بررسی قابلیت تمایز سلول‌های بنیادی استحصال شده از بافت چربی اسب تحت تاثیر فاکتورهای رشد TGF-β3 و BMP-6 در شرایط آزمایشگاهی

میلاد شادمان[1*]، عباس ابویسانی[2]، حسام دهقانی[2]، احمدرضا راجی[3]

[1]دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، بخش علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

[2]بخش فیزیولوژی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی و موسسه بیوتکنولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

[3]بخش بافت شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

milad.shademan@gmail.com

چکیده

در دهۀ اخیر، جداسازی انواع سلول‌های بنیادی و استفاده از آنها در طب ترمیمی پزشکی و دامپزشکی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. بافت چربی بالغین به عنوان یک منبع بالقوه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی است که می‌توانند در مهندسی بافت و درمان بیماری‌های اسکلتی–عضلانی حیوان و انسان مورد استفاده قرار گیرند. از آنجایی که ترمیم طبیعی هر بافت با تقسیمات سلولی و رسیدن فاکتورهای هومورال و سلول‌های بنیادی به محل آسیب انجام می‌شود، بافت غضروفی به دلیل نداشتن عروق خونی این امکان را ندارد. بنابراین غضروف توانایی محدودی در ترمیم آسیب‌هایش دارد و این موضوع اهمیت سلول درمانی با استفاده از سلول های بنیادی در ترمیم غضروف را مورد تأکید بیشتر قرار می‌دهد. در مطالعه حاضر، هدف آن بود که قابلیت تمایزی سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی اسب به بافت غضروف به کمک فاکتورهای رشد مختلف مورد ارزیابی قرار گیرد. بعد از جداسازی ۳ گرم چربی از ناحیه گلوتئال دم سه رأس اسب ۳، ۶ و ۹ ساله و انتقال به آزمایشگاه، نمونه‌ها ریز و شسته شدند و پس از تجزیه آنزیمی با کلاژناز از صافی سلولی عبور داده شدند. محتویات به دست آمده، پس از سانتریفیوژ تا ۳ پاساژ کشت داده شدند. سلول های پاساژ سوم به مدت ۲۱ روز توسط سیستم کشت پلت و تحت تمایز غضروفی، در سه گروه کنترل، گروه پایه تمایز غضروفی بدون فاکتور رشد و گروه پایه تمایزی به همراه فاکتورهای رشد TGF-β3 و BMP-6 به میزان ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر قرار گرفتند. ارزیابی تمایز به غضروف با رنگ‌آمیزی اختصاصی و بررسی میکروسکوپیک ارزیابی شد. بعد از تمایز غضروفی، رنگ آمیزی با رنگ آلسین بلو نشان داد که به جز گروه کنترل، در سایر گروه‌ها رسوبات پروتئوگلیکان مختص بافت غضروفی وجود دارد. در رنگ آمیزی ماسون، رشته‌های کلاژن و ماتریکس خارج سلولی در هر دو گروه تمایزی (برخلاف گروه کنترل) مشاهده شد و در گروه دارای فاکتورهای رشد از انسجام بهتری برخوردار بود. در مجموع، نتایج نشان داد که فاکتورهای رشد TGF-β3 و BMP-6 میزان تمایز به غضروف را بهبود می‌بخشند.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، اسب، تمایز غضروف، TGF-β3، BMP-6.

مقدمه

امروزه با پیشرفت طب دامپزشکی، گسترش روشهای نوین درمانی، ظهور داروهای جدید و کاهش میزان وقوع بیماری های عفونی منجر به افزایش طول عمر مفید حیوانات شده است. با این وجود در بسیاری از بیماری‌ها از قبیل ضایعات نخاعی، تاندونی و عضلانی ساختارهای بافتی آسیب دیده به دلیل از دست رفت سلول‌ها و عدم جایگزینی آنها قابل ترمیم با روش-های معمول موجود امکان پذیر نمی‌باشد. لذا به منظور درمان این ضایعات و بازگرداندن عملکرد طبیعی اندام‌های آسیب دیده،

