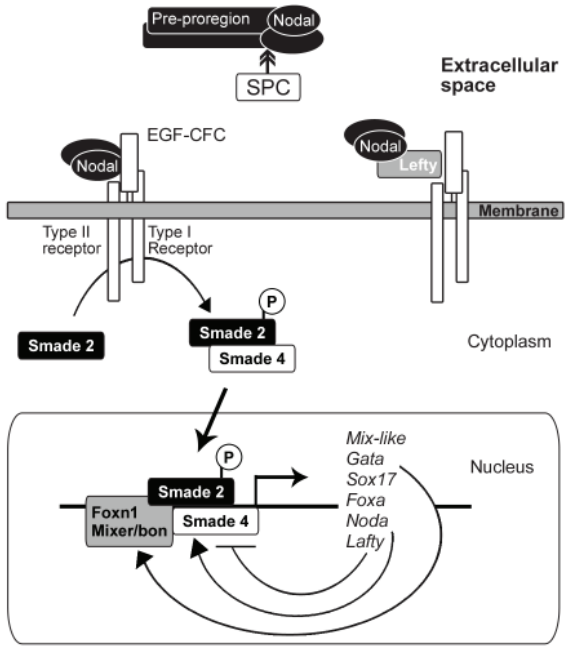


شکل ۶: نمایی از مسیر مولکولی تشکیل اندودرم در گونه‌های مختلف
A: زنوپوس، B: زبرافیش، C: موش

مسیر مولکولی کنترل کننده تشکیل اندودرم

شناسایی اخیر نشانگرهای مولکولی و برخی مولکول‌های پیام‌رسان کلیدی و فاکتورهای رونویسی در موجودات مختلف (موش، گورخرماهی، زنوپوس) نشان می‌دهد که برنامه مولکولی حفظ شده‌ای، تشکیل اندودرم را در گونه‌های مختلف هدایت می‌کند. در تمامی مهره‌داران مورد بررسی قرار گرفته، نشان داده شده است که نقش مسیر پیام‌رسان فاکتور رشد وابسته به نودال برای شروع تکوین اندودرم انکارناپذیر است (شکل ۶) (۴).

علاوه بر این، مسیر پیام‌رسانی نودال عامل مهمی برای تکوین مزودرم هم می‌باشد که این مطلب وجود پیش‌ساز مشترک اندودرم و مزودرم یعنی مزواندودرم را تایید می‌کند. به علاوه سیگنال‌دهی نودال در همکاری با مسیر Wnt/β-catenin الگوبندی مزواندودرم اولیه را نیز تنظیم می‌کند. بنابراین ژن‌های فرودست پیام‌رسان نودال هستند که سرنوشت نهایی سلول را برای اندودرم یا مزودرم شدن و همچنین شکل‌گیری موقعیتی محور خلفی – قدامی کنترل می‌کنند. اگرچه لیگاندهای متفاوتی در گونه‌های مختلف دیده شده است اما در تمام آنها پیام‌رسانی نودال، فعالیت گروهی مشابه از فاکتورهای رونویسی فرودست را تحریک می‌کند. این عوامل رونویسی شامل پروتیین‌های هومودمین
Mix-Like, Gata Zinc finger factor, Sox HMG (high mobility group) domain factors, Fox forkhead domain factors
و تمامی آنهایی که سرنوشت و بیان ژن اختصاصی اندودرم را تنظیم می‌کنند، هستند. در ادامه به طور خلاصه به معرفی این عوامل و نحوه عملکرد آنها در تکوین اندودرم می‌پردازیم.



شکل۷: نمایی از آبشار پیام‌رسانی نودال و فعال شدن فاکتورهای رونویسی پایین دست

مسیر پیام‌رسانی نودال

ژن نودال با مطالعات ژنتیکی در موش شناسای شد و به دلیل بیان در سازمان‌دهنده گاسترولای جنین موش یعنی گره یا نود

(Node) به این نام، نام‌گذاری شد (۵). پروتیین‌های وابسته به نودال متعلق به زیر خانواده اکتیوین، لیگاندهای پیام‌رسان ترشحی فاکتور رشد تبدیل شونده بتا می‌باشند. به نظر می‌رسد پروتیین ترشحی نودال با تحریک پاسخ‌های مشخص سلولی، وابسته به غلظت یا طول دوره تماس با لیگاند خود به عنوان ریخت‌زا وارد عمل می‌شوند. نودال همانند سایر اعضای خانواده (Transforming Growth Factor Beta; TGFβ) به صورت پیش پروتیین ترجمه شده و در مسیر ترشحی به صورت دایمر (دوتایی) در آمده که در نهایت به لیگاندهای فعال تبدیل می‌شود. مسیر فعالیت این مولکول در شکل ۷ نشان داده شده است (۴).

نودال هم در اپی‌بلاست و هم در اندودرم احشایی (Visceral Endoderm) بیان می‌شود. جنین‌های فاقد نودال کمی قبل از گاسترولاسیون و ایجاد شیار اولیه متوقف می‌شوند (۵). در یک بررسی موزاییک نشان داده شد حضور اندک سلول‌های بنیادی نوع وحشی در اپی‌بلاست نمونه‌های جهش یافته، همانند نودال، برای آغاز گاسترولاسیون کافی است (۶). نقش دیگر سیگنال‌دهی نودال در تخصصی شدن اندودرم است. این عملکرد وابسته به مقدار است بدین‌ترتیب که برای تخصصی شدن اندودرم حقیقی سطوح بالایی از پیام رسانی نودال ضروری است (تسریع تکوین اندودرم قدامی وبیان Hex و Foxa2) در حالی که در سطوح پایین‌تر برای تخصصی شدن مزودرم (تکوین اندودرم خلفی) عمل می‌کند (۷).

در بررسی لوکوس نودال، دو منطقه تنظیمی مسؤول رونویسی اولیه نودال شناسایی شده است. منطقه '۵ پروموتر شامل بخش‌های متفاوت اتصالی LEF-1/TCF که موجب شروع بیان نودال در گره می‌شوند و یک منطقه تقویت‌کننده اینترونی (Intronic Enhancer) متشکل از بخش‌های اتصالی Foxh1 که بیان ژن نودال را در اپی‌بلاست کنترل می‌کند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که آغاز بیان نودال مستلزم پیام‌رسانی Wnt/β-Catenin است، در حالی که حفظ بیان آن توسط خود تنظیمی وابسته به *Foxh1/Smad2* تنظیم می‌شود. این خود تنظیمی در تشکیل اندودرم موش ضروری است. چراکه حذف بخش اتصالی Foxh1 از تقویت‌کننده اینترونی، آشفتگی بیان نودال و تخصصی شدن اندودرم حقیقی را سبب می‌شود (۸). تعداد زیادی از اجزای پیام‌رسانی فرودست مسیر نودال نقش‌های مهمی در گاسترولاسیون و تخصصی شدم اندودرم ایفا می‌کنند. از دست دادن عملکرد کورسپتور (Co-Receptor) نودال و ژن هدف *Crypto*، عامل فرودست *Smad2* و شریک اتصالی آن *Foxh1*، ژن‌های هدف نودال ائومزودرمین (Eomesodermin) و *Foxa2*، تمامی سبب ایجاد جنین‌هایی با نقص گاسترولاسیون و نقص در تخصصی شدن اندودرم می‌شوند. از بین این فاکتورها Foxh1، Smad2 برای تخصصی شدن دودمان‌های اندودرم حقیقی سرنوشت سازند. سلول‌های بنیادی جنینی فاقد Smad2 به ندرت در تشکیل لوله گوارش در حال تکوین مشارکت می‌کنند. سلول‌های بنیادی فاقد Foxh1 به صورت مشابه در تشکیل روده قدامی (Foregut) موثر نیستند اما درتشکیل روده خلفی (Hindgut) در حین تکوین تاثیر می‌گذراند که بیانگر این است که دیگر پروتیین برهم‌کنش کننده Smad2 نیز تکوین اندودرم وابسته به نودال را در اکثر مشتقات اندودرم خلفی تنظیم می‌کنند (۴).

فاکتورهای رونویسی Mix like

خانواده Mix-Like فاکتورهای رونویسی هومئودومین دوتایی هستند. در تمامی گونه‌ها ژن‌های *Mix-Like* به صورت گذرا در طول مرحله بلاستولا و گاسترولا بیان می‌شوند که در تنظیم تکوین مزواندودرم درگیر شده‌اند. به علاوه به منظور هدف قرار گرفتن پیام نودال، به صورت فیزیکی، پروتیین‌های مختلف Mix-Like با کمپلکس‌های فعال شده Smad برای تنظیم رونویسی دیگر ژن‌های مزواندودرمی وابسته به نودال، برهم‌کنش می‌دهند. Mixl1 در موش، در لایه شیار اولیه هنگام تشکیل اندودرم بیان می‌شود. در سطح پروتیینی، رونویسی Mixl1 توسط پیام‌رسانی نودال فعال می‌شود (۹). جنین‌های فاقد Mixl1، شیار ابتدایی قدامی ضخیم شده با رشد بیش از حد در بافت مزودرمی محوری دارند. به علاوه، این جنین‌ها نقص آشکار تخصصی شدن اندودرم را ندارند و سلول‌های بنیادی جهش یافته *Mixl1-/-* در بیشتر بافت‌های اندودرمی مشارکت دارند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که Mixl1 ممکن است نقش دیر هنگام در گاسترولاسیون - زمانی که اندودرم خلفی تخصصی می‌شود - ایفا کند همچنین باعث سرکوب کردن سرنوشت مزودرم محوری شود (۴).

فاکتورهای رونویسی GATA4/5/6

فاکتورهای GATA، فاکتورهای رونویسی Zinc-Finger هستند که در کل فعال کننده رونویسی‌اند و به توالی مشخص T/A(GATA)A/G در روی DNA متصل می‌شوند. تاکنون شش عضو این خانواده در مهره‌داران شناسایی شده است که به دو زیر خانواده طبقه بندی می‌شوند: اعضای زیر خانواده اول GATA3، GATA2، GATA1 در تخصصی شدن رده‌های سلولی خونی، مزودرم شکمی و اکتودرم غیرعصبی مشارکت دارند و زیر خانواده دوم GATA6، GATA5، GATA4 در مشتقات اندودرمی و قلبی بیان می‌شوند که از اجزا کلیدی در تکوین اندودرم اولیه می‌باشند (۴).

فاکتور رونویسی Sox17

Sox17 از اعضای زیرخانواده Sox-F خانواده ژنی (Sry-like HMG box) می‌باشد. نقش Sox17 در تکوین و تخصصی شدن اندودرم به اثبات رسیده است. در مرحله میانی گاسترولای جنین هفت روزه موش بیان Sox17 به صورت گذرا در سلول‌های مجاور شیار اولیه قدامی مشاهده می‌شود که بیانگر سلول‌های اندودرمی تازه تخصص یافته است. در جنین ۷/۵ روزه Sox17 در اندودرم حقیقی قدامی بیان می‌شود و در جنین ۸ روزه بیان آن به روده خلفی محدود می‌شود. الگوی بیان ژن Sox17 سوالات جالبی را درباره نقش این فاکتور در تخصصی شدن اندودرم برمی‌انگیزد. مطالعات ژنتیکی بیان می‌کند که *Sox17* در تخصصی شدن اندودرم حقیقی خلفی دخالت دارد نه در اندودرم حقیقی قدامی! اگر چه فقدان Sox17 موجب کاهش قابل توجهی در آپوپتوزیس سلول‌های اندودرمی قدامی می‌شود اما این مطلب نشان می‌دهد که Sox17 در حفظ این جمعیت سلولی نیز دخیل می‌باشد. موش‌های ترانس‌ژنی که فاقد *Sox17* می‌باشند، توانایی ساخت و تشکیل روده قدامی، میانی و خلفی را ندارند (۴).

فاکتورهای رونویسی FoxA

گروه پروتیین Fox از فاکتورهای رونویسی خانواده بزرگ

متشکل از ۱۵ زیر گروه مختلف است. اعضای شناخته شده این گروه شامل ژن Forkhead در دروزوفیلا و فاکتورهای هسته‌ای کبدی، Hnf3α، Hnf3β، Hnf3y، *Foxa1*، Foxa2 و Foxa3 شناخته می‌شوند؛ به نظر می‌رسد زیر خانواده Foxa به عنوان اهداف پیام‌رسانی نودال ظاهر می‌شوند، به این ترتیب زیرخانواده Fox1(Fast1) کمپلکسی را با مولکول Smad2 تشکیل می‌دهد که رونویسی وابسته به نودال را میانجی‌گری می‌کند. سه فاکتور Foxa1، Foxa2 و Foxa3 در موش در مرحله گاسترولاسیون بیان می‌شوند. این فاکتورها علاوه بر محدوده بیانشان در زمان گاسترولاسیون درمراحل اولیه تشکیل سومایت، اثر هم‌پوشانی دارند. Foxa2 ابتدا در شیار اولیه قدامی جنین در مرحله گاسترولای میانی و در پایان گاسترولاسیون در اندودرم قدامی، گره، نوتوکورد و Ventaral Floor Plate بیان می‌شود. بیان Foxa1 اندکی بعد آغاز می‌شود که با Foxa2 در نوتوکورد، Ventral Floor Plate و اندودرم هم‌پوشانی دارد. Foxa3 تا مراحل انتهایی گاسترولاسیون و مرحله اول سومایت بیان نمی‌شود. مطالعات نشان داده است که جنین‌های فاقد Foxa1 یا Foxa3 زنده می‌مانند. این مطلب ثابت می‌کند که این فاکتورها در آغاز تخصصی شدن اندودرم ضروری نیستند. در مقابل موش‌های فاقد Foxa2، نقص درگاسترولاسیون و فقدان گره مشخص و نوتوکورد را نشان می‌دهند. مطالعات موش‌های ترانس‌ژن نشان می‌دهد که تکوین روده قدامی و میانی در جنین‌های *foxa2-/-* به شدت دچار آشفتگی می‌شود، درحالی که تکوین روده خلفی کمتر تاثیر می‌پذیرد (۴).

مسیر پیام رسانی Wnt/β-catenin

تا به امروز، اهمیت حضور یکی از لیگاندهای Wnt، یعنی Wnt3 برای آغاز گاسترولاسیون در موش نشان داده شده است. اگرچه جنین‌های موش فاقد Wnt3a (Wnt3a -/-)، در همان مراحل ابتدایی تکوین باقی می‌مانند اما نقش آنها در شکل‌گیری اندودرم مورد بررسی قرار نگرفته است. خارج ساختن ژنتیکی β-catenin، عامل فرودست سیگنال‌دهی Wnt، باعث توقف جنین‌ها درگاسترولاسیون و بروز نقص‌هایی در اندودرم احشایی- قدامی پیش از گاسترولاسیون می‌شود. مطالعات موش‌های کایمر نشان می‌دهد که β-catenin به صورت اولیه در اپی‌بلاست برای بنای اندودرم احشایی- قدامی و شروع گاسترولاسیون عمل می‌کند. بنابراین به نظر می‌رسد مسیر سیگنال دهی مرسوم Wnt در شروع سیگنال‌دهی نودال در موش دخالت داشته باشد. بررسی ژنتیکی و مطالعات بر روی حیوانات تخریب شده ژنتیکی (Knock Out) نشان دادند که β-catenin در سرنوشت سلولی به سمت اندودرم در مقابل مزودرم دخالت دارد. از این رو ظاهر شدن سلول‌های قلبی می‌توانند ناشی از نقش β-catenin در الگودهی تاخیری مزواندودرم باشد؛ زیرا مهار سیگنال‌دهی Wnt در مزودرم قدامی باعث می‌شود قلب به صورت اکتوپیک اختصاصی شود (۴).

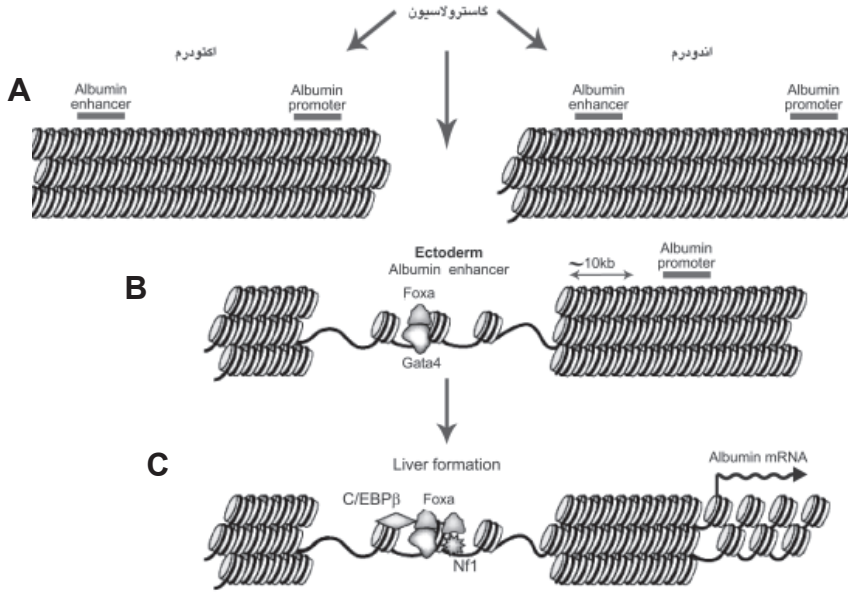
تشکیل کبد

در طی تکوین، حضور القاگر مناسب بافت را به سمت سرنوشت مشخص پیش می‌برد. بر هم کنش اندودرم و مزودرم زیرین آن در القای تکوین ارگان‌های گوارشی بسیار مهم است (۱۰). مناطق مختلف اندودرم بر حسب سیگنال‌های الگو دهنده که از مزودرم زیرین دریافت می‌کنند تبدیل به بافت‌های گوناگون می‌شوند.

به عبارت دیگر مولکول‌های سیگنال‌ده مزودرمی در مناطق پاسخ دهنده اندودرمی باعث شروع ارگانوژنز لوله گوارش می‌شوند. در اثر این سیگنال‌ها و فعال شدن فاکتورهای رونویسی در یک مرحله زمانی مشخص، ژن‌های اختصاصی کبد بیان شده و کبد به وجود می‌آید. نکته اصلی در تخصصی شدن بافتی این است که ژنی که برای فعال شدن، صلاحیت‌دار شده است در نتیجه درگیری فاکتورهای رونویسی بیان می‌شود. تا حدودی مکانیسم مولکولی، فاکتورهای رونویسی دخیل در فعال شدن ژن‌های اختصاصی کبد، فاکتورهایی که باعث باز شدن مناطق غیرفعال کروماتینی می‌شوند و فاکتورهایی که سبب پیشبرد فعالیت رونویسی می‌شوند، شناخته شده است. مطالعه‌ای بر تاثیر عوامل و فاکتورهای اولیه در ایجاد صلاحیت کبدی نشان داده است که اگر اندودرم در طی دوره ۸/۵ تا ۱۳/۵روزه در محور قدامی- خلفی از مزودرم مجاور آن جدا شده و دو روز در محیط کشت باشد، ژن‌های آلبومین فعال می‌شوند اما تکرار این آزمایش در اندودرم ۱۳/۵ روزه فعالیت ژن‌های آلبومین را درپی نخواهد داشت (۱۱).

تعداد زیادی از ژن‌هایی که در شکل‌گیری و الگوبندی اندودرم دخالت دارند، همچون *GATA4/5/6* و *Foxa* در تنظیم بیان ژن‌های کبدی در کبد بالغ نیزنقش دارند. به عنوان مثال سه فاکتور رونویسی وابسته به Foxa که رسما به عنوان فاکتور هسته‌ای کبدی شناخته شده‌اند، به عنوان فاکتور رونویسی تنظیمی بیان ژن‌های کبدی نیز مطرح می‌شوند. مطالعات در موجود زنده نشان داده‌اند که فاکتورهای Foxa، GATA به عناصر تقویت‌کننده در پروموتر آلبومین حتی در لوله گوارش اندودرم جنین تمایز نیافته، پیش از اینکه آلبومین رونویسی شود، متصل می‌شوند. این امر در حالی است که Foxa و GATA در بافت‌های غیراندودرمی متصل نیستند. مطالعات بیوشیمیایی نشان داده است که با اتصال Foxa، GATA احتمالا کروماتینی که از نظر رونویسی خاموش و به حالت فشرده است باز می‌شود. به محض اینکه کروماتین در وضعیت باز قرار می‌گیرد، شرایط برای رونویسی از آن فراهم شده و دیگر فاکتورهای ضروری رونویسی نیز برای پروموتر آلبومین فراخوانده می‌شوند تا رونویسی را در زمانی که کبدزایی شروع می‌شود، آغاز کنند (شکل۸).

