تاثیر سن بر توان تمایز به غضروف سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان اسب

محسن تقوی[1*]، عباس ابویسانی[2]، احمدرضا راجی[3]

۱*. دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی دانشگاه فردوسی مشهد.

۲. استادیار بخش فیزیولوژی دانشکده دامپزشکی و عضو گروه سلول‌های بنیادی پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه فردوسی مشهد.

۳. دانشیار گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد.

*mohsen.taghavi13@gmail.com

چکیده

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان اسب دارای توان تمایزی چندگانه از جمله تمایز به غضروف هستند و لذا می‌توانند در مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی مورد استفاده قرار گیرند. یکی از پرسش‌های اساسی که در راستای استفاده-های درمانی از این سلول‌ها مطرح می شود، تاثیر سن اسب بر قابلیت و توان تمایزی این سلول‌ها به غضروف است. به این منظور، نمونه‌های مغز استخوان از سه مادیان ۳، ۹ و ۱۰ ساله با کمک سوزن جمشیدی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی با روش گرادیان و سانتریفوژ جداسازی شدند و به منظور رشد، تکثیر وخالص سازی، تا رسیدن به مرحله پاساژ۳ در محیط کشت پایه و شرایط بهینه، کشت داده شدند. سپس به منظور تمایز سلول‌های پاساژ۳ به غضروف، این سلول‌ها به صورت ریزتوده، در محیط کشت القاکننده تمایز به غضروف که حاوی مکمل TGF-β3 بود، به مدت ۲۱ روز و در شرایط بهینه کشت داده شدند. محیط کشت گروه کنترل همان محیط پایه اولیه کشت سلول درنظرگرفته شد. پس از طی این مدت، تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به غضروف در محیط القایی و عدم تمایز در گروه کنترل، با رنگ‌آمیزی ماسون تایید شد و تمام ریزتوده‌های کشت داده شده (پلت سلولی) به کمک میکروسکوپ اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد که کلیه پلت‌های سلولی کشت داده شده در محیط تمایزی در مقایسه با پلت‌های سلولی کشت داده شده در محیط کنترل، بزرگ‌تر بودند. همچنین بررسی اندازه توده‌های سلولی نشان داد که توده‌های سلولی تمایز یافته مربوط به مادیان جوان (۳ ساله) نسبت به اسب‌های مسن‌تر (۹ و ۱۰ سال)، بزرگ‌تر بودند. بنابراین، بر اساس یافته‌های این مطالعه به نظر می‌رسد که افزایش سن اسب باعث کاهش توان تمایز به غضروف در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان می‌شود.

کلمات کلیدی: اسب، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، مغز استخوان، سن، تمایز به غضروف.

مقدمه

یکی از شایع‌ترین مشکلاتی که برای اسب‌های مسابقه رخ می‌دهد، آسیب‌های تاندونی، لیگامنتی و غضروفی است. بافت غضروف فاقد عروق خونی واعصاب است و توان محدودی در جهت ترمیم آسیب‌ها دارد. بنابراین دستیابی به منابع سلولی دیگر برای طراحی بافت غضروف و پیوند آن جهت درمان ضایعات این بافت ضروری است. با عنایت به ضرورت ترمیم ضایعات و بازگشت اسب به مسابقه، روش سلول درمانی مهم و ضروری به نظر می‌رسد؛ چرا که مطالعات نشان داده است که روش‌های مرسوم درمان آسیب‌های مفصلی اسب، از جمله درمان دارویی، برداشت بافت ضایعه دیده و لاواژ مفصل،