در سال های اخیر، طب ترمیمی با کمک روش سلول درمانی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. سلول‌های بنیادی، سلول‌های سوماتیکی تمایز نیافته ای هستند که قادرند تحت شرایط خاص به یکی از انواع سلول‌های بالغ و یا کاملا تمایز یافته تبدیل شوند(۱). سلول های بنیادی مشتق از بافت های مختلف، به ویژه سلول های بنیادی مزانشیمی نوید بزرگی در درمان بیماریهای ارتوپدی اسب به شمار می‌رود. در کنار مغز استخوان، بافت چربی نیز به عنوان منبع سلول‌های بنیادی مزانشیمی به فراوانی وجود دارد و نسبت به مغز استخوان، بیشتر در دسترس است(۴). به آسانی از بافت زیر جلد اخذ شده کمتر تهاجمی بوده و با درد کمتری برای بیمار همراه است(۲). بافت غضروفی فاقد عروق خونی و اعصاب است و تغذیه سلول های این بافت تنها از طریق انتشار مواد غذایی به درون بافت انجام می شود. از آنجا که ترمیم طبیعی هر بافت با تقسیمات سلولی آن بافت و رسیدن فاکتورهای هومورال و سلول های بنیادی یا اجدادی به محل آسیب انجام می شود و این امر به دلیل فقدان خونرسانی، در غضروف ممکن نیست؛ بنابراین غضروف توانایی محدودی در ترمیم آسیب ها را دارد. لذا در مطالعه حاضر هدف آن است که قابلیت تمایز سلول های بنیادی جدا شده از بافت چربی اسب به بافت غضروف مورد ارزیابی قرار می گیرد.

مواد و روش ها

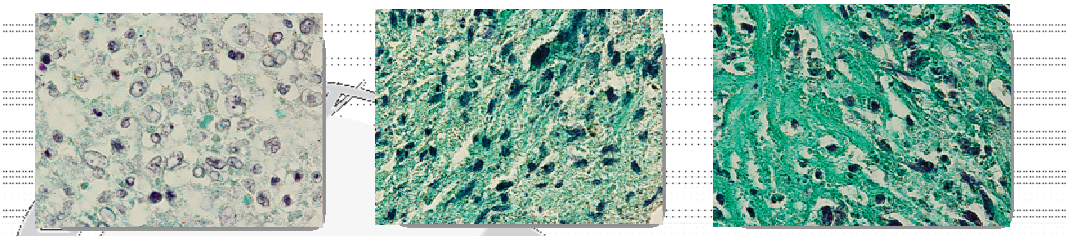
از ۳ رأس مادیان سالم دو خون که به ترتیب ۳، ۶ و ۹ ساله بودند استفاده شد. پس از دریافت نتایج متفاوت از لحاظ اندازه پلت‌های حاصله بین این سه اسب، اسب ۳ ساله جوان‌تر را که نتایج بهتری از لحاظ اندازه پلت داشت، انتخاب و سلول‌های فریز شده این اسب ذوب و بعد از ۳ پاساژ سلولی برای مراحل تمایز غضروفی آماده شدند. سلول‌های حاصل از پاساژ ۳ پس از شمارش سلولی به میزان ۵۰۰ هزار سلول در ۳ تیمار و ۸ تکرار به ۲۴ عدد فالکون ۱۵میلی لیتری انتقال داده شد. گروه‌ها شامل گروه کنترل با محیط کشت اولیه، گروه تیمار اول با محیط تمایز به غضروف که شامل محیط کشت اولیه به علاوه دگزامتازون، آسکوربیک اسید و انسولین ترانسفرین سلنیوم و فاقد فاکتورهای رشد بود و گروه دوم تیمار با محیط تمایز به غضروف به علاوه فاکتورهای رشد TGF-β3 و BMP-6 به میزان ۱۰ نانوگرم در هر میلی لیتر از هر کدام بود. هر سه روز یکبار محیط کشت پلت‌ها تعویض شده و پس از ۲۱ روز سلول‌ها جهت انجام آزمایشات بافت شناسی آماده شدند. بعد از خارج کردن محیط کشت تمایزی از روی نمونه ها، ۲ میلی لیتر از محلول فیکساتیو بوئن به مدت ۳ ساعت روی نمونه ریخته شد و در نهایت به منظور فیکس نمونه ۴–۵ ساعت در فرمالدهید قرار داده شد. مراحل فرآوری بافتی و تهیه بلوک انجام شد و بعد از برش زدن بلوک‌ها به قطر ۰/۵ میکرومتر، برش‌ها بر روی لام‌ها قرار گرفته و برای رنگ آمیزی هماتوکسیلین– ائوزین، آلسین بلو و ماسون آماده شدند. آلسین بلو جهت رنگ آمیزی گلوکز آمینو گلیکان‌ها (GAG) و ماسون جهت رنگ آمیزی رشته‌های کلاژن مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج و بحث