در اثر چین خوردن سری جنین، لوله گوارش قدامی- شکمی در مجاورت مزودرم قلبی در حال تکوین قرار می‌گیرد (۳) بر هم‌کنش اندودرم قدامی- شکمی با مزودرم قلبی که حاوی قلب و بخش‌هایی از سپتوم ترانسورسوم (Septum Transversum; STM) است باعث تخصصی شدن بافت کبد می‌شود (۲). جالب‌تر آنکه در مراحل اولیه هر چند خود مزودرم قلبی زودتر تخصصی می‌شود (روز ۷/۵) (۱۲) اما حضور اندودرم برای القای مزودرم قلب زا هم مهم است و باعث پیشبرد بلوغ بیشتر قلب می‌شود. بر هم‌کنش بین مزودرم قلبی و اندودرم طی دو مرحله جداگانه در شروع ارگانوژنز، کبد را کنترل می‌کند: اول به دست آوردن صلاحیت کبدی و دوم القای سرنوشت کبدی و تخصصی شدن آن. فاکتورهای رشد فیبروبلاستی FGF1,2,8 در مزودرم قلبی و گیرنده آن FGFR1,2 که در اندودرم قدامی دیده می‌شود، باعث تخصصی شدن دودمان کبدی می‌شود (شکل ۹) (۱۳، ۱۴).



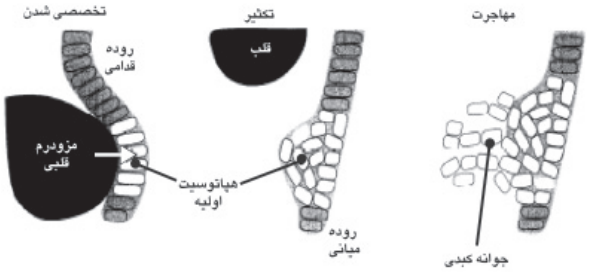
شکل ۸: برقراری صلاحیت و بیان ژن‌های کبدی در طی تکوین.
A: در وضعیت اول ژن در کروماتین بسته قرار دارد. نوکلئوزوم‌ها خیلی محکم بسته‌بندی شده‌اند و ژن از نظر رونویسی خاموش است. این وضعیت با بافت‌هایی همچون اکتودرم و مزودرم که فاقد پتانسیل برای فعال شدن رونویسی آلبومین هستند، مطابقت دارد. B: در وضعیت دوم اتصال فاکتورهای رونویسی FoxA، Gata4 به تقویت کننده برای بازشدن یک دومین از کروماتین کافی است اما برای فعال کردن رونویسی ناکافی است. در سلول‌های اندودرم چندین دومین کروماتین- به طور محلی باز پیشنهاد می‌شود که استعداد تکوینی را برای آلبومین منتقل می‌کند تا فعال شود. C: در وضعیت سوم در طی القای کبدی اندودرم محل‌های اتصال به دیگر فاکتور رونویسی (همچون C/EBP اشغال می‌شوند و ژن آلبومین فعال می‌شود (۱۱).

غلظت و مدت زمان مجاور بودن با فاکتور رشد فیبروبلاستی مترشحه از قلب بر سرنوشت اندودرم قدامی- شکمی اثر می‌گذارد به نحوی که اندودرم در غیاب (Fibroblast Growth Factor; FGF) ژن‌های پانکراسی، در حضور غلظت حد واسط از FGFژن‌های کبدی و در غلظت بالای FGFژن‌های شش را بیان می‌کند (شکل ۱۰) (۲، ۳). فاکتورهای رشد فیبروبلاستی تاثیر گذارنده‌هایی کوتاه برد هستند (۱۵) بنابراین اندودرم و مزودرم قلبی باید در مجاور هم باشند (۱۶). FGFها علاوه بر نقشی که در مراحل اولیه هپاتوژنز ایفا می‌کنند، در مراحل بعدی نیز نقش دارند. اندودرم قدامی شکمی در روز ۸/۵ حاوی پیش‌سازهای دو توانی کبد و پانکراس است و سیگنال‌دهی FGF می‌تواند سرنوشت اندودرمی را - که به صورت از پیش تعیین شده پانکراسی است - به سمت سرنوشت کبدی تغییر دهد (۱۴).

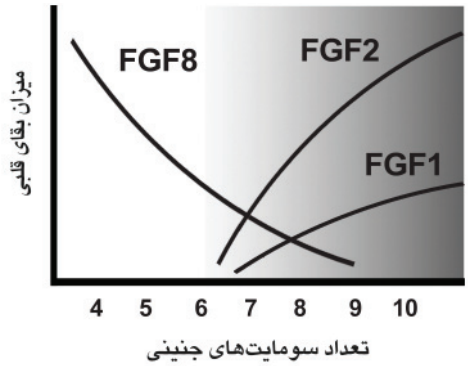
در مراحل اولیه تکوین بر هم‌کنش بین اندودرم و مزودرم زیرین در القای اندام‌های گوارشی مهم است. (همان‌گونه که در بالا اشاره شد کبد نیز یکی از این اعضا می‌باشد)، به این ترتیب مراحل تکوین کبد را می‌توان به دو فاز تقسیم‌بندی نمود:

۱. القای اولیه که در مرحله ۷-۵ سومایتی رخ می‌دهد و مزودرم قلب‌زای اولیه که حاوی قلب آینده و بخش‌هایی از سپتوم ترانسورسوم (STM) است باعث القای اندودرم قدامی مجاور جهت تشکیل کبد می شود (صلاحیت کبدی (Hepatic Competence)).

۲. القای ثانویه که در مرحله جوانه کبدی و ۲۵-۱۲ سومایتی رخ می‌دهد و برهم‌کنش بین اندودرم کبدی و مزودرم قلبی که برای تکثیر، مورفوژنز و تمایز جوانه کبدی در حال رشد نیاز است، ادامه می‌یابد (القای کبدزایی(Hepatogenesis)) (۳).



شکل ۹: مراحل تکوین کبد و نقش مزودرم قلب‌زا



شکل ۱۰: شیب غلظتی مولکول‌های ترشحی FGFها در تکوین کبد

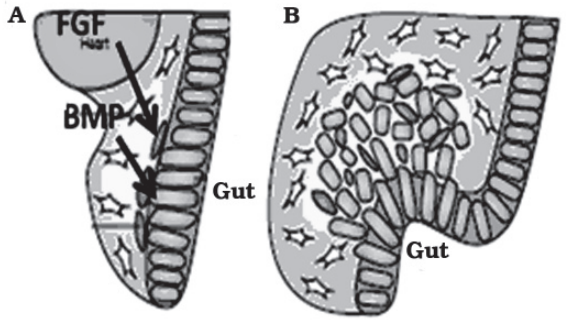
القای اولیه کبدی

اولین نشانه تکوین کبد، ضخیم شدن اندودرم قدامی - شکمی مجاور قلب در روز ۹ است. وقتی بخشی از اندودرم قدامی به بافت

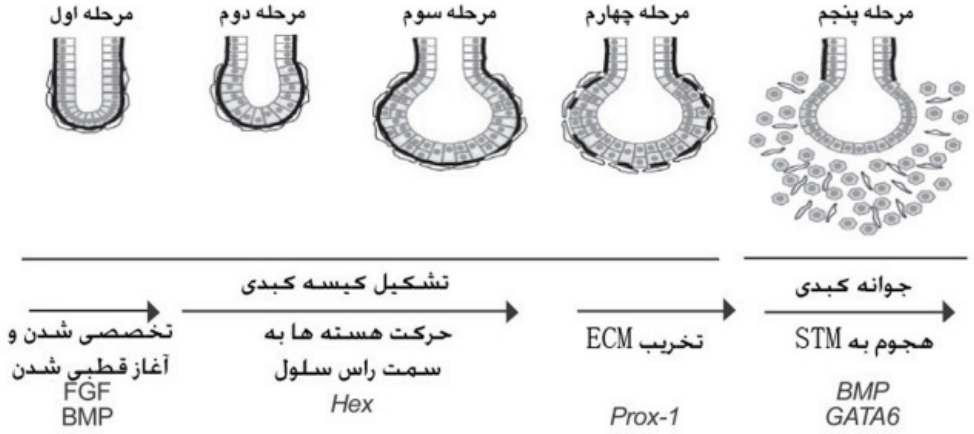
کبد تخصص یافت، کیسه کبدی (Diverticulum) شکل می‌گیرد (شکل ۱۱). در این مرحله به سلول‌های اندودرمی هپاتوبلاست گویند که دو توانه است و ژن‌های هپاتوسیت و سلول‌های اپی‌تلیال صفراوی را که جد سلول صفراوی است، بیان می‌کنند (۱۴). قبل از شکل‌گیری شبکه عروقی کبدی، سلول‌های اندوتلیال و آنژیوبلاست با منشا نامشخص بین سلول‌های اندودرم و مزانشیم سپتوم ترانسورسوم قرار گرفته و جوانه اولیه را احاطه می‌کند و نه تنها باعث تکوین عروق کبدی می‌شود بلکه این سلول‌های اندوتلیال با ترشح فاکتورهای نامشخص پاراکراینی سبب تکثیر و مهاجرت هپاتوبلاست‌ها (۲) و نیز سنتز اجزای ماتریکس خارج سلولی مثل لامینین، کلاژن نوع ۱، ۳ و ۴ و نیز فیبرونکتین (۱۷) شده و رشد جوانه اولیه کبدی را کنترل می‌کند. هپاتوبلاست‌ها در تماس و در ارتباط با سلول اندوتلیال باقی می‌مانند (۱۱). دو فرضیه در مورد حضور سلول‌های اندوتلیال وجود دارد: یکی اینکه سلول‌های اندوتلیال به صورت درجا در ارگان‌ها تکوین می‌یابند و دیگر اینکه این سلول‌ها توسط دیگر ارگان‌ها فراخوانی و برای تولید عروق خونی القا می‌شوند و سلول‌های کبدی را برای مهاجرت القا می‌کنند. تکوین عروق کبدی ترکیبی از دو مکانیسم رگ‌زایی (Angiogenesis) و رگ‌سازی (Vasculogenesis) است (۱۶). مویرگ‌های سینوزوییدی و سیاهرگ پورت از اولین عروقی هستند که تکوین می‌یابند و سیاهرگ میانی لوبول و شریان پورت شکل می‌گیرد (۱۶) (شکل ۱۱).

فاکتورهای رونویسی موثر در القای اولیه کبد

Hex از اولین ژن‌هایی است که در کبد بیان می‌شود (۴). بیان آن در زمان گاسترولا در اندودرم قطعی سپس در اندودرم قدامی- شکمی و در نهایت در فرد بالغ به کبد و تیروئید و سلول‌های اندوتلیال (۱۱) محدود می‌شود. بیان Hex به سیگنال‌دهی BMP، FGF نیاز دارد (۲). ژائو و همکارانش با مطالعات ژنتیکی دریافتند که جنین‌های جهش یافته *-/-Hex*، اپی‌تلیوم ضخیم شده‌ای دارند و بیان‌گذرای ژن‌های کبدی را آشکار می‌کنند که بیانگر این نکته است که القای اولیه کبد رخ داده است اما از تکوین کبد جلوگیری به عمل آمده است. همچنین سلول‌های کبدی *-/-GATA6* قادر به مهاجرت به STM نیستند و در جنینن ۹/۵ روزه هیچ جوانه کبدی یا بیان مداوم نشانگرهای کبدی دیده نمی‌شود، از این رو GATA6 برای تکوین کبدی کمی پس از القای کبدی ضروری به نظر می‌رسد. فاکتور رونویسی هومئودومین Prox1 در اپی‌تلیوم ضخیم شده کبدی جنین ۹ روزه بیان می‌شود و به نظر می‌رسد کمی بعد از GATA6، Hex در کبدزایی عمل می‌کند. فقدان Prox1 در موش منجر به شکل‌گیری کبدی کوچک و بدون هپاتوسیت و متشکل از بافت مزانشیمی می‌شود. این سه فاکتور رونویسی به صورت آبشار ژنتیکی عمل می‌کند و این آبشار به وسیله پیام‌رسانی FGF و Bone Morphogenetic Protein (BMP) با Hex و GATA6 که قبل از Prox1 عمل می‌کنند فعال می‌شود (شکل ۱۲) (۱۱).



شکل ۱۱: ایجاد جوانه کبدی: A: قرار گرفتن مزانشیم قلب و سپتوم ترانسورسوم در کنار اندودرم قدامی- شکمی و ترشح FGF،BMP. B: تکثیر اندودرم قدامی- شکمی در مجاور قلب و ایجاد کیسه کبدی و تجزیه غشا و مهاجرت هپاتوبلاست به سپتوم ترانسورسوم و مجاور شدن با سلول‌های مزانشیم و اندوتلیال در این محل و ایجاد جوانه کبدی.



شکل ۱۲: در مدل مولکولی که زارت و همکارانش ارایه دادند. A: القا اولیه کبدی در طول سومایت پنج تا هفت Pair stage اتفاق می‌افتد زمانی که اندودرم Foregut شکمی، که فاکتورهای صلاحیت Gata 4-6 و FoxA را بیان می‌کند، به وسیله پیام‌های FGF و BMP از مزودرم قلب زا مجاور برای تشکیل کبد با خبر می‌شود. سیگنال‌های ناشناخته از مزودرم محوری تکوین کبدی نابه‌جا را در لوله گوارش خلفی سرکوب می‌کند. B: در پاسخ به القای اولیه کبدی، ضخامت لایه‌های اپیتلیومی، یک جوانه کبدی را تشکیل داده و بیان میزان پایین از آلبومین را آغاز می‌کند. غشای پایه جدا کننده اندودرم پیش کبدی از مزانشیم تجزیه می‌شود. C: برهم‌کنش‌های بین اندودرم کبدی و مزانشیم STM، همچون سلول‌های اندوتلیالی مهاجرت هپاتوبلاست‌ها را به STM پیش می‌برد تا جوانه کبدی شکل گیرد. از جنین ۵/۹ به بعد جوانه کبدی به خاطر برهم‌کنش‌های پیوسته مزانشیم اپیتلیایی که برای پیش برد تکثیر و بقای نهایی هپاتوبلاست‌ها ضروری هستند، سریعا رشد می‌کند.ژن‌هایی که در این فرآیندها دخالت داده شده‌اند و نوع سلولی که در آن سلول آن ژن‌ها عمل می‌کنند شناسایی شده است .

فاکتورهای رونویسی GATA, FOX و Hepatocyte Nuclear Factor (HNF) باعث کنترل صلاحیت اندودرم جهت تشکیل کبد شده (۱۶) و برای بیان ژن‌های کبدی ضروری هستند (۳). پروتیین‌های GATA فاکتوری ضروری برای فرم‌گیری جوانه کبدی و تخصصی شدن کبد هستند (۱۴). اگرچه زیرواحدهای آنها عملکرد تقریبا مشابه دارند اما می‌توان گفت از میان آنها GATA6 در تسهیل تمایز هپاتوبلاست اولیه و توسعه کیسه کبدی نقش دارد (۱۶). بیان GATA که به واسطه BMP تنظیم می‌شود، می‌تواند تعیین کننده کلیدی در تبدیل اندودرم به سلول‌های کبدی در پاسخ به FGF باشد (۱۸). GATA بالادست فاکتور رونویسی HNF4α است و باعث فعال‌سازی بیان آن می‌شود (۱۰) و این گونه بر مراحل بعدی ارگانوژنز کبد، اثر می‌گذارند (۱۴). اگرچه GATA4,6 برای تکوین اندودرم احشایی خارج جنینی ضروری است (۱۰)، اما Foxa2 (HNF3β) برای تکوین اندودرم قدامی- شکمی نقش اساسی ایفا می‌کند (۲).

اما FGF به تنهایی برای القای تکوین کبد کافی نیست و سیگنال‌دهی FGF از مزودرم قلبی و BMP از مزانشیم سپتوم ترانسورسوم (۱۵) با هم باعث تخصصی شدن اندودرم قدامی- شکمی برای تشکیل کبد می‌شود وسیگنال‌دهی BMP هم در ایجاد صلاحیت کبدی اندودرم قدامی ضروری است (۱۴) اما کافی نیست و به صورت هماهنگ با FGF عمل می‌کند (۲).

مجاورت اندودرم با مزودرم قلب زا برای تعین دودمان کبدی ضروری است در حالی که مزانشیم سپتوم ترانسورسوم در مراحل اولیه القایی نقشی ندارد و بعدا باعث تکثیر و تمایز کامل هپاتوسیت می‌شود (۱۷).

BMPها برخلاف FGFها تا فاصله بیشتری از جایگاه ترشحشان تاثیر گذارند (۱۰). مسیر پیام‌رسانی سیگنالBMP از بیان ژن‌های پانکراسی جلوگیری می‌کند (۱۲). تاثیر غلظت این مواد به اثبات رسیده است به طوری که با توجه به غلظت می‌تواند چندین سرنوشت سلولی را القا کند که یک غلظت منحصر به فرد از آن برای تخصصی شدن سرنوشت کبدی در اندودرم شکمی- قدامی مورد نیاز است (۱۰). شروع تکوین ارگان‌هایی مانند کبد، پانکراس، تیروئید، اندام‌ها و قوس حلقی با ایجاد جوانه اولیه است. ایجاد جوانه اولیه به مراحلی جداگانه تقسیم می‌شود؛ در فاز اول تشکیل جوانه درمحور جنین در حال تکوین مشخص می‌شود. مولکول‌های سیگنال ده در جوانه کبدی و حرکات مورفوژنیک آن باعث نزدیک شدن اندودرم شکمی به مزودرم قلبی و در نهایت مزانشیم STM می‌شود. این مکان اندودرم کبدی آینده را در محیطی از فاکتورهای سیگنال‌ده مشخص به نام BMPها و FGFها قرار می‌دهد و موقعیت آن را درون محورهای قدامی- خلفی، پشتی- شکمی و کناری-میانی (Medial-Lateral) در جنین تثبیت می‌کند.

القای ثانویه کبدی: رشد جوانه کبدی و ریخت‌زایی و فاکتورهای دخیل در آن

پس از تخصصی شدن دودمان کبدی، القای ثانویه بین مزانشیم جوانه کبدی و هپاتوبلاست‌ها برای رشد، ریخت‌زایی و سرانجام تمایز به بافت کبد بالغ ضروری است. به نظر می‌رسد STM منبع اصلی فاکتورهای ترشحی درون جوانه کبدی است که بقا، تکثیر و ریخت‌زایی هپاتوبلاست‌ها درمدل القای ثانویه را پیش می‌برد. همچنین علاوه بر نقش آن در القای اولیه کبدی، به نظر می‌رسد سیگنال‌رسانی FGF، BMP، STM در تکثیر و مهاجرت هپاتوبلاست‌ها مشارکت داشته باشد (۲). کیسه کبدی طی دو مرحله، جوانه کبدی را شکل می‌دهد (۱۴). در مرحله اول کیسه کبدی ضخیم (روز ۹/۵-۹) و هپاتوبلاست‌ها قطبی می‌شود یعنی هسته‌ها از موقعیت هسته‌ای خود به سمت راس حرکت می‌کنند که به این حرکت هسته‌ای یا Inter kinetic Nuclear Migration (INM) گویند (۱۴) که با حرکت هسته از پایه به راس باعث سنتز DNA در سطح پایه می‌شود و ورود سلول به مرحله میتوزی و تکثیر به سمت خارج از حفره لوله گوارش آغاز می‌گردد. در مرحله دوم - که دوازده ساعت بعد رخ می‌دهد - هپاتوبلاست‌ها تکثیر می‌شوند. غشای پایه‌ای یعنی این اندودرم پیش کبدی را از مزودرم مجاورش جدا می‌کند و غنی از لامینین و کلاژن نوع چهار است متلاشی می‌شود. سلول‌های هپاتوبلاست به صورت ساختارهای طنابی شکل به سپتوم ترانسورسوم که غنی از کلاژن است (۱۱) مها جرت می‌کند و جوانه کبدی را شکل می‌دهد. لازم به ذکر است که هپاتوبلاست‌ها قبل از مهاجرت، از طریق مولکول E-cadherin با یکدیگر اتصال محکم دارند و در زمان مهاجرت، بیان این مولکول کاهش یافته و هپاتوبلاست‌ها به راحتی از هم جدا می‌شوند. در این میان فاکتور رونویسی Prox1 باعث تنظیم Turn Over غشای پایه می‌شود که برای تهاجم هپاتوبلاست‌ها ضروری است (۲) و باعث تخصصی شدن کبد و توسعه مورفوژنیک جوانه کبدی می‌شود(۱۷).