آرتروسکوپی، جراحی و آرتروپلاستی سایشی، نه تنها به ترمیم بافت کمک نمی کند، بلکه ممکن است موجب تشکیل بافت فیبروز و تخریب بافت طبیعی شود (۱). سلول‌های بنیادی مشتق شده از مغز استخوان، از دسته سلول های بنیادی بالغ و پرتوان هستند که قابلیت تکثیر بالایی دارند و می‌توانند در شرایط In vivo و In vitro به انواعی از سلول‌ها، از جمله استئوبلاست، کندروسایت و آدیپوسایت تمایز یابند (۲، ۳، ۴). انجام مطالعات بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسانی اثبات کرد که بافت غضروف می‌تواند از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان حاصل شود (۵). نقش موثری که پتانسیل تمایزی چندگانه سلول‌های بنیادی مزانشیمی اسب، در روند بهبود آسیب‌های استخوانی، تاندونی و لیگامنتی دارد، باعث شده است که این سلول‌ها به منظور تحقیقات بنیادی و برای اهداف درمانی بیماری‌های عضلانی – اسکلتی در اسب مورد توجه قرار گیرد (۶). در بین القاکننده‌های غضروف ساز، اعضای خانواده فاکتورهای رشد تغییرشکل دهنده بتا (Transforming Growth Factor-ß) از اهمیت خاصی برخوردارند (۷). TGF-βیک فاکتور رشد ضروری برای تقویت غضروف سازی در هر دو حالت *in vitro* و *in vivo* است (۵، ۸). علاوه بر نوع فاکتورهای القاکننده غضروف‌سازی، عواملی ازجمله منشأ استحصال سلول‌های بنیادی مزانشیمی و سن اسبی که این سلول‌ها از آن استحصال می شوند، در میزان تمایز نقش بسزایی دارند. لذا هدف از مطالعه حاضر، آن است که تأثیر سن بر روی تمایز به غضروف سلول های بنیادی مزانشیمی استحصال شده از مغز استخوان اسب در پاسخ به فاکتور رشد TGF-β3 مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش ها

نمونهٔ مغز استخوان سه رأس مادیان دو خون ۳، ۹ و ۱۰ ساله با استفاده از سوزن جمشیدی اخذ شد. با استفاده سانتریفوژ و به کمک گرادیان غلظتی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی استحصال و در محیط کشت پایه تا پاساژ سوم کشت داده شدند. محیط کشت‌های مورد استفاده در این مطالعه، شامل محیط کشت پایه و محیط کشت القایی تمایز به غضروف بودند. محیط کشت پایه حاوی DMEM high glucose به همراه ۱۰٪ FBS، ۱٪ پنی سلین/استرپتومایسین، ۰/۱٪ آمفوتریسین B بود. محیط کشت القایی تمایز به غضروف شامل محیط پایه همراه با دگزامتازون به میزان ۰/۱ µM، دی فسفو ال–آسکوربیک اسید تری سدیم به میزان ۵۰µM، Insulin-Transferrin-Selenium (ITS) به میزان ۱٪، آلبومین سرم گاوی به میزان ۱ میلی‌گرم، فاکتور رشد نوترکیب TGF-β3انسانی به میزان ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر بود. سلول‌های پاساژ ۳ هریک از اسب‌ها، به تعداد ۵۰۰ هزار سلول به دو لوله فالکون منتقل و به کمک سانتریفیوژ به صورت ریز توده (micromass) درآمدند. در هر لوله ۲ میلی لیتر محیط کشت پایه افزوده شد و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط بهینه فوق الذکر در انکوباتور نگهداری شدند. پس از ۲۴ ساعت، یک ریزتوده به عنوان کنترل (حاوی محیط کشت پایه) و ریزتوده دیگر تحت تیمار تمایز به غضروف (محیط کشت القایی تمایز به غضروف) قرار گرفتند. کشت توده‌ها (در دو تکرار برای هر اسب) برای مدت ۲۱ روز در انکوباتور ادامه یافت و محیط کشت هر ۴ روز یکبار تعویض و محیط کشت تازه در اختیار ریزتوده‌های سلولی قرار داده می‌شد. پس از اتمام دورهٔ کشت (۲۱ روز)، به منظور اندازه گیری ابعاد، ریز توده‌ها از محیط کشت های مذکور خارج و در محلول PBS قرار گرفتند. به علت کروی بودن ریز توده‌ها، بزرگ‌ترین قطرهای هریک از آن‌ها توسط میکروسکوپ مدرج اندازه گیری شد. پس از آن به منظور تهیه مقاطع بافتی از ریزتوده‌ها، با استفاده از محلول‌های آب– الکلی مناسب آبگیری شدند و پس از طی مراحل معمول، در پارافین مذاب غوطه‌ور شدند و در نهایت از ریزتوده ها بلوک پارافینی و مقاطع میکرونی تهیه شد و رنگ آمیزی ماسون انجام شد.

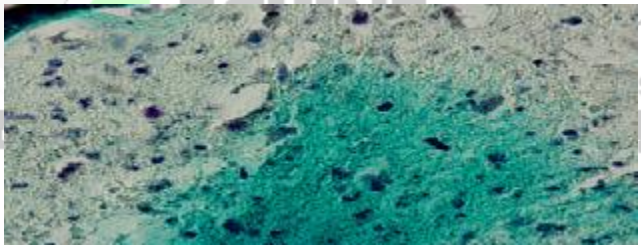
نتایج و بحث

ریزتوده ها پس ۲۱ روز که تحت شرایط کشت با محیط پایه (گروه کنترل) و با محیط القایی تمایز به غضروف (گروه القای تمایز به غضروف)بودند، توسط میکروسکوپ نوری مدرج رویت و ابعاد بزرگ‌ترین قطر آنها اندازه‌گیری شد که میانگین آنها به شرح جدول ذیل ثبت شد (جدول ۱).

