تاثیر TGF-β_3 در افزایش توان تمایز به غضروف سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان اسب

عباس پرهام*[۱،۲]، محسن تقوی[۳]، احمدرضا راجی[۴]

[۱] استادیار، بخش فیزیولوژی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

[۲] گروه پژوهشی سلول‌های بنیادی و رویانی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

[۳] دانشجوی دکتری فیزیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

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

Parham@um.ac.ir

چکیده

جداسازی انواع سلول‌های بنیادی و تمایز آزمایشگاهی آن‌ها به منظور استفاده در طب ترمیمی پزشکی و دامپزشکی بسیار مورد توجه قرارگرفته است. مغز استخوان بالغین به‌عنوان یک منبع بالقوه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی است که می‌توانند در مهندسی بافت و درمان بیماری‌های اسکلتی- عضلانی حیوان و به ویژه اسب مورداستفاده قرار گیرند. در این مطالعه، هدف این بود که قابلیت تمایز به غضروف سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداشده از مغز استخوان اسب در پاسخ به فاکتور رشد TGF-β_3 در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گیرد. بدین منظور، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان یک رأس مادیان ۶ ساله اخذ شد و تا پاساژ سوم رشد داده شد. تعداد ۵۰۰ هزار سلول، با سیستم کشت میکروپلت به مدت ۲۱ روز در گروه‌های مختلف شامل: ۱) گروه کنترل واجد محیط کشت پایه معمول، ۲) گروه واجد محیط کشت پایه تمایز به غضروف و فاقد فاکتور رشد و ۳) گروه واجد محیط کشت پایه تمایز به غضروف به همراه فاکتور رشد TGF-β_3 به میزان ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر تحت شرایط تمایز به غضروف قرار گرفتند.

وضعیت تمایز به غضروف با بررسی بیان ژن‌های اختصاصی غضروف شامل اگرکان و کلاژن نوع ۲ مورد ارزیابی قرار گرفت. بیان ژن اگرکان به جز گروه کنترل در دو گروه دیگر مورد تأیید قرار گرفت. لیکن بیان ژن کلاژن نوع ۲ تنها در گروه حاوی فاکتور رشد TGF-β_3 مشاهده شد. این نتایج نشان داد که هرچند سلول‌های بنیادی

مزانشیمی استحصال‌شده از مغز استخوان اسب در محیط کشت معمول تمایز به غضروف نیز روند تمایزی خود را طی می نمایند، لیکن افزوده شدن فاکتور رشد TGF-β_3 به آن میزان تمایز آنها به غضروف را بهبود می بخشد.

کلمات کلیدی

تمایز به غضروف، سلول های بنیادی مزانشیمی، اسب، TGF-β_3

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 مناسب برای تهیه 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 پایدار 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 مطلوبی دارند و می‌توانند در شرایط *In vivo* و *In vitro* به انواعی از سلول‌ها، از جمله استئوبلاست، کندروسیت و آدیپوسیت 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 گیرند (۶). در بین القاکننده‌های غضروف ساز، اعضای خانواده فاکتورهای رشد تغییرشکل دهنده بتا (Transforming Growth Factor-ß) از اهمیت خاصی برخوردارند (۷). خانواده TGF-β یک فاکتور رشد ضروری برای تقویت غضروف سازی در هر دو حالت *in vitro* و *in vivo* است و بیش از سایر فاکتورها در این زمینه مورد بررسی و تحقیق قرار گرفته است (۵، ۸، ۹). لذا هدف از مطالعه حاضر،

بررسی امکان تمایز به غضروف سلول‌های بنیادی مزانشیمی استحصال شده از مغز استخوان اسب در پاسخ به فاکتور رشد TGF-β_3 در شرایط آزمایشگاهی بود.