فاکتور رشد سلول کبدی و گیرنده آن c-Met

پیام مهم دیگر مزانشیمی، فاکتور رشد سلول کبدی است که در آغاز به عنوان میتوژن کبدی شناخته شد. HGF فرایندهای مختلفی از جمله تکثیر، همانندسازی DNA، بقای سلولی، بازدارندگی توموری و مرگ سلولی را تحریک می‌کند. STM، HGF و هپاتوبلاست‌ها از طریق پروتوانکوژن C-Met، که یک گیرنده غشایی تیروزین کینازی است، به سیگنال‌های HGFپاسخ می‌دهند.موش‌های جهش یافته *HGF-/-, C-Met-/-*پراکندگی پارانشیمی و هیپوپلازی کبدی را در نتیجه کاهش تکثیر هپاتوبلاست‌ها، آپوپتوزیس و نقص‌هایی در اتصالات سلولی نشان می‌دهند (۲).

فاکتور Wnt/β-catenin

مسیر معمول Wnt/β-catenin مضاف بر Tomorigenesis کبدی در رشد جوانه کبدی مشارکت دارد. در جنین موش و پرندگان هپاتوبلاست‌های در حال تکثیر، لیگاندهای ترشحی Wnt3A را علاوه بر سطوح بالای β-catenin بیان می‌کنند. در جنین جوجه زمانی که بیان β-catenin بالا می‌رود، اندازه کبدی افزایش می‌یابد در حالی که با آنتاگونیست‌های Wnt سایز کبدی کاهش می‌یابد به صورت مشابهی، کاهشβ-catenin در کشت‌های جوانه کبدی موش به وسیله الیگوهای آنتی‌سنس DNA علاوه بر از دست رفتن نشانگر صفراوی یعنی سیتوکراتین ۱۹ منجر به کاهش تکثیر و افزایش آپوپتوزیس می‌شود. این امر نشان می‌دهد که احتمالا β-catenin در تکوین اپی‌تلیوم صفراوی نیز مشارکت داشته باشد. ممکن است سیگنال‌دهی Wnt تنها راه فعال‌سازی β-catenin نباشد؛ زیرا که شواهد موجود نشان می‌دهد HGF می‌تواند باعث القای انتقال هسته‌ای β-catenin در هپاتوسیت‌های رت بالغ شود و بدین‌وسیله تکثیر راه‌اندازی شود. بنابراین ممکن است مسیرهای HGF، Wnt از طریق β-catenin برخی از عملکردهایشان را تنظیم کنند (۲، ۱۹).

فاکتور رشد انتقال دهنده β (TGF-β)

لیگاندهای چندگانه TGFβ در مزانشیم جوانه کبدی موش‌های در حال تکوین بیان می‌شوند. اگر چه سیگنال‌دهی TGFβ برای مهار تکثیر هپاتوسیت‌های بالغ شناخته می‌شود اما مدارکی موجود است که TGFβ رشد کبد جنینی را نیز پیش می‌برد، به طوری که حذف هدفمند لیگاندهای اختصاصی TGFβ کبدزایی و فنوتیپ کبدی را با مشکل روبرو می‌سازد. کبد در حالت تکوین و توسعه تعدادی از گیرنده‌های TGFβ از جمله TGFβRIII را بیان می‌کند و در جوانه کبدی موش‌های جهش یافته *TGFβRIII-/-* افزایش آپوپتوزیس مشاهده می‌شود. همچنین میانجی‌های کلیدی درون سلولی سیگنال دهی TGFβ شامل Smad3، Smad2 برای تکوین کبد ضروری می‌باشند. حیوانات جهش یافته هتروزیگوت در مواردی که یک نسخه از Smad2 و یک نسخه از Smad3 در آنها حذف شده باشد، از هپاتوپلازی کبدی و درهم ریختگی معماری کبدی ممانعت می‌کنند در حالی که نشانگرهای کبدی را بیان می‌کنند که نشان می‌دهد دودمان کبدی در ابتدا تخصصی شده است. همچنین فنوتیپی مشابه در موش‌های جهش یافته برای ELF (پروتیین برهم‌کنش دهنده Smad2/3) گزارش شده است. معماری به هم ریخته کبدی در موش *Smad2+/-*، *Smad3+/-* با کاهش بیان پروتیین اتصالی سلولی β1-integrin و هدف شناخته شده TGFβ، همراه است. این یافته‌ها تاییدی بر نتایج مطالعات روی موش‌های کایمری است که نشان داده‌اند سلول‌های ناقص β-Integrin از کلونیزه کردن کبد عاجزند. اضافه کردن HGF به محیط کشت جوانه‌های کبدی *Smad3+/-*، *Smad2+/-* عیوب تکثیر را مرتفع می‌سازد و بیان β1-Integrin، دوباره برقرار می‌شود. می‌توان نتیجه گرفت HGF، TGFβ به موازات هم در کنترل هپاتوبلاست‌ها عمل کرده و مورفولوژی کبدی را از طریق β1-Integrin اعمال می‌کنند (۲).

فاکتورهای Foxm1b، Lhx2، H1x

فاکتورهای رونویسی متعددی، برهم‌کنش‌های مزانشیمی – اپی‌تلیالی را در جوانه کبدی تنظیم می‌کند. فاکتور رونویسی هومئودومین H1x در STM بیان می‌شود، موش‌های جهش یافته فاقد H1x در روز ۱۵ جنینی با هیپوپلازی کبدی وخیم از بین می‌روند. فاکتور رونویسی Lhx2 نیز در STM بیان می‌شود. فقدان Lhx2 منجر به کاهش سایز کبدی اما ظاهرا تمایز کبدی طبیعی می‌شود. ژن‌های هدفمند که به وسیله H1x و Lhx2 تنظیم می‌شوند، شناخته شده‌اند، اما بیان آنها در مزانشیم نشانگر این است که آنها احتمالا به صورت غیرمستقیم با فعال کردن بیان فاکتورهای ترشحی منجر به پیشبرد تکثیر هپاتوبلاست‌ها می‌شوند. تشابه فنوتیپ حیوان H1x knockout با *HGF-/-* یا *cMet-/-* پیشنهاد می‌کند که ممکن است H1x بیان HGF را تنظیم کند اگرچه این احتمال تاکنون به اثبات نرسیده است (۲۰).

فاکتور Foxm1b برخلاف H1x، Lhx2 درون هپاتوبلاست‌ها برای تنظیم تمایز نقش خود را ایفا می‌کند. هم حیوانات جهش یافته *Foxm1b-/-* و هم تخریب ژنی شده شرطی در ژن *Foxm1b* ویژه هپاتوبلاست‌ها، کاهش تعداد هپاتوبلاست‌ها را به دلیل ایجاد نقصان در میتوز نشان می‌دهند. همچنین در کبدهای جهش یافته ژن مذکور عدم تشکیل سینوزوئیدها ومجاری صفراوی درون کبدی دیده می‌شود (۲).

ژن‌های تنظیم‌کننده بقای کبدی

شناخت تعدادژن‌هایی که فاکتورهای رونویسی یااجزای سیگنال‌دهی را کد می‌کنند، رو به افزایش است و تاکنون بعضی از آنها شناسایی شده‌اند که برای پیشبرد بقای اولیه کبد و تکثیر آن در طول رشد جوانه کبد ضروری هستند. ویژگی مشترک این ژن‌ها این است که زمانی که جهش یافته‌اند موجب افزایش آپوپتوزیس یا نکروز جوانه کبدی و در نتیجه سبب مرگ جنینی بین روزهای ۱۰/۵ و ۱۶ جنینی می‌شوند. از این نوع ژن‌ها می‌توان به پروتوانکوژن‌های C-jun، K-ras، فاکتور رونویسی ژن Xbp1، فعال کننده پروتیین کیناز فعال شده میتوژن
(Mitogen Activated Protein Kinase Activator Sek 1; Sek1)
فعال کننده رونویسی متالوتیونین MTF1، پروتیین سیگنال ترانسداکشن
(Signal Transduction Protein Pik3; Pik3)
و اجزای آبشار التهابی فاکتور هسته‌ای b-کاپا
(Nuclear Factor Kappa b (NFk b) Inflammation cascade) (NFk B)
اشاره کرد. تصور بر این است که فعالیت این ژن‌ها به وسیله برهم‌کنش‌های رخ دهنده مزانشیمی- اپی‌تلیالی در جوانه کبدی کنترل می‌شوند، اما در اکثر موارد، مکانیزم آنها نامشخص است (۲).

مسیر Jagged/Notch

این نظریه وجود دارد که آغازگر ابتدایی فعال‌سازی فرادست HNF6 پیامی از مزانشیم پورتال است. .مسیر Notch کاندید مناسبی در این زمینه است. در طی شکل‌گیری صفحات مجرایی Jagged-1 لیگاند گیرنده Notch در مزانشیم احاطه کننده رگ پورتال و Notch-2 در هپاتوبلاست‌ها در طی شکل‌گیری صفحه صفراوی بیان می‌شوند. در هپاتوسیت‌های کشت شده از جنین موش‌های ۱۴روزه فعال‌سازی مسیر Notch منجر به سرکوب سرنوشت کبدی می‌شود در حالی که بیان آن در سلول‌های مجرای صفراوی که بیان بالایی از ck19 و HNF3β دارند، ادامه می‌یابد. در مقابل مهار پیام‌رسانی Notch باعث بیان نشانگرهای هپاتوسیت به جای نشانگرهای صفراوی می‌شود (۲۱). این نتایج نشان می‌دهد که برهم‌کنش‌های Jagged/Notch ممکن است یک آبشار درون سلولی Pkhd1→HNF1β→HNF6 کنترل کننده تمایز صفراوی را فعال کند. همچنین به نظر می‌رسد مسیر کنترل کننده تکوین سلول‌های صفراوی در مسیر Foxm1b و Wnt هم تنظیم شود. کبدهایی که *Foxm1b-/-* هستند، علاوه بر نقص در تکثیر هپاتوبلاست‌ها که در قبل ذکر شد، فاقد بیان HNF1β و مجاری صفراوی درون کبدی هستند. در کشت‌های رویانی، افزودن Wnt3a تمایز سلول‌های صفراوی را پیش می‌برد در حالی که حذف β-catenin بیان نشانگرهای صفراوی را در هپاتوبلاست‌های کشت شده مهار می‌کند. تعداد زیادی از ژن‌های ذکر شده شامل HNF1β و HNF6 تکوین درون کبدی و برون کبدی صفراوی را تنظیم می‌کنند (۲).

جدا شدن کبد و پانکراس

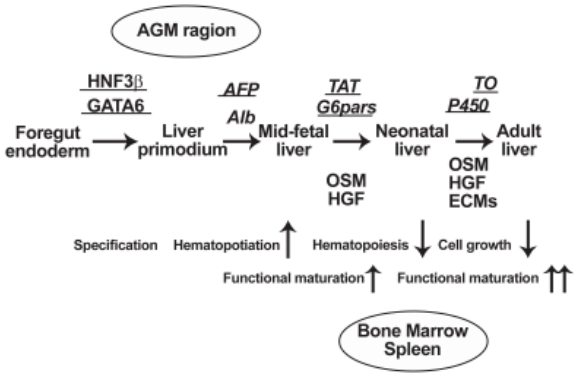
مزودرم قلبی علاوه بر القای تخصصی شدن کبد بر القای پانکراس نیز اثر می‌گذارد. اندودرم قدامی- شکمی در روز۸/۵ مکانی پر ازدحام است؛ زیرا سه بافت دیگر هم علاوه بر کبد در آنجا تخصصی می‌شوند. آیا بافت‌های مورد نظر اندودرمی در مراحل اولیه تکوین پیش الگوبرداری می‌شوند و بعد سیگنال‌های القاگر بافتی باعث تمایز به بافت‌های مختلف می‌شود یا همه سلول‌های اندودرم قدامی - شکمی، چند توان هستند و سیگنال‌های القایی تعلیم دهنده باعث تخصصی شدن بافت‌های گوناگون می‌شود؟ به نظر می‌رسد فرضیه دوم در مطالعات

کبد و پانکراس بیشتر تایید شده است.

اندودرم قدامی - شکمی در روز ۸/۵ حاوی پیش‌سازهای دو توانی کبد و پانکراس است و سیگنال‌دهی FGF می‌تواند سرنوشت اندودرمی را که به صورت از پیش تعیین شده پانکراسی است، به سمت سرنوشت کبدی تغییردهد. علاوه بر ارتباط بین کبد و پانکراس، سلول‌های هر ارگان می‌تواند به دیگری متمایز شود. در این اواخر نشان داده شده است که سلول‌های اگزوکرین پانکراسی، پتانسیل هپاتوژنیک دارند. در آزمایشی رده سلول‌های اگزوکرین پانکراس را با دگزامتازون و انکوستاتین M مخلوط کردند و عبور سلول از حالتی که آمیلاز را بیان می‌کند به حالتی که مورفولوژی هپاتوسیت را به دست آورده و ژن‌های آلبومین و گلوکز ۶ فسفاتاز را هم بیان می‌کند، دیده می‌شود (۲).

کبد به عنوان یک ارگان خون‌ساز

کبد موش در روز۱۲ مکان مهم خون‌سازی است و با مهاجرت سلول‌های بنیادی خون‌ساز به این منطقه بیش از ۶۰ درصد از توده کبدی را سلول‌های خونی تشکیل می‌دهد (۳). درآن زمان عملکرد خون‌سازی به خصوص تولید Red Blood Ceells (RBC) مهمتر از عملکرد متابولیکی برای کبد رویان است زیرا اکسیژن و مواد غذایی توسط مادر فراهم می‌شود (۱۴). در دوره Perinatal تعداد زیادی از آنزیم‌های متابولیکی در درون هپاتوسیت‌ها القا می‌شود تا سلول‌های خون‌ساز به جای دیگر مهاجرت کند (۱۶) (شکل ۱۳). با مهاجرت سلول‌های خونی و ترشح هورمون‌ها القای آنزیم‌های متابولیکی در کبد ایجاد شده (۱۳) و بعد از تولد Neonate برای بقا از عملکرد متابولیکی خود استفاده می‌کند (۱۴). جا لب این که در اینجا هم القای دو طرفه وجود دارد. این سلول‌ها، فاکتورهای رشد مورد نیاز کبد را سنتز می‌کنند و احتمالا هپاتوبلاست‌ها درگیر خون‌سازی می‌شوند (۱۴).



شکل ۱۳: مروری بر پروسه تکوین کبد در زمان ورود و خروج سلول‌های خون‌ساز: (۱۸) حروف ایتالیک نشان دهنده ژن‌های دخیل در تکوین کبد است.
HNF3B: Hepatocyte Nuclear Factor 3, AFP: Alpha Feto Protein, ALB: Albumin, TAT: Tyrosin Amino Transferase, Glucose 6 Phosphatase: G6Pase, Tryptophane Deoxygenase: TO, Cytochrome P 450: P450

سلول‌های کبدی در پاسخ به سیگنال‌هایی از مزانشیم مجاور تولید می‌شوند. چندی بعد سلول‌های خون‌ساز از اندام خارج کبدی منطقه Aorta Gonadal Mesoderm (AGM) در کبد رویان تجمع می‌یابند و علاوه بر تولید انواع دودمان سلول خونی با ترشح فاکتورهایی به بلوغ سلول‌های کبدی کمک و در زمان تولد به مغز استخوان یا طحال مهاجرت می‌کنند. در این زمان هپاتوسیت‌ها بالغ‌تر می‌شوند که همراه با فاز نهایی تکثیرشان است (۳).

تولید سلول صفراوی و هپاتوسیت

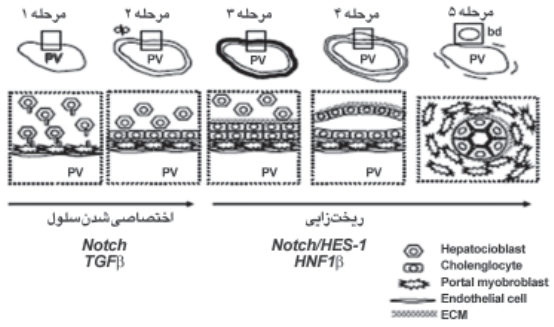
هپاتوبلاست‌هایی که نزدیک انشعاب سیاهرگ پورت هستند به سلول‌های اپی‌تلیال صفراوی اولیه تبدیل می‌شوند و سایر هپاتوبلاست‌ها به هپاتوسیت تمایز می‌یابند (۲) زیرا مزانشیم پورت غنی از ماتریکس خارج سلولی که حاوی لامینین، کلاژن نوع ۴ و فیبرونکتین است بر سرنوشت هپاتوبلاست اثر می‌گذارد (۱۶). تمایز هپاتوبلاست‌ها به سلول‌های صفراوی در حدود روز ۱۳/۵ آغاز می‌شود. هپاتوبلاست‌ها در تماس مستقیم با مزانشیم سیاهرگ پورت شروع به بیان سطح زیادی از سیتوکراتین‌های خاص صفراوی (سیتوکراتین ۷ و ۱۹) می‌کنند (شکل ۱۴). HNF6 روی پروموتور HNF1B می‌نشیند و باعث پیشبرد تمایز اپی‌تلیال صفراوی می‌شود (۱۶).

تمایز نهایی هپاتوبلاست به هپاتوسیت در موش در روز ۱۷ بارداری تحت تاثیر فاکتورها و عوامل خاصی رخ می‌دهد، ایجاد قطبیت در مراحل اولیه تکوین است اما تغییر مورفولوژی به آرامی و با عبور از شکل مربعی در زمان اندودرم به گرد و در نهایت چند وجهی شدن بروز می‌کند (۱۷).

فاکتور های رونویسی موثر در بلوغ هپاتوسیت

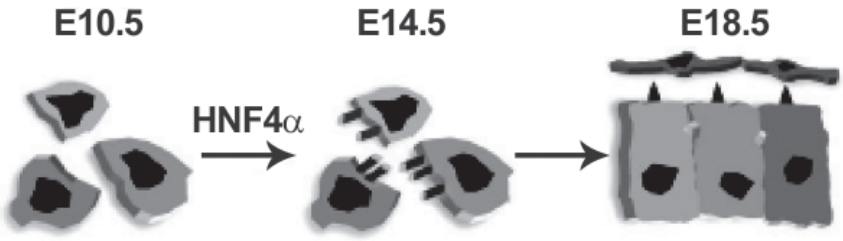
دو فاکتور در بلوغ هپاتوسیت‌ها نقش اساسی دارند که عبارتند از:

۱. فاکتور هسته‌ای هپاتوسیتی HNF4a یا مهم‌ترین تنظیم کننده تمایز هپاتوسیت این فاکتور رونویسی به ۴۰درصد از پروموترهای ژن‌های کبد متصل می‌شود و برای فعال‌سازی اکثر ژن‌های کبدی نیاز است (۱۴). به طوری که تعیین کننده اصلی عملکرد هپاتوسیت بوده و در برقراری ساختار نرمال کبدی در دوران میانی بارداری با تحریک بیان پروتیین‌های اتصال سلولی در هپاتوبلاست و تسهیل شکل‌گیری کانلی کول‌ها و حفظ سینوزوییدهای آن نقش اساسی ایفا می‌کند، همچنین در پیشبرد تغییر شکل هپاتوسیت رویانی نابالغ به هپاتوسیت اپی‌تلیومی قطبی بالغ و حفظ فنوتیپ هپاتوسیت تمایز یافته بسیار موثر است (۱۶) (شکل ۱۵).



شکل۱۴: القای Cholangiocyte و شکل گیری مجاری صفراوی، مرحله ۱:هپاتوبلاست های اطراف سیاهرگ پورت در روز ۱۳ به CholangiOcyte متعهد می‌شوند. مرحله۲: Cholangiocyte در اطراف رگ پورت یک لایه تک سلولی به نام Ductal Plate ایجاد می‌کنند. مرحله۳: دوبل شدن صفحه سلولی. مرحله ۴: ایجاد لومن بین این دو لایه در روز ۱۸. مرحله ۵: سازماندهی لوله‌های مجاری صفراوی.