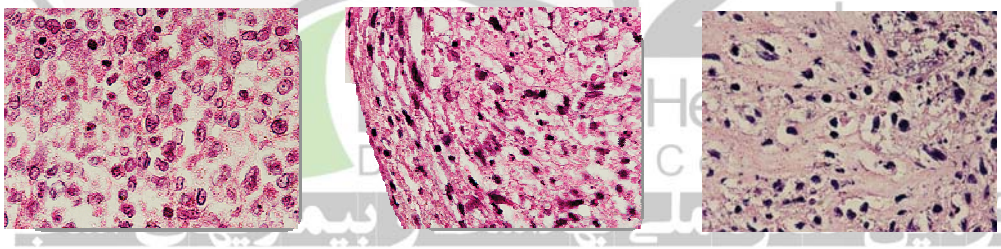
سلول‌های اولیه جدا شده از چربی به صورت کلونی‌های مجزا رشد کردند و مورفولوژی شبیه به فیبروبلاست داشتند. تمایز سلول‌های کشت شده در محیط القا کننده تمایز به مدت ۲۱ روز مورد تائید قرار گرفت که در حقیقت با تایید تولید ماتریکس غضروفی و به کمک رنگ پذیری اختصاصی بافت غضروفی مشخص شد. در رنگ آمیزی آلسین بلو، پلی ساکاریدهای اسیدی مانند گلیکوزآمینوگلیکان‌ها به رنگ آبی یا سبز آبی در آمده و هسته‌ها به رنگ آبی تیره تا سیاه دیده شدند (شکل ۱). در رنگ

آمیزی با ماسون رشته‌های کلاژن به رنگ سبز یا آبی در آمده و هسته ها به رنگ تیره دیده شدند (شکل ۲). این رنگ آمیزی در تشخیص سلول از موارد خارج سلولی موثر است. در رنگ هماتوکسیلین – ائوزین، هسته ها توسط هماتوکسیلین آبی و سیتوپلاسم و مواد خارج سلولی مانند کلاژن توسط ائوزین به رنگ صورتی یا قرمز در آمد (شکل ۳).Vidal و همکارانش بیان کردند که در پلت سلول های بنیادی بافت چربی اسب تحت تیمار تمایز به غضروف، برخلاف مغز استخوان، هیچ نشانه‌ای از تشکیل لاکونا و شکل گیری بافت غضروفی شفاف یا هیالن مشاهده نشد و بیشتر نمایی از بافت های نابالغ فیبروبلاستی دیده شد(۷)، ولی ما در این مطالعه حضور لاکونا و شکل گیری بافت غضروفی شفاف یا هیالن را در رنگ آمیزی های مختلف به خصوص هماتوکسیلین – ائوزین صورت پراکنده و در گروه حاوی فاکتورهای رشد مشاهده کردیم.