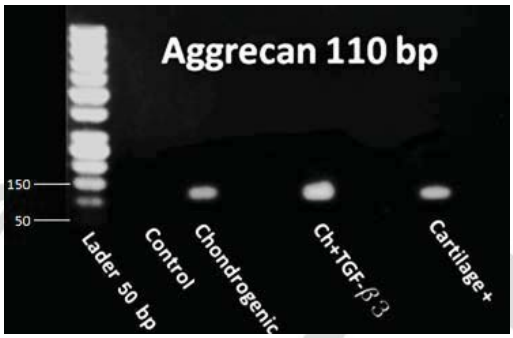
مواد و روش ها

نمونهٔ مغز استخوان یک رأس مادیان دو خون ۶ 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، مشتمل بر سه نوع محیط کشت شامل ۱) محیط کشت پایه معمول، ۲) محیط کشت پایه تمایز به غضروف و ۳) محیط کشت تمایز به غضروف دارای فاکتور رشد TGF-β_3 بودند. محیط کشت پایه حاوی DMEM- high glucose به همراه ۱۰٪ FBS، ۱٪ پنی سلین/استرپتومایسین و 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 ۵۰ µM، Insulin-Transferrin-Selenium (ITS) به میزان ۱٪ و آلبومین سرم گاوی به میزان ۱ میلی‌گرم بود. سومین نوع محیط کشت این مطالعه با افزودن فاکتور رشد نوترکیب TGF-β3 انسانی به میزان ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر به محیط کشت القایی تمایز به غضروف تهیه شد. پس از پایان پاساژ سوم، تعداد ۵۰۰ هزار سلول به هریک از لوله های فالکون منتقل و به کمک سانتریفیوژ به صورت ریز توده (micromass) درآمدند؛ به طوری که در مجموع ۴۵ ریز توده در لوله های مجزا به دست آمد. در هر لوله ۲ میلی لیتر محیط کشت پایه افزوده شد و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط بهینه در انکوباتور نگهداری شدند. پس از طی ۲۴ ساعت، ریز توده ها در سه گروه آزمایشی، بر اساس نوع محیط کشت های فوق الذکر تقسیم بندی شدند به طوری که در هر گروه ۱۵ ریز توده قرار گرفت. کشت توده‌ها در محیط های مذکور برای مدت ۲۱ روز در انکوباتور ادامه یافت و محیط کشت‌ها هر ۴ روز یکبار تعویض و محیط کشت تازه در اختیار ریزتوده‌های سلولی قرار داده شد. پس از اتمام دورهٔ کشت (۲۱ روز)، به منظور بررسی کیفی وضعیت تمایز به غضروف در گروه های مذکور با استفاده از روش RT-PCR، ریز توده‌ها از محیط کشت های مذکور خارج شدند و ۵ عدد ریز توده از هر گروه آزمایشی هموژنیزه شد و به ترتیب مراحل استخراج RNA تام و ساخت DNA مکمل (cDNA) برای آنها انجام شد. جهت تایید صحت انجام مراحل آنالیز ملکولی، از یک نمونه کنترل مثبت (غضروف طبیعی اسب) نیز استخراج RNA و ساخت cDNA انجام گرفت. سپس به طور همزمان واکنش های زنجیره ای پلیمراز برای تمامی گروه های سه‌گانه و کنترل مثبت با استفاده از پرایمرهای

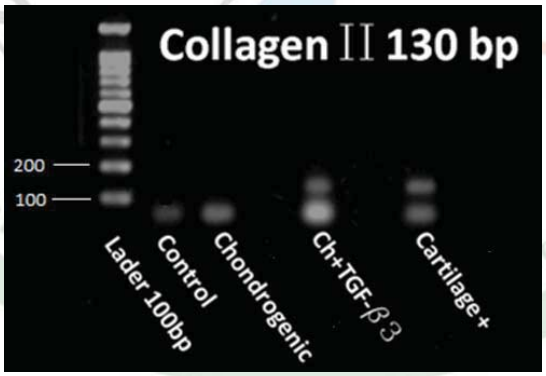
ژن اگرکان و ژن کلاژن نوع ۲ (ژن های اختصاصی بافت غضروف) انجام شد. در نهایت محصولات حاصل از واکنش RT-PCR با استفاده از ژل الکتروفورز بررسی شدند.