۲. CCAAT-Enhancer-Binding-Protein (C/EBP) که یکی از فاکتورهای رونویسی مهم در تنظیم بسیاری از ژن‌های کبد رویانی و دیگر اندام‌ها می‌باشد. این فاکتور با تنظیم سیکل سلولی باعث سرکوب تکثیر و پیشبرد تمایز هپاتوسیت می‌شود (۲). HGF با تنظیم بیان C/EBP باعث پیشبرد تمایز هپاتوسیت می‌شود (۲).



شکل ۱۵: تاثیر فاکتور رونویسی HNF4 در ایجاد مورفولوژی اپی‌تلیومی هپاتوسیت

سایر فاکتورهای دخیل در بلوغ و تمایز هپاتوسیت

مزانشیم سپتوم ترانسورسوم و دیگر سلول‌های مزانشیمی فاکتورهای رشد مختلفی برای تکثیر، بلوغ و نیز آپوپتوز هپاتوبلاست‌ها ترشح می‌کنند که در اینجا به مهم‌ترین آنها اشاره می‌کنیم:

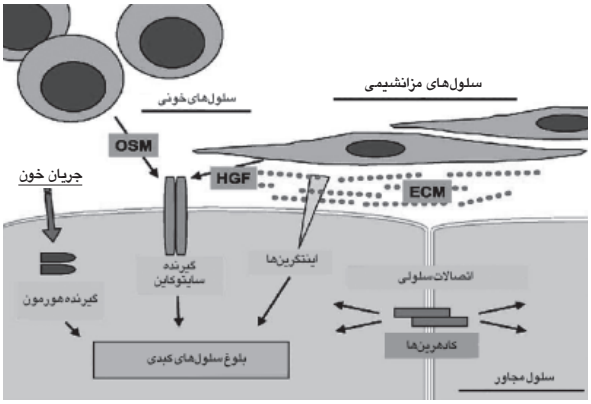
همان طور که در قبل هم گفته شد Hepatocyte Growth Factor (HGF) یا فاکتور رشد هپاتوسیتی که در مزانشیم سپتوم ترانسورسوم و اندوتلیال و نیز خود هپاتوبلاست‌ها بیان می‌شود، برای بلوغ و شکل‌گیری بافت نرمال کبد ضروری است (۱۳). HGF باعث پیشبرد تمایز سلول‌های تولیدکننده آلبومین و بیان C/EBP می‌شود و از تمایز به سلول‌های صفراوی جلوگیری می‌کند (۱۵).

انکوستاتین M (OncostatinM; OSM) که در سلول‌های خون‌ساز بیان می‌شود، القاگر مهمی در تکوین کبد است. OSM باعث تمایز سلول‌های هپاتوسیت نابالغ به هپاتوسیت‌های کارا و بیان ژن‌های بلوغ مثل G6Pase (Glucose 6 Phosphatase), PEPCK (Phosphoenol Pyrovate Kinase), TAT(Trans Amino Transferase), CPS (Carbemyle Phosphate Synthase)

می‌شود (۱۴) و در نتیجه سبب افزایش بیان چندین عملکرد خاص کبدی از جمله پاک‌سازی آمونیاک، سنتز لیپید و گلیکوژن، غیرسمی کردن و افزایش اتصالات سلول می‌گردد و در افزایش بیان فاکتورهای رونویسی مهم کبدی مثل HNF4a و C/EBP هم دخالت دارد (۲). لازم به ذکر است که OSM باعث افزایش اثر گلوکوکورتیکوییدها می‌شود مثل دگزامتازون (Dexamethasone; DEX) که برای بلوغ کبد مورد نیاز است (۱۸).

ماتریکس برون سلولی (Extra Cellular Matrix; ECM) با برهم‌کنش مستقیم با اینتگرین‌ها (Integrins) و فعال‌سازی آبشارهای درون سلولی و با اثر غیرمستقیم با باند شدن و متمرکز کردن مولکول‌های سیگنال دهنده مثل FGF باعث تنظیم تمایز و کنترل رشد و تعیین کننده سرنوشت هپاتوبلاست می‌شود (۱۶) به طوری که پروتیین‌های ساختاری مثل β1-Integrin و سیتوکراتین ۸ هم برای تکوین کبد ضروری است (۳). به نظر می‌رسد که سیگنال‌های فعال شده با HGF, TGFB برای تنظیم بیان اینتگرین بتا ۱ که برای تکثیر هپاتوبلاست‌ها ضروری است هم‌گرا می‌شود (۱۴).

نکته مهم این است که در غیاب حتی یکی از این فاکتورهای ذکر شده در بالا تمایز نهایی صورت نمی‌گیرد (شکل ۱۶). بلوغ نهایی هپاتوسیت‌ها در جوندگان، چند روز پس از تولد رخ می‌دهد که با القای ژن‌های تمایز نهایی مثل (Tryptophan Deoxygenase; TDO) و Cytochorome P450 امکان‌پذیر می‌شود (۱۸).



شکل ۱۶: سیگنال‌های چند گانه برای تمایز نهایی هپاتوبلاست به هپاتوسیت در تکوین کبد

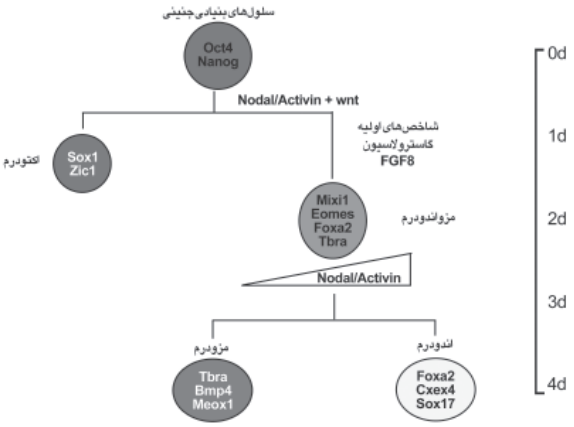
تمایز آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی به سلول‌های کبدی

فاکتورها و محیط‌های موثر در تمایز درون آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی به سلول‌های کبدی

فاکتورها و عوامل گوناگونی هستند که با توجه به عملکردشان در تکوین طبیعی کبد در گزارش‌های مختلف در تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های کبدی مورد استفاده قرار می‌گیرند که شامل فاکتور رشد کبدی (HGF)، فاکتور رشد اپیدرمال (EGF)، فاکتور رشد انتقالی بتا (TGF-β)، فاکتور رشد فیبروبلاستی اسیدی (aFGF/FGF1)، فاکتور رشد شبه انسولین (IGF) و انکوستاتین M (OSM) می‌باشند. این نکته که در چه زمانی و با چه غلظتی می‌بایست از این فاکتورها در فرایند تمایز، استفاده کرد کرد، بسیار حائز اهمیت است. علاوه بر فاکتورهای پروتیینی ذکر شده فاکتورها و عوامل غیرپروتیینی دیگری هم هستند که در تمایز سلول‌های کبدی کاربرد دارند از جمله دگزامتازون (DEX)، رتینوئیک اسید (RA)، بوتیرات سدیم (NaBu)، نیکوتین آمید، نوراپی نفرین و دی متیل سولفوکساید (DMSO). باید به این نکته توجه داشت که ترتیب استفاده از این فاکتورها با توجه به شرایط تکوین طبیعی کبد الگوبرداری می‌شود. فاکتور مهم دیگری که می‌بایست در فرایند تمایز آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی به سلول‌های کبدی مورد توجه قرار گیرد، داربست و یا اسکلت خارج سلولی است که مثلا استفاده از کلاژن و فیبرونکتین تمایز درون آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی به سمت سلول‌های کبدی را بهبود می‌بخشد (۲۲).

تمایز سلول‌های بنیادی به اندودرم قطعی

اندودرم قطعی که یکی از سه لایه مهم جنینی می‌باشد در طی گاسترولاسیون ایجاد شده و به سلول‌های اپی‌تلیال لوله گوارشی، تنفسی، تیروئید، کبد و پانکراس تبدیل می‌شود (۲۳). تولید سلول‌های بافت‌های مشتق از اندودرم قطعی مثل کبد و پانکراس از سلول‌های بنیادی جنین در محیط آزمایشگاه یکی از موارد مورد علاقه محققین می‌باشد. اگرچه تاکنون موفقیت‌های محدودی در زمینه تولید سلول‌های پانکراس و کبد از سلول‌های بنیادی جنینی در دنیا جهت کاربردهای کلینیک و درمانی صورت گرفته است (۲۴، ۲۵) اما قدم مهم و اول در این راه، تولید اندودرم قطعی از سلول‌های بنیادی جنینی می‌باشد (شکل ۱۷) (۴).



شکل ۱۷: تمایز درون آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی جنینی به اندودرم به همراه نشانگرهای آن

طبق گزارش‌های ارایه شده، رده‌های سلولی بنیادی جنینی دارای پتانسیل‌ها و توان‌های تمایزی متفاوتی می‌باشند (۲۸-۲۶). بنابراین ایجاد روش کاری که بتوان با استفاده از آن از رده‌های سلولی مختلف به یک نتیجه یکسان در تولید اندودرم قطعی رسید بسیار دارای اهمیت است. تا کنون بیشتر مطالعات با توجه به الگوبرداری از تکوین دوران جنینی استفاده از اجسام شبه جنینی را برای تولید سلول‌های کارا مثل اندودرم مد نظر داشته‌اند (۲۹)، اما حدود ۳ سال قبل دانشمندی به نام دی‌آمور توانست با استفاده از کشت تک بعدی این سلول‌ها در محیط آزمایشگاه با استفاده از فاکتورهای رشد مثل اکتیوین اندودرم قطعی را از سلول‌های بنیادی جنینی ایجاد نماید (۲۷). اکتیوین نوترکیب در حقیقت با تقلید از مولکول نودال در مسیر تکاملی کبد در موش که خانواده TGF را فعال می‌کند، مورد بهره‌برداری قرار گرفته است (۷، ۳۰). مطالعه جالبی توسط آماندا و همکاران صورت پذیرفت نشان داد که مولکول اکتیوین A تنها زمانی در تمایز سلول‌های بنیادی به اندودرم کارا می‌باشد که مسیر پیام رسانی فسفاتیدیل اینوزیتول ۳-کیناز مهار شده باشد. در هر حال تشکیل اندودرم قطعی در محیط آزمایشگاه با استفاده از هر دو روش کشت سلول‌های بنیادی جنینی (کشت تک بعدی و یا تشکیل اجسام جنینی) قابل انجام است. لازم به ذکر است که یکی از شاخص‌های مهم در تشکیل اندودرم قطعی که می‌بایست در آزمایشگاه مد نظر قرار بگیرد، بیان مولکول Sox17 می‌باشد (۳۱). طی مطالعه جالبی که توسط پاراشوراما و همکاران به چاپ رسید، نشان داده شد که سلول‌های بنیادی جنینی موشی که با اکتیوین A تیمار شده‌اند ۸۰ درصد کاهش بیان Foxa2 داشتند در حالی که گروهی که با فولیستاتین تیمار شده بودند به میزان ۷۸درصد در سلول‌ها بیان Foxa2 دیده شد. آنها پیشنهاد کردند سلول‌هایی که با اکتیوین تیمار شده‌اند در مقایسه با سلول‌هایی که با فولیستاتین تیمار شده بودند در مراحل ابتدایی‌تر تکوین یعنی مزواندودرمی و اپی‌بلاستی باقی می‌مانند و پیوند آنها به موش سینژنیک سبب ایجاد تراتوم می‌شود در حالی که سلول‌های تیمار شده با فولیستاتین نسبت به ایجاد رده اندودرمی متعهدتر شده‌اند (۳۲). با توجه به الگوی طبیعی تکوین کبد، گذر از مرحله اندودرم قطعی یکی از مراحل مهم تکوین بافت کبد و سلول‌های کبدی است که این امر نیز مورد توجه پژوهشگران می‌باشد تا با ایجاد سلول‌های اندودرم قطعی در محیط آزمایشگاه بتوان تمایز به سمت سلول‌های واقعی کبدی را بهتر هدایت نمود. در دو مطالعه جالبی که در ژورنال Cell به چاپ رسیده است، محققان توانسته‌اند با تکنیک‌های دست‌کاری ژنتیکی لاین‌های اندودرمی را در محیط آزمایشگاه ایجاد نمایند که این امر قدم مهم و بزرگی را در بهبود تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های کبدی در شرایط آزمایشگاهی فراهم ساخته است (۳۳، ۳۴).

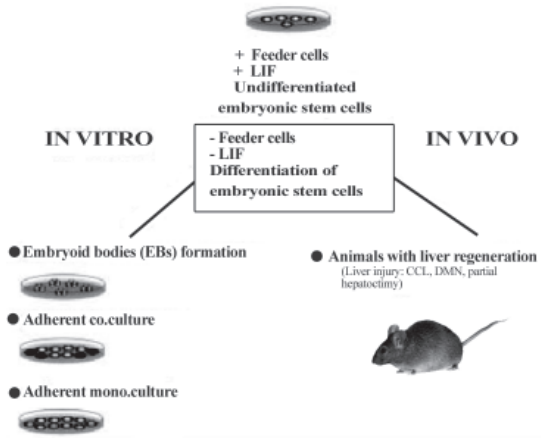
یکی از سؤالاتی که همواره در تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های اندودرمی مطرح بوده است، تمایز واقعی این سلول‌ها به سمت اندودرم حقیقی است، زیرا این سلول‌ها در حین تمایز به رده اندودرمی به سلول‌های اندودرم احشایی تمایز خواهند یافت و به دلیل نبود نشانگرهای سطحی مناسب جهت بررسی و تفکیک این دو اندودرم از هم، در اکثر موارد تیمار با اکتیوین منجر به ایجاد یک جمعیت هتروژن از سلول‌های اندودرم احشایی و حقیقی خواهد بود. طی مطالعه جالب یاسوناگا و همکاران با استفاده از سازه‌های ژنتیکی حاوی پروتیین GFP و گیرنده IL-2 تحت پروموتورهای Sox17 و Goosecoid توانستند جمعیت‌های $Sox17^{+}Gsc^{+}$ را به عنوان سلول‌های اندودرم حقیقی در برابر جمعیت‌های *Gsc- Sox17+* به عنوان سلول‌های اندودرم احشایی جدا نمایند تا به این ترتیب شرایط کشت و فاکتورهای نیاز در محیط کشت را جهت رسیدن به این سلول‌ها ردیابی کنند و تفاوت بیان نشانگرهای سطحی این دو رده سلولی را در موش نشان دهند که کار را جهت مطالعات بعدی آسان‌تر نموده است (۳۵).

هپاتوسیت‌ها از سلول‌های اصلی تشکیل دهنده کبد می‌باشند که عملکردهای متنوعی را از قبیل متابولیسم، سم‌زدایی و ذخیره گلیکوژن بر عهده دارند. بیماران مبتلا به نقص کبد و یا آنهایی که به مراحل انتهایی بیماری رسیده‌اند، نیازمند پیوند ارگان کبد و یا هپاتوسیت‌ها می‌باشند (۳۶). پیوند هپاتوسیت‌ها در این گونه موارد بسیار کارا می‌باشد اما دانشمندان همواره با محدودیت هپاتوسیت‌ها مواجه بوده‌اند. به نظر می‌رسد که سلول‌های بنیادی جنینی منبع بسیار خوبی جهت تولید هپاتوسیت‌ها به منظور پیوند هستند. تکثیر زیاد سلول‌های بنیادی جنینی در محیط آزمایشگاه آنها را به عنوان یک منبع در اختیار معرفی کرده است. از یک سو با تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های کبدی را می‌توان هرچه بهتر تکوین سلول‌های کبدی در شرایط طبیعی و فیزیولوژیک شناخت که این امر به شناخت بهتر کبد و درمان بیماری‌های آن کمک می‌کند.

تمایز درون آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های کبدی

سلول‌های بنیادی جنینی (Embryonic Stem Cell; ESC) برای اولین بار در سال ۱۹۸۱ از جنین موش جدا گردید (۳۷). این سلول‌ها *In vitro* توان که از توده داخل سلولی *In vivo* سیست جدا می‌شوند، توانایی تمایز به سلول‌های هر سه لایه جنینی را دارا می‌باشند. جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی جنینی انسانی در سال‌های بعد این امید را ایجاد کرد که بتوان از این سلول‌ها در درمان بیماری‌ها و فهم بهتر دانش تکوینی استفاده کرد (۳۸).

پتانسیل بالای سلول‌های بنیادی جنینی موشی در شرایط آزمایشگاهی و موجود زنده به اثبات رسیده است به طوری که پیوند این سلول‌ها سبب ایجاد تراتوما می‌شود که حاوی سلول‌های هر سه لایه جنینی است. جدا کردن این سلول‌ها از لایه تغذیه کننده و یا حذف فاکتور ممانعت کننده لوکمیا از محیط کشت سبب می‌شود تا این سلول‌ها با یکدیگر تجمع پیدا کرده و اجسام شبه جنینی را ایجاد نمایند. سلول‌های موجود در اجسام شبه جنینی به طور خود به خود تمایز پیدا کرده و شاخص‌های مولکولی هر سه لایه جنینی را ایجاد می‌کنند (۱). در این مقاله مثال‌هایی از تمایز درون آزمایشگاهی و موجود زنده سلول‌های بنیادی جنینی موشی و انسانی ارایه می‌دهیم (۲۵، ۳۹). مطالعات در شرایط آزمایشگاهی را می‌توان به سه دسته تقسیم‌بندی کرد: مطالعاتی که تمایز را با استفاده از تشکیل اجسام شبه جنینی پیش برده‌اند و از کشت هم‌زمان استفاده کرده‌اند، مطالعاتی که از کشت‌های تک لایه سلول‌های بنیادی جنینی در فرایند تمایز سود برده‌اند و مطالعاتی که در موجود زنده از مدل‌های حیوانی بهره برده‌اند (شکل ۱۸) (۱).



شکل ۱۸: انواع راه‌هایی که در مطالعات مختلف در تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به کار رفته‌اند

سلول‌های بنیادی جنینی موشی

استراتژی‌های تمایز به هپاتوسیت در شرایط آزمایشگاهی شامل ایجاد اجسام شبه جنینی (Embryoid Body; EB)، هم‌کشتی وسیستم کشت تک لایه است. مطالعات موجود زنده با استفاده از مدل‌های حیوانی که دچار آسیب کبدی هستند صورت می‌گیرد.

ایجاد اجسام شبه جنینی (EB)

در محیط آزمایشگاه بعد از برداشت لایه سلول‌های تغذیه کننده و یا حذف Leukemi Inhibitory Factor (LIF) سلول بنیادی جنینی موشی در محیط سوسپانسیون تجمع می‌یابند؛ تجمعات کروی سلولی به نام اجسام شبه جنینی و یا EB تولید می‌کنند. سلول‌های درون EB به طور خود به خود تمایز می‌یابند و شاخص‌های مولکولی خاص هر سه لایه را بیان می‌کنند و با جداسازی سلول‌های EB، کشت آنها به صورت تک لایه قادر به ایجاد دودمان‌های بسیاری است. فاکتورهای رشد و پروتیین‌های زیادی بر تولید و بقای این سلول‌ها اثر دارند که برای پیش‌برد به سمت دودمان کبدی عمدتا از کلاژن استفاده می‌شود. لازم به ذکر است که سطح پروتیین‌هایی مثل CYP7a1، (TyrosinAminoTransferase; TAT) و (Gossecoid; GSC) در EBهایی که به طریق سوسپانسیون به دست آمده است کمتر از کشت‌هایی است که به صورت تک لایه انجام شده‌اند (۴۰).

اگر EBهای تولید شده در پلیت‌های پوشیده شده با ژلاتین، بدون هیچ فاکتور رشدی کشت داده شوند، در روز ۱۴در کنار EBهای ضربان‌دار سلول‌هایی تولید خواهند شد که توانایی جذب رنگ آنیونی (Indocyanin Green; ICG) را که شاخص سلول‌های کبدی می‌باشد، نشان خواهند داد. سلول‌هایی که توانایی جذب ICG را دارا می‌باشند، بیان ژنی و ظاهری شبیه هپاتوسیت بالغ را که شامل دو هسته‌ای بودن، میتوکندری و لیزوزوم و دستگاه گلژی پیشرفته و شبکه آندوپلاسمی صاف و خشن و ارتباطات بین سلولی خاص سلول‌های کبدی یعنی کانالیکول است، نشان می‌دهند و بعد از پیوند سلول‌های ۲۱روزه، می‌توانند با سلول‌های کبدی میزبان ادغام شوند این مطالعه نشان می‌دهد که تشکیل اجسام شبه جنینی می‌تواند ریزمحیطی مناسب برای ایجاد سلول‌های کبدی باشد (۴۱).