جدول ۱. میانگین اندازه ریزتوده‌ها پس از پایان دوره کشت ۲۱ روزه. در هر گروه از هر اسب دو تکرار وجود داشت.

تیمار / اسب	گروه کنترل (محیط کشت پایه)	گروه القای تمایز به غضروف (محیط کشت القایی تمایز به غضروف)
اسب ۳ ساله	۴۷۵ میکرومتر	۸۶۲ میکرومتر
اسب ۹ ساله	۵۱۳ میکرومتر	۶۱۲ میکرومتر
اسب ۱۰ ساله	۴۱۲ میکرومتر	۶۵۰ میکرومتر

با استفاده از رنگ‌آمیزی ماسون، تمایز سلول‌ها به سمت غضروف مورد تایید قرار گرفت، چرا که رنگ ماسون باعث رنگ گرفتن رشته‌های کلاژن تشکیل شده می‌شود (شکل ۱). نتایج نشان داد که ریزتوده‌های کشت داده شده هر اسب در محیط کشت القایی تمایز به غضروف، نسبت به ریزتوده‌های کشت داده شده در محیط کشت پایه رشد بیشتری داشته‌اند. همچنین مقایسهٔ ریز توده‌های مربوط به ۳ اسب در محیط کشت القایی تمایز به غضروف نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان مربوط به اسب جوان‌تر (۳ساله) نسبت به مسن‌تر (۹ و ۱۰ ساله)، پاسخ بهتری داده و رشد بهتری داشته‌اند.



شکل ۱. رنگ‌آمیزی ریزتوده‌ها با رنگ ماسون. رشته‌های کلاژنی تنها در گروه القای تمایز به غضروف شکل گرفتند که با رنگ آمیزی ماسون، رنگ سبز را گرفته‌اند و در تصویر مشخص هستند (گروه تیمار).

سیگنال TGF-β از طریق باند شدن این فاکتور با گیرنده TGF-β RI فعال می‌شود که در نهایت منجر به فسفریلاسیون گیرنده های TGF-β RII در سلول‌های بنیادی مزانشیمی شده و در نتیجه موجب فعال شدن مسیرهای زنجیره‌ای وابسته به Smad و یا مستقل از Smad می‌شود. نشان داده شده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت داده شده در تراکم بالای سلولی در محیط کشت خالی از سرم، در حضور TGF-βها امکان غضروفی شدن را داشته و TGF-β3 نسبت به TGF-β1 موجب تجمع بیشتر گلیکوزآمینوگلیکان‌ها (مشخصه بافت غضروف) می‌شود (۹). با استناد به یافته‌های این مطالعه، می‌توان نتیجه گرفت که شاید افزایش سن اسب باعث کاهش توان تمایز به غضروف سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از مساعدت جناب آقای پورادیبی در تهیه مقاطع بافتی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

Tew SR, Kwan APL, Hann A, Thomson BM, Archer CW (2000). The reactions of articular cartilage to experimental wounding: Role of apoptosis. Arthritis and Rheumatism, 43, 215-225.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science, 284:143-147.

Wobus A, Boheler K, Beyer Nardi, N, Silva Meirelles L (2006). Mesenchymal Stem Cells: Isolation, In Vitro Expansion and Characterization. Stem Cells. Springer Berlin Heidelberg, 249-282.

Kolf CM, Cho E, Tuan RS (2007). Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. Arthritis Research & Therapy, 9: 204.

Indrawattana N, Chen G, Tadokoro M, Shann LH, Ohgushi H, Tateishi T, Tanaka J, Bunyaratvej A (2004). Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. Biochemical and Biophysical Research Communications, 320:914-919.

Del Bue M, Ric S, Ramoni R, Conti V, Gnudi G, Grolli S, (2008). Equine adipose-tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: Their association in vitro and in vivo. Veterinary Research Communications, 32:S51-S55.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Molecular Biology of the Cell 13:4279-4295.

Sekiya I, Colter DC, Prockop DJ (2001). BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 284:411-418.

Docheva D, Haasters F, Schieker M (2008). Mesenchymal stem cells and their cell surface receptors. Current Rheumatology Reviews, 4:155-160.