شکل ۱. رنگ آمیزی آلسین بلو. از چپ به راست گروه کنترل، تیمار غضروفی بدون فاکتور رشد، تیمار غضروفی بعلاوه فاکتورهای رشد TGF-β3 و BMP-6



شکل ۲. رنگ آمیزی ماسون. از چپ به راست گروه تیمار، تیمار غضروفی بدون فاکتور رشد، تیمار غضروفی بعلاوه فاکتورهای رشد TGF-β3 و BMP-6



شکل ۳. رنگ آمیزی H&E. از چپ به راست گروه تیمار، تیمار غضروفی بدون فاکتور رشد، تیمار غضروفی بعلاوه فاکتورهای رشد TGF-β3 و BMP-6

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به بافت مختلف فرآیندی چند مرحله‌ای با فعال شدن چندین مسیر سیگنالی، گروه هایی از فاکتورهای رونویسی، هورمون‌ها و فاکتورهای رشد است(۳). در مطالعات انسانی گزارش شده است که TGF-β و دگزامتازون برای تمایز به غضروف ضروری ولی در پیش برد تمایز به کندروسایت ها، کافی نیستند. همچنین مشاهده شد که BMP-6 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی سبب ارتقاء تمایز به غضروف در شرایط کشت پلت شده است(۵). Vidal در سال ۲۰۰۷ برای اولین بار قابلیت تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی اسب به سلول‌های بالغ چربی، استخوان و غضروف را توصیف نمود(۶). مطابق با نتایج ما سلول‌های بنیادی مزانشیمی استحصال شده از بافت چربی اسب توانایی سنتز ماتریکس خارج سلولی در فرم پروتئوگلیکان‌ها و گلیکیوزآمینوگلیکان ها را دارا بوده و انسجام بیشتر ماتریکس خارج سلولی در تیمار حاوی

فاکتورهای رشد بیشتر به چشم می خورد و این نتایج با کار Vidal و همکاران مطابقت دارد. اطلاعات اندک در زمینه توانایی تمایزی فاکتور BMP-6 در خارج از نمونه انسانی و بر روی اسب در تیمار تمایز غضروفی به همراه TGF-β3 و یا به تنهایی از دلایل انجام این طرح بود. در مجموع، نتایج نشان داد که فاکتورهای رشد TGF-β3 و BMP-6 میزان تمایز به غضروف را بهبود می‌بخشند. بافت چربی اسب شامل تعداد زیادی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارای ظرفیت های تمایزی و مهاجرتی قابل توجه است و همچنین منبع سلولی مناسبی برای طب ترمیمی آلوژنیک و اتوژنیک به شمار می آید. دسترسی آسان به این بافت، این سلول‌ها را به انتخاب مناسبی برای اهداف مهندسی بافت تبدیل کرده است که البته نیاز به مطالعات بیشتر پیش از استفاده بالینی از این سلول‌ها وجود دارد.

منابع

۱.Baksh D, S.L., Tuan RS., (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy.. Cell and Molecule Medicin. 301-316.

۲.Colleoni, S., Bottani, E., Tessaro, I., Mari, G., Merlo, B., Romagnoli, N., Spadari, A., Galli, C., Lazzari, G., (2009). Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor. Vet Res Commun 33, 811-821.

۳.Rehman, J., Traktuev, D., Li, J., Merfeld-Clauss, S., Temm-Grove, C.J., Bovenkerk, J.E., Pell, C.L., Johnstone, B.H., Considine, R.V., March, K.L., (2004). Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. Circulation 109, 1292-1298.

۴.Ribitsch, I., Burk, J., Delling, U., Geissler, C., Gittel, C., Julke, H., Brehm, W., (2010). Basic Science and Clinical Application of Stem Cells in Veterinary Medicine. Adv Biochem Eng Biotechnol 123, 219-263.

۵.Sekiya, I., Colter, D.C., Prockop, D.J., (200 .(۱BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. Biochemical and biophysical research communications 284, 411-418.

۶.Vidal, M.A., Kilroy, G.E., Lopez, M.J., Johnson, J.R., Moore, R.M., Gimble, J.M., (2007). Characterization of Equine Adipose Tissue-Derived Stromal Cells: Adipogenic and Osteogenic Capacity and Comparison with Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. Veterinary Surgery 36, 613-622.

۷.Vidal, M.A., Robinson, S.O., Lopez, M.J., Paulsen, D.B., Borkhsenious, O., Johnson, J.R., Moore, R.M., Gimble, J.M., (2008). Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow. Vet Surg 37, 713-724.