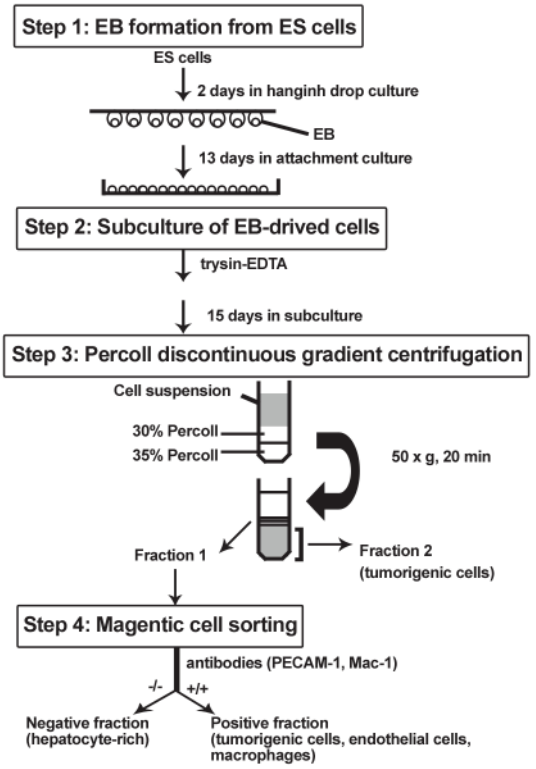
اگرچه ژن‌های کبدی در اجسام شبه جنینی قابل ردیابی است اما باید توجه داشت که تمایز اندودرم احشایی نیز در EB صورت می‌گیرد. اندودرم احشایی کیسه زرده از نظر مورفولوژی و فیزیولوژی و بیان تعدادی از ژن‌های حمل و نقل پروتیین (TTR، ALB)، ژن‌های دخیل در متابولیسم دارو، سنتز اوره (Carbamoyl Phosphate Synthetase; CPS)، متابولیسم اسید آمینه، سنتز اسید صفراوی و فاکتورهای رونویسی شبه هپاتوسیت می‌باشد. اما ژن *CYP7A1* فقط در سلول‌های کبدی بیان می‌شود و اندودرم احشایی کیسه زرده این مولکول را بروز نمی‌دهد. CYP7A1 باعث تبدیل کلسترول به اسید صفراوی می‌شود و در کبد رویانی و هپاتوسیت‌های اطراف پورت در فرد بالغ بیان می‌شود (۴۰).

در EB نه روزه پس از حذف LIF بدون اضافه کردن هیچ فاکتور رشدی، AFP و سه روز بعد از آن ALB بیان می‌شود و اضافه کردن فاکتور رشد تغییری در بیان ALB ایجاد نمی‌کند (۴۲). اما هو و همکاران مشاهده کردند که اگرچه EB می‌تواند به طور خود به خود به سلول‌های کبدی تبدیل شود اما اضافه کردن فاکتور رشد سبب بیان سریع‌تر نشانگرهای کبدی شده و در ضمن میزان تمایز را هم افزایش می‌دهد (۴۳).

درصد سلول‌های تمایز یافته به سلول‌های کبدی در اجسام شبه جنینی با استفاده از تکنیک‌های ایمونوفلورسانس و فلوسایتومتری و بر اساس بیان AFP، ALB قابل محاسبه است. میزان سلول‌های تمایز یافته در روز ۱۳، ۵/۵ درصد و در روز ۲۱ به ۱۰/۴درصد می‌رسد که درصدی پایین اما قابل توجه است. با اضافه کردن فاکتورهای

رشد مناسب، درصد سلول‌های تمایز یافته به ۳۳ درصد می رسد اما همچنان میزان سلول‌های کبدی کمتر از آن چیزی است که بتوان از آنها در حیطه درمان و پیوند استفاده کرد. وقتی اجسام شبه جنینی را از حالت کشت سوسپانسیون خارج کرده و به ظروف کشت منتقل کنیم، سلول‌های اندودرمی در بیرون EB قرار می‌گیرند و سلول‌های مرکزی بنیادی باقی می‌مانند و به سلول‌های هر سه لایه جنینی از جمله سلول‌های کبدی متمایز می‌شوند. اگر بعد از انتقال EBها به ظروف کشت، حاشیه خارجی و یک چهارم درونی را در روز ۱۷ جدا کرده، سلول‌های باقی مانده را مجددا در حضور فاکتورهای رشد قرار دهیم، در روز ۲۱، ۷۳ درصد سلول کبدی خواهیم داشت (۴۳). چینزی و همکاران بروز آلبومین را در EB نه روزه گزارش کردند. علاوه بر اینکه آنها نشان دادند سلول‌های نه روزه توانایی سنتز اوره را نیز دارا می‌باشند. جالب اینکه در مقایسه با کبد بزرگسال میزان تولید آلبومین ۴۰ برابر کمتر دیده شده است (۴۲).

اگر EBنه روزه به طحال موشی که یک سوم کبد آن هپاتکتومی شده است و جهت جلوگیری و مهار تکثیر سلول‌های کبدی سم (Acetyl Amino Floren; AAF) را دریافت کرده، پیوند زده شود بعد از چهار هفته سلول‌های تولید کننده آلبومین در کبد میزبان تولید می‌شود که ۰/۲درصد از کل توده کبد میزبان را تشکیل می‌دهد، در ضمن تومور هم ایجاد نمی‌شود اما در پیوند سلول بنیادی یا EB شش روزه تومور ایجاد خواهد شد. تک سلول کردن EB دوازده روزه یا بیشتر، از لحاظ تکنیکی کمی مشکل است (۴۲)، اگرEB پانزده روزه را به صورت تک سلول و گروه سلولی به طور مستقیم زیر کپسول کبد تزریق کنیم، بر خلاف زمانی که به صورت منفرد به طحا ل تزریق می‌شود، سبب ایجاد تومور خواهد شد. این امر نشان دهنده حضور سلول‌های تمایز نیافته در درون اجسام شبه جنینی است که توانایی تکثیر خود را حفظ کرده و ایجاد تومور می‌نمایند. بنابراین حذف این سلول‌های نامتمایز از جمعیت سلولی حاصل می‌بایست مد نظر قرار گیرد تا بتوان از EBها به عنوان منبعی برای پیوند استفاده کرد (۴۴). یکی از راه‌های حذف این سلول‌ها قرار دادن EBهای تولید شده در شیب Percoll و سانتریفیوژ آنها می‌باشد (شکل ۱۹)، Fraction2 شامل سلول‌های بیان کننده Oct4 یا همان سلول‌های نا متمایز است. اگرچه در Fraction1 تعداد کمی آلودگی با سلول‌های بیان کننده Oct4 وجود دارد اما به دلیل میزان پایین توانایی ایجاد تومور را در فرد گیرنده نخواهند داشت. در مرحله بعد می‌توان Fraction1 را با استفاده از سیستم ایمونومگنتیک (Magnetic Activating Cell Sorter; MACS) برای نشانگر PE-CAM غنی‌سازی نمود که سلول‌های مثبت تومورزا، اندوتلیال و ماکروفاژ و سلول‌های منفی غنی از هپاتوسیت می‌باشند (۴۴). از آنجا که در حضور فاکتورهای رشد میزان تمایز به هپاتوسیت بیشتر می‌شود، یافتن فاکتورهای رشدی که بتوان با استفاده از آنها تمایز هپاتوسیت از EB را بهبود بخشید بسیار دارای اهمیت است. در حضور HGF یا NGF و یا هر دو، تغییرات مورفولوژی و بیان ژنی بیشتر شبیه هپاتوسیت بالغ است. پس NGF، HGF در القای سلول بنیادی به اندودرم مفید هستند اگر چه سلول‌ها در این بستر هموژن نیستند (۴۵).



شکل ۱۹: مراحل جداسازی سلول‌های تومورژنیک از سلول‌های تمایز یافته

بعد از کشت سلول‌های بنیادی جنینی به صورت اجسام شبه جنینی و طی کردن مراحل تمایز این سلول ها بعد از پلیت کردن آنها، در مرحله آخر سلول‌ها را بعد از جدا کردن از ظروف کشت به روی شیب پرکول انتقال داده و با سانتریفیوژ آن، بخشی که حاوی سلول‌های تومورژنیک است از بخشی که حاوی سلول‌های مورد نظر ما می‌باشد جدا می گردد.

در ادامه کشف فاکتورهای رشد مناسب، EBها را در محیط کلاژن حاوی aFGF بعد HGF و به دنبال آن ITS، DEX، OSM قرار دادند. کلاژن در محیطی که فاکتور رشد قرار دارد باعث ۹/۵ برابر شدن بیان آلبومین در مقایسه با شرایط عدم حضور کلاژن و عدم فاکتور رشد می‌شود. ترکیب ITS، DEX، OSM، HGF باعث بیان G6Pase و TAT در مرحله نهایی می‌شود. سلول بنیادی به صورت خود به خود به دودمان کبد یا کیسه زرده متمایز می‌شود ولی در عدم حضور فاکتور رشد یا بستر پروتیینی به هپاتوسیت بالغ تبدیل نمی‌شود و TAT، G6Pase که از نشانگرهای هپاتوسیت بالغ هستند، حتی تا روز ۱۸ نیز دیده نمی‌شوند (۴۶). این بار بر بستر ماتریژل، با انجام روش کاری مشابه پنج روز بعد سلول‌های بیضی شکل کوچکی به صورت کلاسترهایی در اندازه‌های مختلف در محیط کشت دیده می‌شوند. با گذشت زمان، اندازه و تعداد سلول‌های کلاستر بیشتر و سیتوپلاسم آنها گرانولی می‌شود تا حدودی سلول‌های دو هسته‌ای دیده می‌شود و تا ۸۰ درصد هموژن می‌شوند که این سلول‌ها را می‌توان تا ۴۵ روز در بستر مناسب هپاتوسیت نگهداری کرد (۴۷).

از آنجا که BMPها و FGFها در تکوین، باعث تخصصی شدن کبد از اندودرم می‌شوند برای اولین بار اثر BMP را به همراه

aFGF و bFGF بررسی کردند. در این مطالعه مشابه با مسیر سیگنالی تکوین کبد پستانداران، یک روش کار سه مرحله‌ای طراحی شد:

مرحله اول ایجاد EB که محیط مناسب تکوین اندودرم را فراهم می‌کند، در مرحله دوم فاکتورهای bFGF، aFGF و BMP4 برای تولید هپاتوسیت اولیه و در مرحله آخر برای بلوغ فاکتورهای HGF, OSM, DEX, ITS اضافه می‌شود. پیش از این بر این اعتقاد بودند که FGF برای تکوین هپاتوسیت ضروری است و این اولین گزارشی بود که نشان داد در حضور BMP4 نشانگرهای کبدی بیان بیشتری خواهند داشت. در حضور BMP میزان جذب رنگ ICG از ۲۰درصد به ۴۵درصد، بیان آلبومین از ۳۰درصد به ۷۲درصد و میزان رنگ‌آمیزی PAS از ۳۵درصد به ۶۰درصد رسید. BMP4 به همراه aFGF و bFGF فقط در تمایز کبدی شرکت نمی‌کند بلکه بازدهی تمایز را نیز افزایش می‌دهد. دیگر آنکه BMP4 به همراه FGF باعث مهار ژن‌های پانکراسی می‌شود. در ضمن این دو مولکول نقش مشابهی در پیشبرد تمایز هپاتوسیت دارند و هر دو از یک گیرنده استفاده می‌کنند و برای نشستن روی گیرنده با هم رقابت می‌کنند (۴۸).

برای دستیابی به سیستمی موثر برای تمایز، تولید و گسترش سلول جدی کبد و در نهایت جداسازی و پیوند به کبد آسیب دیده، سلول بنیادی جنینی را که حاوی GFP تحت پروموتور آلبومین است در بستر عاری از سرم و فاکتور رشد قرار می‌دهند. اولین سلول GFP مثبت در روز هفتم در کنار سلول‌های ضربان دار مشاهده شد، تعداد سلول‌های GFP مثبت تا روز بیست و هشتم زیاد شده (۳۰درصد) و مورفولوژی و نشانگرهای خاص کبدی را بیان کردند. در این زمان آنها را به وسیله FACS جدا کرده و به طحال موشی که ۸۲ روز تحت استنشاق CCL4 بوده است تزریق کردند. بعد از پیوند، سلول‌های GFP مثبت باعث تولید هپاتوسیت‌های کارا و ادغام شدن با پارانشیم کبد میزبان بدون ایجاد تومور گردید. پنج روز بعد از پیوند از GFP مثبت جمعیت‌های کوچک دو – سه سلولی، در روز ۳۲ جمعیت‌های ۴۰-۳۰ سلولی و در روز ۸۲ جمعیت‌های ۴۰۰-۱۰۰ سلولی مشاهده شد. اگر دو ساعت قبل از پیوندBrdu به صفاق موجود تزریق شود می‌توان سلول‌های پیوندی در حال تکثیر را مشاهده کرد. از آنجا که هم‌گرایی سیگنال‌های مختلف از سلول‌های همسایه برای حمایت هپاتوژنز سلول بنیادی و بقای پیش‌ساز اولیه هپاتوسیت کافی بوده و در بستر غنی از سرم رشد سلول‌های شبه هپاتوسیتی توسط دیگر سلول‌ها سرکوب می‌شود، از بستر فاقد فاکتور رشد و سرم استفاده شده است (۴۹).

در موجود زنده و در طی تکوین طبیعی، جد کبدی به ترتیب این شاخص‌ها را بیان می‌نماید:

ALB+/AFP+/CK19- – ALB+/AFP+/CK19+ – ALB-/AFP-/CK19+

اما در شرایط آزمایشگاه یک جد جدید ایجاد شده که رشته حد واسط متفاوتی را بیان می‌کند و ALB-/AFP-/nestin+ است و احتمالا این جد به گروه دوم تعلق دارد. Nestin به طور گذرا در طی تمایز کبد در مرحله میانی تکوین بیان می‌شود و هرگز در مرحله نهایی دیده نشده است. در شرایط آزمایشگاه بیان Nestin یک جد چند دودمانی با پلاستیسیته بالای تکوینی را نشان می‌دهد در صورتی که در موجود زنده بیان نستین در سلول‌های اوال و در منطقه اطراف پورت دیده شده است. همچنین در شرایط ترمیم و در پاسخ به آسیب در سلول‌های Stellate بیان می‌شود (۵۰).

در مطالعه‌ای سلول‌های پیش‌ساز که از نظر بیان نشانگر AFP مثبت بوده‌اند، خالص‌سازی شده و به موش‌های نقص تولید Haptoglobin و ApoE تزریق شدند که در نهایت به سلول‌های تولید کننده Haptoglobin و ApoE تبدیل شدند (۵۱) .

حسن ایجاد EB در این است که ساختاری سه بعدی شبیه شرایط موجود زنده فراهم می‌کند و باعث افزایش بر هم‌کنش سلول‌ها با یکدیگر می‌شود که این امر برای تکوین کبد مهم است. اما پیچیدگی درون EB خود یکی از مشکلات است زیرا سیتوکین‌ها و فاکتورهای القایی تولید شده در این ساختار، باعث القای تمایز به دیگر دودمان‌ها نیز می‌شود و تا به حال هیچ کدام از تمایز های کبدی، بر اساس EB القایی موثر و کارا نبوده است. از آنجا که حداقل بعضی از سلول‌های EB تمایز یافته نیستند برای پیوند نیز مناسب نمی‌باشند (۱).

سیستم هم‌کشتی

تماس سلول با سلول برای القای تمایز سلول بنیادی به هپاتوسیت مهم است. زیرا سلول‌های مجاور، فاکتورهایی را فراهم می‌کنند که برای تمایز سلول بنیادی ضروری است. تاکنون تعداد محدودی از آنها شناخته شده است (۵۲). ارزش سیستم هم‌کشتی به علت تقلید بیشتر تکوین در موجود زنده است. در موجود زنده بر هم‌کنش سلول با سلول بین مزودرم قلب جنین با اندودرم قلبی برای تکوین کبد ضروری است. در شرایط آزمایشگاه این ارتباط مهم تکوینی را در نظر نمی‌گیرند در حالی که بسیاری از تنظیمات رونویسی مهم از این بر هم‌کنش ها ناشی می‌شود. اولین گزارش تماس سلول با سلول در پیش‌برد تمایز هپاتوسیت در هم‌کشتی سلول بنیادی جنینی موشی با سلول قلب جنین جوجه بوده است. در محیط کشت هر دو نوع سلول به سمت هم مهاجرت و با هم ارتباط برقرار می‌کنند. سلول قلبی میل زیادی به سلول بنیادی دارد و ساختارهای دندریتی را به سمت آن می‌گستراند.

بافت قلبی در روز اول باعث فعال کردن فاکتور های رونویسی مهم مثل Foxa2، Sox17 و GATA4 می‌شود که برای تکوین هپاتوسیت ضروری هستند. و در روز دوم باعث بیان AFP و در روز چهارم باعث بیان ALB می‌شود. سلول بنیادی در این سیستم از لحاظ ریخت‌شناسی بزرگ‌ترشده، گرانولوسیته آن افزایش می‌یابد و پلی‌پلوئید می‌شود. علاوه بر اینکه از لحاظ بیان ژنی شبیه اندودرم صلاحیت دار و یا هپاتوسیت اولیه می‌شود.

بافت قلب جوجه کاندید مناسب در این‌گونه تحقیقات است؛ اول اینکه جوجه از نظر تکوینی، مشابه پستانداران است و FGF مترشحه از قلب جوجه باعث القای کبد از سلول موشی می‌شود، دوم اینکه بافت قلبی جوجه بزرگ‌تر از موش است و جداسازی آن راحت‌تر صورت می‌گیرد و سوم اینکه پرایمر آن متفاوت از سلول موشی است (۵۳).

اگر سلول بنیادی جنینی با سلول کبدی و بدون فاکتور رشد هم کشت شود، بعد از ۴۸ ساعت در گروه شاهد که تمایز خود به خود است سلول‌ها فیبروبلاستی و هتروژن می‌شوند ولی در گروه هم کشت مورفولوژی و بیان ژن سلول بنیادی شبیه سلول کبد رویانی می‌شود. بعد از پیوند به کبد سالم به طور نرمال با پارانشیم کبد میزبان ادغام شده و بعد از دو هفته آلبومین را تولید می‌کند. در این مطالعه به دو دلیل سلول‌ها را به کبد سالم پیوند زدند: اول اینکه هپاتکتومی باعث ایجاد تومور می‌شود و دیگر اینکه در بعضی بیماری‌های ژنتیکی ساختار کبد تغییری نمی‌کند (۵۲).

فاکتورهای انتشار پذیر از سلول‌های کبد رویان برای تحریک القای تمایز سلول بنیادی کافی است. اگرچه بلوغ کامل به دست نمی‌آید و

AFP در کل دوره بیان می‌شود. البته لازم به ذکر است که سلول‌های کبد رویان باعث پیش‌برد تمایز به سمت سلول‌های خون‌ساز هم می‌شود اما این سلول‌ها به کف ظرف نمی‌چسبند و با تعویض محیط حذف می‌شوند. حضور سلول‌های غیر پارانشیمی هم برای تمایز سلول‌های اندودرمی کبدی و هپاتوبلاست‌ها به سلول‌های بالغ نیاز است. در موجود زنده در طی تکوین سلول ستاره‌ای فاکتور رشد هپاتوسیتی را ترشح می‌کند، سلول اپی‌تلیوم صفراوی TNF6، IL6 را ترشح و سلول اندوتلیال FGF4، VEGF را تولید می‌کنند.

براین اساس یک دستورالعمل چهار مرحله‌ای طراحی شد:

۱. تولید EB

۲. القای اندودرم قطعی در EB دو روزه در حضور اکتیوین و FGF2 (اکتیوین برای شروع تمایز کبدی نیاز است.)

۳. القای پیش‌ساز کبدی با هم‌کشتی EB و سلول‌های غیرپارانشیمی انسان شامل سلول اندوتلیال، ستاره‌ای و ماکروفاژ و فاکتورHGF.

۴. القا بلوغ هپاتوسیتی با استفاده از فاکتورهای DMSO، DEX که با این روش کار ۷۰درصد سلول‌های هپاتوسیت کارا به دست آمد (۵۴).

سلول‌های Thy1 مثبت، سلول‌هایی با منشا مزانشیمی مستقر در کبد رویان هستند که از طریق تماس مستقیم سلول با سلول باعث پیش‌برد بلوغ جد کبدی می‌شود و برای نشانگرهای سلول‌های کوپفر و اندوتلیال منفی هستند. سلول بنیادی جنینی را که حاوی GFP تحت پروموتور آلبومین است برای القای اندودرم تا هفت روز در شرایط عدم سرم و عدم لایه تغذیه کننده کشت دادند. سلول‌های GFP مثبت مورفولوژی چند وجهی پیدا کردند. این سلول‌ها با روش FACS جدا شده، بر روی سلول‌های Thy1 مثبت به عنوان لایه تغذیه کننده، کشت داده شدند.سلول‌های GFP مثبت به تنهایی حتی تا یک ماه هم نشانگرهای بلوغ کبدی را بیان نمی‌کنند. سلول‌های PAS مثبت فقط در حالت هم کشتی دیده می‌شود و جالب اینکه به تنهایی میزان برداشت آمونیاک محیط در هم‌کشتی دو برابر سلول‌های GFP مثبت است. در هم‌کشتی فراساختار هپاتوسیت بالغ بهتر دیده می‌شود که شامل میتوکندری توسعه یافته شبکه آندوپلاسمی خشن، گرانول و پراکسیزوم زیاد، کانالیکول و سلول دو هسته‌ای فراوان می‌باشد در حالی که سلول‌های GFP مثبت هسته بزرگ و ارگانل درون سیتوپلاسمی کمی دارند. اگر سلول‌های Thy1 مثبت با سلول‌های بنیادی نامتمایز هم کشت داده شود ژن‌های تاخیری کبدی بیان نمی‌شود زیرا سلول‌های Thy1 مثبت از طریق گیرنده‌های سطحی باعث انتقال سیگنال به سلول اندودرمی نابالغ مشتق از سلول‌های بنیادی و بلوغ آن می‌شوند و قادر به تخصصی شدن و بلوغ کبد از سلول بنیادی نا متمایز نمی‌باشند (۵۵).

در سیستم هم‌کشتی تمایز در تماس با سلول‌های مجاور و فاکتورهای تمایزی آنها صورت می‌گیرد. اگرچه ممکن است فاکتورهای نامشخص تولید شده توسط این سلول‌ها بر تمایز سلول‌های بنیادی به دیگر سلول‌ها به جز هپاتوسیت هم اثر بگذارد و دیگر اینکه مشکل این سیستم جداسازی سلول‌های هم‌کشت از یکدیگر است (۱).

تمایز جهت‌دار سلول‌های بنیادی جنینی موشی به سلول‌های کبدی

سلول بنیادی جنینی را می‌توان بدون نیاز به ایجاد EB یا هم‌کشتی، به طور مستقیم یا جهت دار به هپاتوسیت کارا تبدیل کرد (۵۶) با این استراتژی می‌توان سلول مورد نظر را به صورت یکنواخت و هموژن تولید کرد (۵۷). به همین منظور محققین به دنبال فاکتورهای رشدی هستند که بتوان با استفاده از آنها در شرایط آزمایشگاه و به طور مستقیم از سلول بنیادی سلول‌های کبدی را تولید کرد.

در مطالعه‌ای سلول بنیادی جنینی موش را به کبد سالم و آسیب دیده تحت سم CCl4 پیوند زدند. در کبد سالم تغییری مشاهده نشد یعنی هیچ کدام از سلول‌ها جایگزین نشدند. اما در کبد آسیب دیده توموری ایجاد شد که حاوی سلول‌های کبدی هم بود یعنی کبد آسیب دیده تمایز سلول بنیادی جنینی را به سمت هپاتوسیت حمایت می‌کند و فاکتورهای تنظیم کننده کلیدی را برای جایگزینی سلول بنیادی جنینی فراهم کرده است. فاکتورهای رشدی که در این امر دخیل بودند و در کبد آسیب دیده با CCl4 وجود داشتند شامل انواع فاکتورها از قبیل

FGF, HGF, Nerve Growth Factor (NGF), Insulin Growth Factor (IGF), TGF

بودند که برای تمایز سلول بنیادی جنینی به هپاتوسیت استفاده شد. از میان آنها سه فاکتور HGF، FGF4، FGF1 باعث افزایش تولید هپاتوسیت می‌شوند. سپس با طراحی آزمایش‌های دیگر ترکیب انواع فاکتورها امتحان شد و گروه HGF+FGF4+FGF1 درصد تولید هپاتوسیت بیشتری را نشان داد. آزمایش‌های تکمیلی جهت یافتن بستر مناسب کلاژن نوع یک به عنوان سوبسترایی مناسب برای القا و بلوغ هپاتوسیت انتخاب شد. بر اساس این یافته‌ها روش کار چهار مرحله‌ای جهت تمایز جهت‌دار سلول‌های بنیادی جنینی طراحی گردید: در مرحله اول القای اندودرم تحت تیمار Lif+RA (RA) باعث القای جد مزواندودرمی می‌شود. که در این مرحله بیان فاکتور Foxa2 مشاهده گردید (۵۶). Foxa2 در تخصصی شدن اندودرم مهم است. پس اگر در این سیستم بیان آن به وسیله siRNA مهار شود، نشانگرهای کبدی مثل آلبومین تا ۶۰درصد کاهش می‌یابد بنابراین Foxa2 نقش مهمی در تمایز اولیه کبدی دارد. مرحله دوم تیمار با FGF4/1 و HGF است که دراین مرحله AFP و ALB بیان می‌شوند. مرحله سوم بلوغ کبدی است که با تیمار سلول‌ها با فاکتور OSM ایجاد گردید و در مرحله بعد سلول‌ها را بر بستر کلاژنی و عدم سرم منتقل می‌کنند تا سلول‌های وابسته به سرم که عمدتا غیرکبدی هستند حذف شود. بعد از سه هفته ۸۰ درصد سلول هپاتوسیت تولید خواهد شد که مورفولوژی و بیان ژنی (TDO، G6Pase، PEPCK، CYP، ALB) آن شبیه هپاتوسیت بالغ است. در مرحله بعد سلول‌ها به وسیله FACS جداسازی شدند، سلول‌های GFP مثبت را قبل از پیوند از نظر نشانگرهای سلول بنیادی تمایز نیافته یعنی cKit، ERas که در تومورزایی مهم است و حتی طبیعی بودن کرموزوم را با کاریوتایپ بررسی کردند و در نهایت به موش دچار سیروز کبدی ایجاد شده توسط سم Dimethylnitrosamine (DMN) تزریق گردید و تا ۸۰ هفته از نظر بیان آلبومین و فیبرینوژن پلاسما پیگیری شد. سلول‌های GFP مثبت در کبد منتشر شدند و نشان داده شد که در مناطق فیبروتیک ادغام می‌شوند (۵۸). جدول ۱ در برگیرنده مطالعات تمایزی سلول‌های بنیادی جنینی موشی به سلول‌های کبدی می‌باشد.

جدول ۱: تمایز سلول‌های بنیادی جنینی موش به سلول‌های کبدی

Differentiation protocol	Analytical Assays	Ref
EB Formation, Spontaneous		
EB (5days Hanging Drop) Plate on Gelatin	ICG TEM	(41)
EB (2days Hanging Drop) Plate on Gelatin	In Situe Hybrydizitation	(40)
EB (5days Suspension) Plate on Gelatin	ELISA Testosteron Metabolism Assay Phenobarbital Iduction Assay	(59)
EB (5days Hanging Drop) Plate on collagen 1	-	(50)
EB (4days Hanging Drop) Plate on Uncoated Dish	FACS Western Blot for ApoE	(51)
EB (5days Hanging Drop) Day10:plate on Gelatin Day20:plate on CollagenI	-	(50)
Growth Factors		
EB (5days Suspension) Dex 10^{-7}mol/L , ITS 5mg/L	-	(60)
EB (5days Suspension) RA :10^{-7}mol/L HGF:20ng/ml NGF:50ng/ml	-	(45)
EB (5days Suspenssion) Plate on gelatin 7Days:a FGF(100ng/ml) 4Days:TGF(20 ng/ml),AFP(20 ng/ml),)HGF :20 ng/ml 4Days:OSM(10 ng/m),Dex(10-7 ng/ml),ITS (5 ng/ml)	RIA for ALB & urea Re-culture On day 17	(43)
EB (2days Hanging Drop) (3days Suspenssion) Plate on collagen Day9:aFGF(100 ng/ml) Day12: HGF(20 ng/ml) Day15:OSM(10 ng/ml),Dex(10^{-7}M),ITS (5mg/ml,5mg/m,5 µg/ml)	JNK Activity	(46)
EB (2days Hanging Drop) Plate on gelatin Day6:aFGF(20ng/ml, bFGF 10ng/ml) Day10:HGF (10ng/ml) Day16:OSM (10 ng/m), Dex (10^{-7}mol/L), ITS (10µg/ml,5µg/ml,5ng/ml)	Western Blot for ALB Urea Synthesis	(42)
EB(4days Suspension) Plate on matrigel a&b FGF(50ng/ml), HGF(20ng/ml), OSM(10ng/ml), 10-5Dex, ITS(1X)	PAS Protein Estimation Measurement of Enzyme Release Induse by CCL4	(47)
EB (5daysHanging Drop) Plate on collagen IV 28days:ITS(1X), hydrocortisone hemisuccinate(10µmol/L), BSA(0.05%), AA(2mmol/L), NA(10mmol/L), Dex(1µmol/L)	FACS	(49)
Direct Differentiation		
3Days:LIF(100U/ml)+RA(10-8 mol/L) 5Days:FGF1(100ng/ml),FGF4(20ng/ml), HGF(50ng/ml) Replate on collagenI, OSM(10ng/ml)	TEM	(56)
3Dyas:LIF(100U/ml), RA(10-8 mol/L) 5Days:FGF1(100 ng/ml), FGF4(20ng/ml), HGF(50ng/ml) Repate on collagenI, OSM(10ng/ml)	Microarray	(58)
Transplant to CCL4 Model 3weaks:Culture of GFP+ of teratoma in Transferrin(5mg/ml),Hydrocortisone Hemisuccinate(10^{-6} mole), BSA (0.5mg/m), AA(2mmol/L) 2Days: Nicotinamide,Dex,G418	TEM Glucose Production Ammonia Concentration	(61)
4Days:DMSO 1% 6Days :NaB 1,2.5,5mM Plate on collagenI	Urea Analysis PAS,Glucose,Lactate Measurement Mitochondrial Mass	(57)
4Days:DMSO 0.8% 6Days:NaB 2.5Mm 6-12Days: HGF(10ng/ml)	Flocytometery PAS	(62)
EB then Plate on Fibronectin	FACS PAS	(63)
Co-Culture		
Nicotinamide(10mM), AA(1mM), Dex, EGF(10ng/ml), ITS(0.5 mg/ml), DMSO(1%) +cardiac cell Or +fetal liver cell line		(53)
EB(2days Hanging Drop) 13 Days plate on gelatin 15Days:Cultured with Condition Media of 3T3 Cells	Percoll MACS PAS	(44)
2Days:LIF(1000U/ml), RA(10 µM) 2Days:bFGF(20ng/ml), HGF(20ng/ml) 5Days:OSM(10ng/ml) + Thy -1 Ccells	TEM Removal of Ammonia	(55)

سلول‌های بنیادی جنینی انسانی

مطالعاتی که در آنها از سلول‌های بنیادی جنینی انسانی استفاده شده است به دلیل مشکلات اخلاقی موجود نسبت به مطالعات حیوانی محدودتر می‌باشد اما قابل ذکر است که چاپ این قبیل مطالعات در حال افزایش است. سلول‌های بنیادی جنینی در صورت کشت به حالت سوسپانسیون تمایل به جمع شدن در کنار یکدیگر و تشکیل اجسام شبه جنینی را دارند که این اجسام شبه جنینی حاوی سلول‌هایی هستند که شاخص‌های هر سه لایه جنینی را بیان می‌کنند. این اجسام شبه جنیین در طی بلوغ به صورت خود به خودی انواع سلول‌ها را ایجاد کرده و شاخص‌های آنها را بیان می‌کنند که در صورت جداسازی این اجسام و کشت آنها به صورت تک لایه رده‌های سلولی متفاوتی را می‌توان به دست آورد (۶۴).

تمایز به سلول‌های کبدی در آزمایشگاه‌های مختلف و با روش کارهای مختلف گزارش شده است. شالدرین و همکاران نشان دادند که سلول‌های بنیادی جنینی توانایی تمایز به هر سه لایه جنینی را با استفاده از فاکتورهای رشد مختلف دارا می‌باشند (۶۵). رامباتلا و همکاران نشان دادند که می‌توان با استفاده از بوتیرات سدیم تمایز سلول‌های کبدی از سلول‌های بنیادی جنینی را با تشکیل اجسام شبه جنینی پیش ببرند. با وجود اینکه بوتیرات سدیم مرگ سلولی را افزایش می‌داد اما سلول‌های حاصل ویژگی‌های ریخت‌شناسی سلول‌های کبدی و ذخیره گلیکوژن را به خوبی نشان دادند (۶۶).

لونبرگ و همکاران نیز با استفاده از داربست‌های زیست تخریب پذیر لاکتیک، گلیکولیک اسید (PLGA-Poly) و پلی‌ال‌لاکتیک اسید (PLLA-Poly) به عنوان ساختارهای شبه بافت، سلول‌های بنیادی و یا اجسام شبه جنینی را بر روی آنها کشت دادند و با استفاده از فاکتورهای رشد اکتیوین A و IGF تمایز به سلول‌های کبدی را نشان دادند (۶۷). در این مطالعه این سلول‌های حاصل را به همراه داربست‌ها بعد از ۱۴ روز به موش‌های Severe Combined Immunodeficiency (SCID) پیوند زدند سپس سیتوکراتین و آلفا فیتو پروتیین انسانی را با تکنیک‌های ایمونوهیستوشیمی ردیابی کردند. لاوون و همکاران نشان دادند که سلول‌های بنیادی جنینی به طور خود به خود قابلیت تمایز به سلول‌های کبدی را دارند (۶۸). آنها در این مطالعه توانستند جمعیت یکنواختی از سلول‌های کبدی را با استفاده از دست‌کاری‌های ژنتیکی به دست آورند. طبق گزارش به نظر می‌رسد این جمعیت سلولی شبه هپاتوسیت در کنار جمعیت سلولی تمایز یافته به قلب دیده شده‌اند و فاکتور رشد فیبروبلاستی اسیدی در این تمایز نقش عمده‌ای ایفا می‌کند.

برای تایید این نکته که یک سلول، هپاتوسیت واقعی می‌باشد همواره باید مراحل تکوینی را مدنظر داشت چون سلول‌های کبدی در مراحل مختلف جنینی دارای نشانگرهای متفاوت و خاص هر مرحله می‌باشند. در این مطالعه سلول‌های کبدی حاصل با استفاده از سازه eGFP و دستگاه FACS جدا شدند. شیراهاشی و همکاران فاکتورهای دیگری از قبیل انسولین و دگزامتازون را به محیط کشت اجسام شبه جنینی اضافه کردند و آنها را بر روی کلاژن نوع یک کشت دادند و نشان دادند که سلول‌ها با این شرایط کشت، تعداد زیادی از نشانگرهای کبدی را بروز می‌دهند (۶۹). در گزارش دیگری که سوآرتز و همکاران ارایه دادند، نشان داده شد که اضافه کردن فاکتور رشد فیبروبلاستی ۴ و فاکتور رشد سلول‌های کبدی به محیط کشت سلول‌های بنیادی جنینی در حالت سوسپانسیون فاقد سرم و بعد انتقال اجسام شبه جنینی به ظروف کشت حاوی کلاژن میزان زیادی سلول‌های کبدی را ایجاد می‌نماید (۷۰). بهاروند و همکاران تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انسانی را (۷۱) به صورت کشت سه بعدی اجسام جنینی بر روی داربست‌های کلاژن به همراه اضافه کردن فاکتور هایی از قبیل HGF، aFGF، انکوستاتین Mو(OSM) و دگزامتازون گزارش کردند (۲۲). سوتو گوتیئرز و همکاران نیز گزارش کردند که کشت سلول‌های بنیادی جنین در حالت سوسپانسیون، ایجاد اجسام شبه جنینی و بعد انتقال سلول‌های حاصل بر روی فیبرهای نانو و کشت آنها در حضور فاکتورهایی مثل aFGF، مشتقات HGF، دی متیل سولفوکساید (DMSO) و دگزامتازون منجر به تولید و تشکیل سلول‌های کبدی می‌گردد (۷۲).

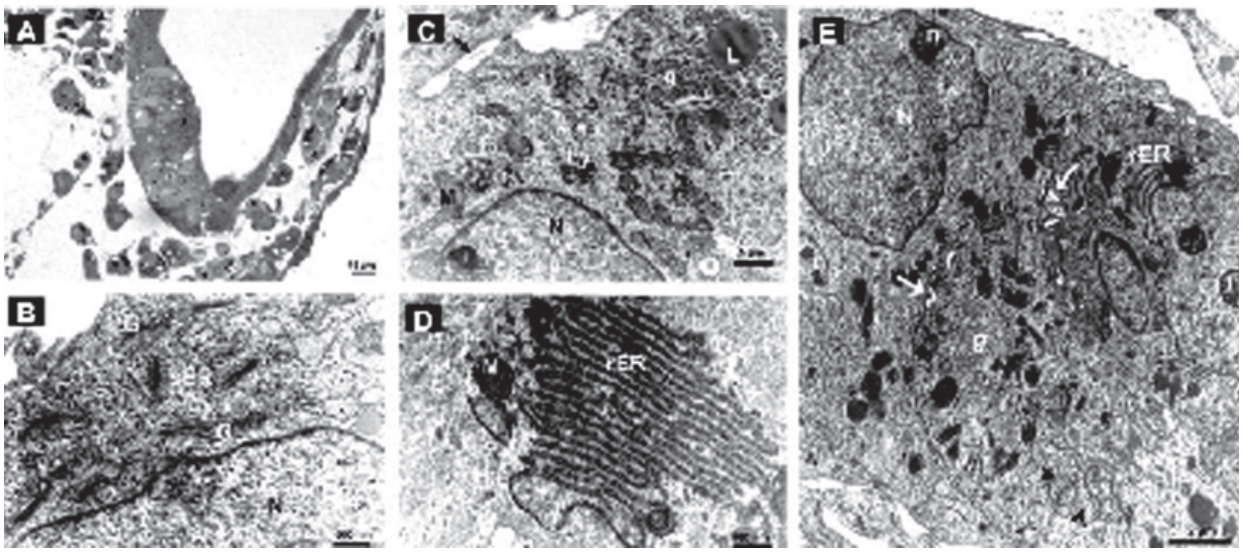
در مطالعه جالبی با هدف کنترل تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های کارای کبدی ماگوییره و همکاران نشان دادند که سلول‌ها در ریزمحیط آلژینیت (Alginate) در طی ۲۳ روز، تمایز خوبی به سمت سلول‌های کبدی نشان می‌دهند به طوری که سلول‌های حاصل قادر به سنتز و ترشح آلبومین، اوره، ذخیره گلیکوژن و فعالیت سیتوکروم P450 می‌باشند (۷۳). کای و همکاران در سال ۲۰۰۷ با استفاده از فاکتورهای رشد متعدد که با ترتیب خاصی به سلول‌های در حین کشت اضافه می‌شد تمایز سلول‌های کبدی را بررسی کردند. آنها در مطالعه خود از فاکتورهایی مثل اکتیوین A، آلبومین، OSM، HGF، BMP2، FGF4 ITS و دگزامتازون در شرایط کشت عاری از سرم استفاده کردند و سلول‌های کارای کبدی را به دست آوردند. به علاوه آنها نشان دادند که سلول‌های کبدی حاصل به راحتی با سودوتایپ ویروس انسانی هپاتیت C آلوده می‌شوند (۷۴). گزارش دیگری تمایز این سلول‌ها را با استفاده از ترکیبی از فاکتورهای رشد و بدون تشکیل اجسام شبه جنینی، نشان دادند به این ترتیب که در دو گروه مطالعاتی تمایز این سلول‌ها را بررسی کردند. در گروه اول از Conditioned Media به همراه فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی استفاده کردند، در گروه دیگر از محیط معمولی به همراه DMSO، سپس با محیط رشد اختصاصی سلول‌های کبدی یعنی HCM غنی شده با HGF و EGF تعویض گردید و در نهایت سلول‌ها با محیط HCM غنی شده با فاکتورهای HGF و OSM به بلوغ نهایی رسیدند (۷۵). در مطالعه دیگری تمایز و خالص‌سازی این سلول‌ها توسط دوآن و همکاران صورت پذیرفت. آنها در این مطالعه از تمایز خود به خودی سلول‌های بنیادی و با تشکیل اجسام شبه جنینی بهره برده و از وکتورهای لنتی ویروسی که حاوی ژن GFP تحت پروموتور آلفا-۱ آنتی‌تریپسین بودند جهت خالص‌سازی سلول‌ها استفاده کردند. علاوه بر اینکه این سلول‌های جدا شده را به موش‌های SCID پیوند زده و پروتیین‌های انسانی ویژه کبد را در سلول‌های GFP^+ بررسی کردند. به ویژه در این مطالعه برای اولین بار آلبومین انسانی را در سرم حیوان پیوند شده مشاهده کردند (۷۶).

های و همکاران در مطالعه دیگری نقش مولکول Wnt را در تکوین و تمایز سلول‌های بنیادی انسانی به سلول‌های کبدی بررسی کردند و دریافتند که تیمار اولیه سلول‌های بنیادی با اکتیوین A و Wnt در نهایت سلول‌های کبدی بیشتری را تولید می‌کند. به طوری

که ۹۰ درصد از سلول‌های تمایز یافته سلول‌های کبدی هستند. آنها سلول‌های کبدی حاصل را به مدل حیوانی پیوند زدند و توانستند DNA انسانی را با تکنیک FISH در حیوان پیوند شده ردیابی کنند. بهاروند و همکاران نشان دادند که با یک روش چند مرحله‌ای و با استفاد از فاکتورهای رشدی مثل FGF4، bFGF aFGF، Noggin OSM، HGF، و دگزامتازون می‌توان از سلول‌های بنیادی جنینی انسانی در شرایط بدون لایه تغذیه کننده سلول‌های هپاتوسیت را تولید کرد (۷۷) . در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۰۸ ارایه گردید، سلول‌های بنیادی انسانی بعد از کشت تک لایه بر روی ماتریژل با استفاده از فاکتورهایی که از قبیل اکتیوین A، بوتیرات سدیم، HGF، DMSO و OSM انجام شد در طی ۳ مرحله یعنی تشکیل اندودرم، پیش‌سازهای سلول‌های کبدی و در نهایت بلوغ سلول‌های کبدی به جمعیت هتروژنی از سلول‌های کبدی دست یافتند که حاوی ۷۰ درصد سلول‌های کارای کبدی بوده است. در مطالعه مشابه دیگری که توسط آگاروال و همکاران ارایه شد، سلول‌های بنیادی جنینی بعد از کشت تک لایه بر روی ماتریژل با استفاده از فاکتور اکتیوین A و تغییرات اندک سرمی به سمت اندودرم قطعی سوق داده شد سپس بعد از تمایز به اندودرم به ظروف پوشیده شده با کلاژن انتقال داده شدند و با استفاده از فاکتورهایی مثل DEX، FGF4، HGF و OSM سلول‌های کارای کبدی را با خلوص بالا (۷۰درصد) به دست آوردند (۷۸). جدول ۲ در برگیرنده مطالعات تمایزی سلول‌های بنیادی جنینی انسانی به سلول‌های کبدی می‌باشد.

جدول ۲: تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انسانی به سلول‌های کبدی

Differentiation protocol	Analytical Assays	Ref
EB Formation & Growth Factors		
EB 20Days: a FGF (100ng/ml), bFGF (5ng/ml), HGF (20 ng/ml), BMP4 (50ng/ml) Or Condition Media of hepatocyte	FACS	(68)
EB (9 days) Plate on collagen	FACS, ICG, PAS	(76)
7Days: aFGF (100ng/ml), FGF4 (10ng/ml) 7Days: HGF (20ng/ml), FGF4 (10ng/m) 14Days: OSM (10ng/ml), Dex (10-7M), ITS (5µg/ml)	Flowcytometery, ELISA, PAS, Ureagenesis, TEM, ICG, LDL uptake	(77)
EB (4days) aFGF (10 ng/ml), bFGF(10ng/ml), BMP4(10ng/ml), HGF (10 ng/ml), OSM (10ng/ml), Dex (10 -7M), ITS	ICG, PAS	(79)
EB (1Day) 7Days:on collagenel then FGF4 & HGF	Immunoblot, Urea assay , Albumin dot plot, PROD, ICG	(70)
EB (4days hanging Drop) 18Days :HSM medium	Cell Counting, TEM, ICG, Norternblot	(80)
EB (2Days) 3Days:Aactivin A, bFGF 8Days: HGF, DMSO 3Days: Dex	FACS (ASGPR) TEM, Measurment of Coagulation Factor7 Activity, Metabolic Activity, Ureagenesis	(81)
Direct Differentiation		
3Days: Activin(100ng/ml) 5Days: FGF4, BMP2 5Days: HGF 5Days:OSM,Dex	ELISA, LDL Uptake	(74)
DMSO (1%) Day7:HCM, HGF (10mg/ml), EGF Day16: HGF (10ng/ml), OSM(10ng/m)	ELISA, PAS, ICG, Western	(75)
2Days: Activin (100 ng/ml), NaB(1mM) 7Days: DMSO1% 7Days: HGF (10ng/ml), OSM (20ng/ml)	Flocytometry, Western, Plasma Protein, PAS, Metabolit of Subestra	(82)
2D:Activin (100 ng/ml)+wnt3a (50ng/ml) 7D:DMSO1% 7D:HGF (10ng/ml)+OSM (20ng/ml)	Flocytometry, Plasma protein:Fibrinogen, fibronectin, A2M, Albumin, TBPA,haptoglubin. Gluconeogenesis, Ureagenesis, ELISA, Cyp metabolism	(83)
5D:Activin (100ng/ml) (RPMI media) 3D:FGF4,HGF,on col1 3D:FGF4,HGF 4D:FGF4,HGF (MM media) 4D:FGF4,HGF,OSM,Dex (HCM media) 5D:FGF4,HGF,OSM,Dex	Immunoblot, FACS, PAS, ICG, ELISA	(78)



شکل ۲۰:تصویر میکروسکوپ الکترونی از هپاتوسیت بالغ، شبکه اندوپلاسمی ER، میتوکندری M، دستگاه گلژی G، لیزوزوم L، هسته N، هستک n

ارزیابی عملکرد سلول‌های تولید شده در آزمایشگاه

همان طور که ذکر گردید در شرایط آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی جنینی به عنوان منبعی خوب جهت ایجاد سلول‌های کبدی می‌باشند. اما سوالی مطرح است که آیا این سلول‌های کبدی ایجاد شده توان عملکردی به عنوان یک سلول کبدی واقعی را دارا می‌باشند؟ به طور کلی این سلول‌ها را می‌توان در ۴ سطح شناسایی و بررسی نمود، از لحاظ ریخت‌شناسی، در سطح RNA و از لحاظ بیان مولکول‌های خاص کبدی با تکنیک‌هایی مثل qPCR و RT-PCR، در سطح پروتیین و با تکنیک‌هایی مثل ایمونوسیتوشیمی، فلوسایتومتری و وسترن بلات و در سطح عملکردی با سنجش ترشح اوره، آلبومین و یا سنجش فعالیت‌های آنزیم‌های سیتوکروم اکسیداز.

برای بررسی این موارد روش‌های رایجی در آزمایشگاه به کار می‌رود که به اختصار هر کدام را توضیح می‌دهیم:

ریخت‌شناسی

مورفولوژی هپاتوسیت‌ها در محیط کشت چند وجهی، با هسته بزرگ و در مرکز با هستک واضح، قابل شناسایی است. در سلول جدی تعداد ارگانل کم و غیرقطبی است و نسبت هسته به سیتوپلاسم زیاد است. در حالی که سلول بالغ، بعضا دو هسته‌ای با میتوکندری زیاد و توسعه یافته، میکروویلای غنی از گرانول گلیکوژنی و پراکسیزوم زیاد، اتصالات محکم و دسموزوم است. حتی در بعضی مناطق مجاری کانالیکول اتفاقی، نواحی هتروکروماتین گسترده و شبکه اندوپلاسمی صاف و خشن زیاد دارد (شکل ۲۰).

بررسی بیان ژن

یکی دیگر از راه‌های مورد بررسی شده در آزمایشگاه سلول‌های کبدی، بررسی بیان ژن آنها است که بدین منظوز ژن‌های هپاتوسیت را در سه مرحله مورد بررسی قرار می‌دهند.

۱. ژن‌هایی که شاخصه سلول‌های اندودرم هستند همانند: Foxa2, Sox17, Gata4

۲.ژن‌هایی که شاخصه هپاتوسیت ابتدایی هستند همانند: AFP, TTRAAT

۳. ژن‌هایی که شاخصه هپاتوسیت بالغ هستند همانند:

TDO, ALB, TAT, G6Pase, CYPs, PEPCK, CK8-18

ترشح آلبومین

یکی از فاکتورهای مهمی که نشان می‌دهد سلول‌های تمایز یافته به سلول‌های کبدی تبدیل شده‌اند، توان ترشح آلبومین از آنها می‌باشد. آلبومین سرم پروتیین غالب در پلاسمای خون است که توسط سلول‌های کبدی تولید وترشح می‌شود. نقش آلبومین به عنوان تنظیم کننده فشار اسمزی و حامل مولکول‌هایی که در آب غیر حلال هستند، به خوبی در سرم انسان شناخته شده است. برای سنجش این فاکتور ترشحی کافی است تا محیط رویی سلول‌های تمایز یافته را جمع آوری کرده سپس با تکنینک‌های آزمایشگاهی مثل ELISA میزان این پروتیین ترشحی را سنجید (۷۴).

سنتز اوره

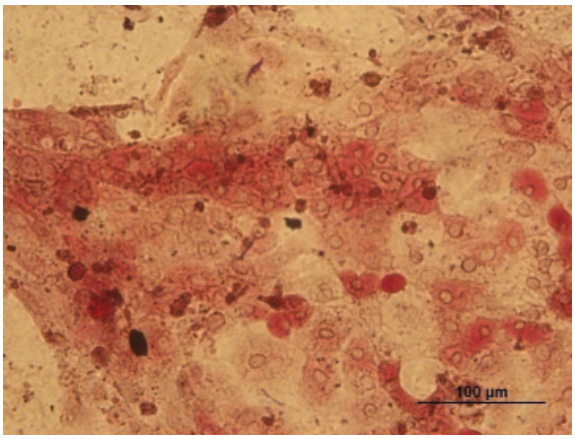
اوره مولکولی حلال در آب است که در بدن به دلیل حذف نیتروژن‌های اضافی ساخته می‌شود. در حقیقت اوره از ترکیباتی مثل دی‌اکسیدکربن، آب، اسید آسپارتیک و آمونیاک است که در طی چرخه سنتز می‌شود. از آن‌جایی که آمونیاک به عنوان یک ترکیب متابولیک سمی در بدن شناخته شده است، سیستم موجود زنده طوری طراحی شده است تا از این آمونیاک اضافی اوره سنتز شده و سپس از بدن دفع گردد. اگرچه تولید و سنتز اوره یک فرایند انرژی خواه است اما به دلیل حذف آمونیاک از بدن بسیار اهمیت دارد. چرخه اوره در کبد توسط سلول‌های کبدی صورت می‌پذیرد و توسط آنزیم ان-استیل گلوتامات تنظیم می‌شود.سنتز اوره در سلول‌های کبدی تولید شده در شرایط آزمایشگاه توسط تکنیک‌های کلریمتریک رایج در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی (سنجش اوره خون) قابل اندازه‌گیری می‌باشد.

متابولیسم داروها

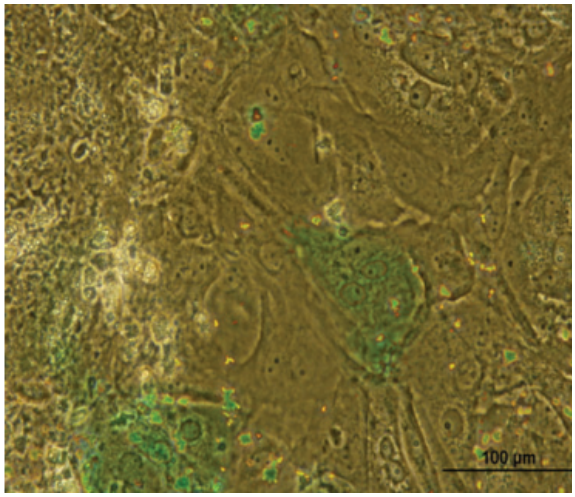
متابولیسم داروها در حقیقت فرایندی است که درطی آن داروهای وارد شده به بدن از طریق واکنش‌های آنزیمی متابولیزه می‌شوند. در این میان شبکه آندوپلاسمی صاف سلول‌های کبدی این امر مهم را بر عهده دارند. اگرچه سایر ارگان‌ها هم تاحدودی این توانایی را دارا می‌باشند اما بافت کبد به دلیل بزرگ بودن و در مسیر بودن جذب داروها (اکثر داروها از طریق دستگاه گوارش جذب می‌شوند که در طی عبور از مسیر خونی رگ پورت عبور خواهند کرد) و مهم‌تر از همه به دلیل میزان بالای آنزیم‌های متابولیزه کننده داروها نسبت به سایر سلول‌ها نقش مهم‌تری در متابولیسم داروها دارند. فرایند متابولیسم داروها در کبد طی دو فاز صورت می‌پذیرد و آنزیم‌های مهمی در این مسیر و در سلول‌های کبدی فعالیت دارند. آنزیم‌های فعال در فاز یک عبارتند از: آنزیم‌های اکسید کننده مثل سیستم مونواکسیژناز سیتوکروم P450، سیستم مونواکسیژناز حاوی فلاوین، الکل دهیدروژنازها، آلدهید دهیدروژنازها، مونوآمین اکسیدازها و پراکسیدازها. آنزیم‌های احیا کننده مثل NADPH سیتوکروم P450 ردوکتاز و سیتوکروم P450 احیا شده و آنزیم‌هایی مثل آمیدازها، استرازها و هیدرولازها که همگی در متابولیسم داروها نقش اساسی را ایفا می‌کنند. در فاز دوم ترکیبات ایجاد شده در فاز یک توسط آنزیم‌های ویژه دیگری بدون اثر می‌شوند که می‌توان آنزیم‌های مثل گلوتاتیون-اس-ترانسفراز، ان استیل ترانسفراز و سولفوترانسفرازها را نام برد. سنجش فعالیت این آنزیم‌ها در سلول‌های کبدی ایجاد شده از سلول‌های بنیادی جنینی با سنجش فعالیت آنزیم سیتوکرم P450 کمک شایانی به تشخیص عملگر بودن سلول‌های حاصل می‌کند (۸۴).

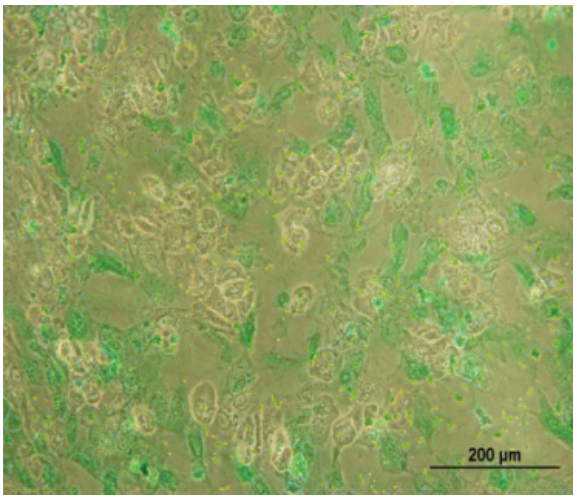
ذخیره گلیکوژن

گلیکوژن پلی‌ساکاریدی متشکل از زیرواحدهای گلوکز است که به عنوان ذخیره انرژی در سلول‌های حیوانات عمل می‌کند. این پلی‌ساکارید توسط کبد و عضله ساخته می‌شود. در سلول‌های کبدی میزان تولید و ذخیره این مولکول بسیار بالا است به طوری که به میزان ۸درصد وزن بافت کبد یک فرد بالغ می‌رسد. تنها گلیکوژن ذخیره‌ای در سلول‌های کبدی، قابل استفاده برای سایر سلول‌ها است. سلول‌های کبدی تحت تاثیر هورمون انسولین، گلوکز حاصل از مواد غذایی را جذب کرده و با استفاده از آنزیم گلیکوژن سنتتاز به گلیکوژن تبدیل و ذخیره می‌نماید که بعد در صورت نیاز توسط آنزیم گلیکوژن فسفریلاز به زیرواحدهای آن، گلوکز، تجزیه می‌شود. بنابراین توانایی تولید و ذخیره گلیکوژن یکی از ویژگی‌های عملکردی سلول‌های کبدی است که در سلول‌های تمایز یافته حاصل از سلول‌های بنیادی جنینی هم باید قابل ردیابی باشد. به همین منظور ذخیره گلیکوژن سلول‌های حاصل را با رنگ‌آمیزی اختصاصی گلیکوژن با رنگ فوشین بازی و با تکنیک پریودیک اسید شیف (Periodic Acid Shiff Staining) می‌سنجند. به طور خلاصه سلول‌های تثبیت شده با پریودیک اسید برای مدت ۵ دقیقه و در دمای آزمایشگاه مجاور شده به این ترتیب گلایکول‌ها به آلدهید اکسید شده و در مرحله بعد با استفاده از واکنشگر شیف رنگ‌آمیزی می شوند (شکل ۲۱) (۷۷).



شکل ۲۱: رنگ‌آمیزی سلول‌های بنیادی جنینی (سمت راست) و سلول‌های هپاتوسیت تولید شده در آزمایشگاه با تکنیک PAS



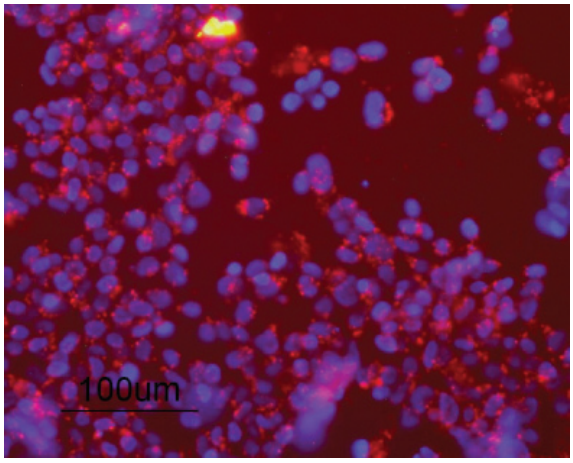


شکل ۲۲: جذب ICG در سلول‌های تمایز یافته کبدی

جذب Indocyanin Green

یکی از وظایف و اعمال حیاتی سلول‌های کبدی جذب و دفع مواد مختلف از جریان خون می‌باشد. ایندوسیانین گرین یک آنیون غیرسمی

ارگانیک است که توسط سلول‌های کبدی بالغ به طور کامل حذف شده و در حال حاضر به عنوان سنجش عملکردی سلول‌های کبدی به کار می‌رود، به این ترتیب که سلول‌های کبدی قادر به جذب و رهاسازی این ماده می‌باشند. به طور خلاصه سلول‌های حاصل از تمایز را به مدت ۶ ساعت با این ماده مجاور می‌کنند که در این صورت سلول‌های کبدی قادر به جذب این ماده بوده و به رنگ سبز در می‌آیند سپس این ماده را از محیط سلول‌ها با تعویض محیط حذف کرد که در این صورت سلول‌ها این ماده را به محیط برمی‌گردانند و دیگر به رنگ سبز نخواهند بود (شکل ۲۲) (۷۷).



شکل ۲۳: جذب Dil-AC-LDL توسط سلول‌های کبدی (سل‌لاین PLC)، هسته‌ها با DAPI رنگ‌آمیزی شده و آبی دیده می‌شوند

نتیجه‌گیری

با توجه به مقاله‌ها و گزارش‌های منتشر شده مشاهده می‌شود که تمایز درون آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های کارای کبدی مسیر خود را پیدا کرده است. گرچه هنوز در این مسیر، ناشناخته‌های بسیاری نهفته است که نیاز به مطالعه و تحقیق بیشتر دارد. اما با توجه به نیاز جوامع بشری به سلول‌های کبدی به عنوان یک منبع جدید در درمان بیماری‌های کبدی، گروه محققین سلول‌های بنیادی را به سمت فراهم آوردن بهترین شرایط جهت ایجاد و تولید درون آزمایشگاهی سلول‌های کبدی سوق داده است که این امر بدون الگوبرداری از طبیعت و آنچه که در طی تکوین اتفاق می‌افتد، ناممکن و ناکارامد خواهد بود.

در این بین می‌بایست به نکات ذیل در آنالیز و سنجش سلول‌های تمایز یافته توجه داشت:

۱. تمایز درون آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی به سلول‌های کبدی بر خلاف استفاده از فاکتورهای تمایزی مشابه با طبیعت، هنوز یک تمایز جهت دار واقعی نیست. لذا جمعیت حاصل از تمایز همچنان یک جمعیت هتروژن است که این امر یافتن نشانگرهای اختصاصی‌تر را جهت سلول‌های کبدی و به کار بردن آنها در دسته بندی سلول‌ها برای رسیدن به یک جمعیت یکنواخت‌تر می‌طلبد.

۲. به دست آوردن سلول‌های کبدی کارا که بتوانند فعالیت‌های کبدی از قبیل سنتز و ترشح آلبومین، ترشح اوره، ذخیره گلیکوژن و فعالیت‌های اکسیدازی را انجام دهند همیشه می‌بایست مد نظر بوده و کارا بودن این سلول‌ها را در شرایط آزمایشگاهی همان طور که قبلا توضیح داده شد، سنجید.

۳. همواره باید در نظر داشت که وقتی یک تمایز آزمایشگاهی موفق است که سلول‌های حاصل از روند تمایز کارایی و عملکرد خود را در بدن موجود زنده نیز نشان دهند. بنابراین داشتن و ایجاد یک مدل حیوانی مناسب و بعد پیوند سلول‌های تمایز یافته به این مدل و ردیابی سلول‌های تمایز یافته پیوند شده یکی از مراحل اصلی و مهم کار است.

۴. باید در نظر داشت که بر خلاف مطالعات و گزارش‌های فراوان در تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های کبدی، هنوز یک روش کار یکسان و استاندارد جهت تولید این سلول‌ها در آزمایشگاه وجود ندارد. بنابراین شناخت بهتر فاکتورها، مسیرهای پیام‌رسانی و بسترهای مناسب اجتناب‌ناپذیر است.

بر خلاف پتانسیل بالای سلول‌های بنیادی جنینی استفاده از آنها به دلیل مشکلاتی از قبیل در دسترس نبودن رده‌های سلولی انسانی به میزان کافی، مشکلات مربوط به رد پیوند این سلول‌ها و مشکلات اخلاقی هنوز بر سر راه استفاده از این سلول‌ها وجود دارد. علاوه بر اینکه همواره مشکلاتی از قبیل تومورزایی این سلول‌ها بعد از پیوند نیز مورد بحث بوده است. اما در هر صورت این مطالعات می‌تواند ناشناخته‌های تکوین سلول‌های کبدی را بر دانشمندان معلوم گرداند و گامی بزرگ در طب ترمیمی با استفاده از سلول‌های کارای کبدی در بیماران کبدی و یا غربالگری دارویی جهت بیماران باشد. امید است در آینده این مشکلات با استفاده از تکنیک‌های جدیدی که در تشکیل سلول‌های با پتانسیل بالا از سلول‌های سوماتیک (iPS) – که در حقیقت سلول‌های با پتانسیل شبیه سلول‌های بنیادی جنینی هستند – ارایه شده است، مرتفع گردد. به علاوه در آینده امید زیادی به استفاده از این سلول‌ها در طب ترمیمی است (۸۷ – ۷۷). در حقیقت سلول‌های iPS سلول‌های پرتوان القایی هستند که در آزمایشگاه و از طریق برنامه‌ریزی مجدد سلول‌های سوماتیک (فیبروبلاست پوست) با استفاده از ۴ ژن Klf4، Sox2، c-Myc و Oct4 به مرحله جنینی بازگردانده می‌شوند، به این ترتیب سلول‌های بنیادی جنینی ویژه هر فرد را می‌توان تهیه نمود. در کل مطالعات بیشتری در زمینه پایداری ژنتیکی سلول‌های بنیادی جنینی، صحت و درستی تمایز این سلول‌ها و برنامه‌ریزی مجدد این سلول‌ها لازم است تا بتوان ایمنی استفاده از آنها را در موارد درمانی اثبات کرد.

References

1. Banas A, Yamamoto Y, Teratani T, Ochiya T. Stem cell plasticity: learning from hepatogenic differentiation strategies. Dev Dyn. 2007; 236: 3228-3241.
2. McLin VA, Zorn AM. Molecular control of liver development. Clin Liver Dis. 2006; 10: 1-25, v.
3. Zaret KS. Liver specification and early morphogenesis. Mech Dev 2000; 92: 83-88.
4. Zorn AM, Wells JM. Molecular basis of vertebrate endoderm development. Int Rev Cytol. 2007; 259: 49-111.
5. Conlon FL, Lyons KM, Takaesu N, Barth KS, Kispert A, Herrmann B, et al. A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse. Development. 1994; 120: 1919-1928.
6. Varlet I, Collignon J, Robertson EJ. nodal expres-

sion in the primitive endoderm is required for specification of the anterior axis during mouse gastrulation. Development 1997; 124: 1033-1044.
7. Vincent SD, Dunn NR, Hayashi S, Norris DP, Robertson EJ. Cell fate decisions within the mouse organizer are governed by graded Nodal signals. Genes Dev. 2003; 17: 1646-1662.
8. Norris DP, Brennan J, Bikoff EK, Robertson EJ. The Foxh1-dependent autoregulatory enhancer controls the level of Nodal signals in the mouse embryo. Development. 2002; 129: 3455-3468.
9. Hart M. The nomad at home. J Prev Interv Community. 2005; 30: 127-141.
10. Duncan SA, Watt AJ. BMPs on the road to hepatogenesis. Genes Dev. 2001; 15: 1879-1884.
11. Zaret KS. Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis. Nat Rev Genet 2002; 3: 499-512.
12. Zaret KS. Hepatocyte differentiation: from the endoderm and beyond. Curr Opin Genet Dev. 2001; 11: 568-574.
13. Zaret K. Early liver differentiation: genetic potentiation and multilevel growth control. Curr Opin Genet Dev 1998; 8: 526-531.
14. Tanimizu N, Miyajima A. Molecular mechanism of liver development and regeneration. Int Rev Cytol. 2007; 259: 1-48.
15. Lemaigre F, Zaret KS. Liver development update: new embryo models, cell lineage control, and morphogenesis. Curr Opin Genet Dev. 2004; 14: 582-590.
16. Zhao R, Duncan SA. Embryonic development of the liver. Hepatology. 2005; 41: 956-967.
17. Duncan SA. Mechanisms controlling early development of the liver. Mech Dev. 2003; 120: 19-33.
18. Kinoshita T, Miyajima A. Cytokine regulation of liver development. Biochim Biophys Acta. 2002; 1592: 303-312.
19. Micsenyi A, Tan X, Sneddon T, Luo JH, Michalopoulos GK, Monga SP. Beta-catenin is temporally regulated during normal liver development. Gastroenterology. 2004; 126: 1134-1146.
20. Krupczak-Hollis K, Wang X, Kalinichenko VV, Gusarova GA, Wang IC, Dennewitz MB, et al. The mouse Forkhead Box m1 transcription factor is essential for hepatoblast mitosis and development of intrahepatic bile ducts and vessels during liver morphogenesis. Dev Biol. 2004; 276: 74-88.
21. Tanimizu N, Miyajima A. Notch signaling controls hepatoblast differentiation by altering the expression of liver-enriched transcription factors. J Cell Sci. 2004; 117: 3165-3174.
22. Baharvand H, Hashemi SM, Kazemi Ashtiani S, Farrokhi A. Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro. Int J Dev Biol. 2006; 50: 645-652.
23. Wells JM, Melton DA. Vertebrate endoderm development. Annu Rev Cell Dev Biol. 1999; 15: 393-410.
24. Bonner-Weir S, Weir GC. New sources of pancreatic beta-cells. Nat Biotechnol. 2005; 23: 857-861.
25. Lavon N, Benvenisty N. Study of hepatocyte differentiation using embryonic stem cells. J Cell Biochem. 2005; 96: 1193-1202.
26. Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, Atienza J, Witmyer J, Zucker JP, et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. N Engl J Med. 2004; 350: 1353-1356.
27. D'Amour KA, Agulnick AD, Eliazer S, Kelly OG, Kroon E, Baetge EE. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. Nat Biotechnol. 2005; 23: 1534-1541.
28. Hoffman LM, Carpenter MK. Characterization and culture of human embryonic stem cells. Nat Biotechnol. 2005; 23: 699-708.
29. Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. J Embryol Exp Morphol. 1985; 87: 27-45.
30. Lowe LA, Yamada S, Kuehn MR. Genetic dissection of nodal function in patterning the mouse embryo. Development. 2001; 128: 1831-1843.
31. Kanai-Azuma M, Kanai Y, Gad JM, Tajima Y, Taya C, Kurohmaru M, et al. Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice. Development. 2002; 129: 2367-2379.
32. Parashurama N, Nahmias Y, Cho CH, van Poll D, Tilles AW, Berthiaume F, et al. Activin alters the kinetics of endoderm induction in embryonic stem cells cultured on collagen gels. Stem Cells. 2008; 26: 474-484.
33. Morrison GM, Oikonomopoulou I, Migueles RP, Soneji S, Livigni A, Enver T, et al. Anterior definitive endoderm from ESCs reveals a role for FGF signaling. Cell Stem Cell. 2008; 3: 402-415.
34. Seguin CA, Draper JS, Nagy A, Rossant J. Establishment of endoderm progenitors by SOX transcription factor expression in human embryonic stem cells. Cell Stem Cell. 2008; 3: 182-195.
35. Yasunaga M, Tada S, Torikai-Nishikawa S, Nakano Y, Okada M, Jakt LM, et al. Induction and monitoring of definitive and visceral endoderm differentiation of mouse ES cells. Nat Biotechnol 2005;23:1542-1550.
36. Horslen SP, Fox IJ. Hepatocyte transplantation. Transplantation. 2004; 77: 1481-1486.
37. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature. 1981; 292: 154-156.
38. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. 1998; 282: 1145-1147.
39. Teramoto K, Asahina K, Kumashiro Y, Kakinuma S, Chinzei R, Shimizu-Saito K, et al. Hepatocyte differentiation from embryonic stem cells and umbilical cord blood cells. J Hepatobiliary Pancreat Surg. 2005; 12: 196-202.
40. Asahina K, Fujimori H, Shimizu-Saito K, Kumashiro Y, Okamura K, Tanaka Y, et al. Expression of the liver-specific gene Cyp7a1 reveals hepatic differentiation in embryoid bodies derived from mouse embryonic stem cells. Genes Cells. 2004; 9: 1297-1308.
41. Yamada T, Yoshikawa M, Kanda S, Kato Y, Nakajima Y, Ishizaka S, et al. In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green. Stem Cells. 2002; 20: 146-154.
42. Chinzei R, Tanaka Y, Shimizu-Saito K, Hara Y, Kakinuma S, Watanabe M, et al. Embryoid-body cells

derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes. Hepatology. 2002; 36: 22-29.
43. Hu AB, Cai JY, Zheng QC, He XQ, Shan Y, Pan YL, et al. High-ratio differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes in vitro. Liver Int. 2004; 24: 237-245.
44. Kumashiro Y, Asahina K, Ozeki R, Shimizu-Saito K, Tanaka Y, Kida Y, et al. Enrichment of hepatocytes differentiated from mouse embryonic stem cells as a transplantable source. Transplantation. 2005; 79: 550-557.
45. Kuai XL, Cong XQ, Li XL, Xiao SD. Generation of hepatocytes from cultured mouse embryonic stem cells. Liver Transpl. 2003; 9: 1094-1099.
46. Hamazaki T, Iiboshi Y, Oka M, Papst PJ, Meacham AM, Zon LI, et al. Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro. FEBS Lett. 2001; 497: 15-19.
47. Kulkarni JS, Khanna A. Functional hepatocyte-like cells derived from mouse embryonic stem cells: a novel in vitro hepatotoxicity model for drug screening. Toxicol In Vitro. 2006; 20: 1014-1022.
48. Zhou QJ, Huang YD, Xiang LX, Shao JZ, Zhou GS, Yao H, et al. In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes induced by fibroblast growth factors and bone morphological protein-4. Int J Biochem Cell Biol. 2007; 39: 1714-1721.
49. Heo J, Factor VM, Uren T, Takahama Y, Lee JS, Major M, et al. Hepatic precursors derived from murine embryonic stem cells contribute to regeneration of injured liver. Hepatology. 2006; 44: 1478-1486.
50. Kania G, Blyszczuk P, Jochheim A, Ott M, Wobus AM. Generation of glycogen- and albumin-producing hepatocyte-like cells from embryonic stem cells. Biol Chem. 2004; 385: 943-953.
51. Yin Y, Lim YK, Salto-Tellez M, Ng SC, Lin CS, Lim SK. AFP(+), ESC-derived cells engraft and differentiate into hepatocytes in vivo. Stem Cells. 2002; 20: 338-346.
52. Kuai XL, Bian HY, Cong XQ, Li XL, XIAO sD. Differentiation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes in vitro and in vivo. Chinese journal of Digestive Diseases. 2003; 4: 75-80.
53. Fair JH, Cairns BA, Lapaglia M, Wang J, Meyer AA, Kim H, et al. Induction of hepatic differentiation in embryonic stem cells by co-culture with embryonic cardiac mesoderm. Surgery. 2003; 134: 189-196.
54. Soto-Gutierrez A, Kobayashi N, Rivas-Carrillo JD, Navarro-Alvarez N, Zhao D, Okitsu T, et al. Reversal of mouse hepatic failure using an implanted liver-assist device containing ES cell-derived hepatocytes. Nat Biotechnol. 2006; 24: 1412-1419.
55. Ishii T, Yasuchika K, Fujii H, Hoppo T, Baba S, Naito M, et al. In vitro differentiation and maturation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes. Exp Cell Res. 2005; 309: 68-77.
56. Teratani T, Yamamoto H, Aoyagi K, Sasaki H, Asari A, Quinn G, et al. Direct hepatic fate specification from mouse embryonic stem cells. Hepatology. 2005; 41: 836-846.
57. Sharma NS, Shikhanovich R, Schloss R, Yarmush ML. Sodium butyrate-treated embryonic stem cells yield hepatocyte-like cells expressing a glycolytic phenotype. Biotechnol Bioeng. 2006; 94: 1053-1063.
58. Yamamoto Y, Teratani T, Yamamoto H, Quinn G, Murata S, Ikeda R, et al. Recapitulation of in vivo gene expression during hepatic differentiation from murine embryonic stem cells. Hepatology. 2005; 42: 558-567.
59. Tsutsui M, Ogawa S, Inada Y, Tomioka E, Kamiyoshi A, Tanaka S, et al. Characterization of cytochrome P450 expression in murine embryonic stem cell-derived hepatic tissue system. Drug Metab Dispos. 2006; 34: 696-701.
60. Pan YL, Cai JY, Hu AB. Differentiation of hepatocytes from mouse embryonic stem cells and its significance. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2005; 4: 291-294.
61. Oliveira C, Pinto M, Duval A, Brennetot C, Domingo E, Espin E, et al. BRAF mutations characterize colon but not gastric cancer with mismatch repair deficiency. Oncogene. 2003; 22: 9192-9196.
62. Zhou QJ, Xiang LX, Shao JZ, Hu RZ, Lu YL, Yao H, et al. In vitro differentiation of hepatic progenitor cells from mouse embryonic stem cells induced by sodium butyrate. J Cell Biochem. 2007; 100: 29-42.
63. Drobinskaya I, Linn T, Saric T, Bretzel RG, Bohlen H, Hescheler J, et al. Scalable selection of hepatocyte- and hepatocyte precursor-like cells from culture of differentiating transgenically modified murine embryonic stem cells. Stem Cells. 2008; 26: 2245-2256.
64. Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. Mol Med. 2000; 6: 88-95.
65. Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97: 11307-11312.
66. Rambhatla L, Chiu CP, Kundu P, Peng Y, Carpenter MK. Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. Cell Transplant. 2003; 12: 1-11.
67. Levenberg S, Huang NF, Lavik E, Rogers AB, Itskovitz-Eldor J, Langer R. Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds. Proc Natl Acad Sci USA. 2003; 100: 12741-12746.
68. Lavon N, Yanuka O, Benvenisty N. Differentiation and isolation of hepatic-like cells from human embryonic stem cells. Differentiation. 2004; 72: 230-238.
69. Shirahashi H, Wu J, Yamamoto N, Catana A, Wege H, Wager B, et al. Differentiation of human and mouse embryonic stem cells along a hepatocyte lineage. Cell Transplant. 2004; 13: 197-211.
70. Schwartz RE, Linehan JL, Painschab MS, Hu WS, Verfaillie CM, Kaufman DS. Defined conditions for development of functional hepatic cells from human embryonic stem cells. Stem Cells Dev. 2005; 14: 643-655.
71. Baharvand H, Ashtiani SK, Valojerdi MR, Shahverdi A, Taee A, Sabour D. Establishment and in vitro differentiation of a new embryonic stem cell line from human blastocyst. Differentiation. 2004; 72: 224-229.
72. Soto-Gutierrez A, Navarro-Alvarez N, Rivas-Carrillo JD, Chen Y, Yamatsuji T, Tanaka N, et al. Differentiation of human embryonic stem cells to hepatocytes

using deleted variant of HGF and poly-amino-urethane-coated nonwoven polytetrafluoroethylene fabric. Cell Transplant. 2006; 15: 335-341.
73. Maguire T, Davidovich AE, Wallenstein EJ, Novik E, Sharma N, Pedersen H, et al. Control of hepatic differentiation via cellular aggregation in an alginate microenvironment. Biotechnol Bioeng. 2007; 98: 631-644.
74. Cai J, Zhao Y, Liu Y, Ye F, Song Z, Qin H, et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. Hepatology. 2007; 45: 1229-1239.
75. Hay DC, Zhao D, Ross A, Mandalam R, Lebkowski J, Cui W. Direct differentiation of human embryonic stem cells to hepatocyte-like cells exhibiting functional activities. Cloning Stem Cells. 2007; 9: 51-62.
76. Duan Y, Catana A, Meng Y, Yamamoto N, He S, Gupta S, et al. Differentiation and enrichment of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells in vitro and in vivo. Stem Cells. 2007; 25: 3058-3068.
77. Baharvand H, Hashemi SM, Shahsavani M. Differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatocyte-like cells in a serum-free adherent culture condition. Differentiation. 2008; 76: 465-477.
78. Agarwal S, Holton KL, Lanza R. Efficient Differentiation of Functional Hepatocytes from Human Embryonic Stem Cells. Stem Cells; 2008.
79. Zhou Q. in vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte induced by fibroblast growth factors and bone morphological protein-4. Int J Biochem Cell Biol. 2007; 39: 1714-1721.
80. Tomizawa M, Toyama Y, Ito C, Toshimori K, Iwase K, Takiguchi M, et al. Hepatoblast-like cells enriched from mouse embryonic stem cells in medium without glucose, pyruvate, arginine, and tyrosine. Cell Tissue Res. 2008; 333: 17-27.
81. Basma H, Soto-Gutierrez A, Yannam GR, Liu L, Ito R, Yamamoto T, et al. Differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived hepatocytes. Gastroenterology. 2009; 136: 990-999.
82. Hay DC, Zhao D, Fletcher J, Hewitt ZA, McLean D, Urruticoechea-Uriguen A, et al. Efficient differentiation of hepatocytes from human embryonic stem cells exhibiting markers recapitulating liver development in vivo. Stem Cells. 2008; 26: 894-902.
83. Hay DC, Fletcher J, Payne C, Terrace JD, Gallagher RC, Snoeys J, et al. Highly efficient differentiation of hESCs to functional hepatic endoderm requires ActivinA and Wnt3a signaling. Proc Natl Acad Sci USA. 2008; 105: 12301-12306.
84. Hewitt NJ, Lechon MJ, Houston JB, Hallifax D, Brown HS, Maurel P, et al. Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. Drug Metab Rev. 2007; 39: 159-234.
85. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. Nat Biotechnol. 2008; 26: 101-106.
86. Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. Nat Protoc. 2007; 2: 3081-3089.
87. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell. 2007; 131: 861-872.