نتایج

پس از تأیید صحت مراحل استخراج RNA و سنتز cDNA از ریزتوده های غضروفی با استفاده از ژن خانه دار، بررسی کیفی بیان ژن اگرکان و کلاژن نوع ۲ با طی مراحل ذکر شده در تیمارهای سه گانه و نمونه کنترل مثبت صورت گرفت و محصولات حاصل از آن‌ها بر روی ژل الکتروفورز رانده شد. نوار حاصل از تکثیر توالی اگرکان و کلاژن نوع ۲، به ترتیب قطعه ای معادل ۱۱۰ و ۱۳۰جفت باز تولید کرد. وضعیت بیان ژن اگرکان و کلاژن نوع ۲ در تیمارهای سه گانه و غضروف طبیعی در نگاره ۱ و۲ نشان داده شده است.



نگاره ۱: الکتروفورز محصولات حاصل از تکثیر cDNA با پرایمر اختصاصی اگرکان. بارگذاری چاهک‌ها از چپ به راست: شاخص ۵۰ جفت بازی؛ گروه Control (کشت ۲۱ روزه در محیط کشت پایه)؛ گروه Chondrogenic (کشت ۲۱ روزه در محیط کشت تمایز به غضروف)؛ گروه Ch+TGF-β_3 (کشت ۲۱ روزه در محیط کشت تمایز به غضروف به همراه فاکتور رشد TGF- β_3)؛ +Cartilage نمونه غضروف طبیعی.



نگاره۲: الکتروفورز محصولات حاصل از تکثیر cDNA با پرایمر اختصاصی کلاژن نوع ۲. ترتیب بارگذاری چاهک‌ها از چپ به راست: شاخص ۱۰۰ جفت بازی؛ گروه Control (کشت ۲۱ روزه در محیط کشت پایه)؛ گروه Chondrogenic (کشت ۲۱ روزه در محیط کشت تمایز به غضروف)؛ گروه Ch+TGF-β_3 (کشت ۲۱ روزه در محیط کشت تمایز به غضروف به همراه فاکتور رشد TGF- β_3)؛ +Cartilage نمونه غضروف طبیعی.

بحث و نتیجه گیری

پس از کشت ۲۱ روزه، بیان ژن اگرکان در گروه کنترل مشاهده نشد اما در دو گروه تمایزی مورد تأیید قرار گرفت. با توجه به بارزتر بودن باند مربوط به اگرکان در گروه حاوی فاکتور رشد TGF-β_3 و مشابهت آن با گروه کنترل مثبت، به نظر می‌رسد که میزان بیان ژن اگرکان در این گروه در مقایسه با گروه تمایزی فاقد فاکتور رشد بیشتر بوده است (نگاره۱). ژن کلاژن نوع ۲، به‌عنوان ژن اختصاصی دیگر بافت غضروف فقط در گروه کنترل مثبت و گروه تمایزی حاوی فاکتور رشد TGF-β_3 مشاهده شد و در گروه تمایزی فاقد فاکتور رشد و گروه کنترل مشاهده نشد (نگاره۲).

در مطالعات انسانی نشان داده شده است که سلول های بنیادی مزانشیمی کشت داده شده درحضور خانواده TGF-β امکان غضروفی شدن را داشته و TGF-β_3 نسبت به TGF-β_1 منجر به تجمع بیشتر گلیکوزآمینوگلیکان-ها می‌شود. سیگنال TGF-β از طریق باند شدن با گیرنده نوع یک TGF-β فعال می‌شود که درنهایت منجر به فسفریلاسیون گیرنده نوع ۲ شده و در نتیجه فعال شدن مسیر وابسته به Smad و یا واکنش‌های زنجیره‌ای مستقل از Smad را به دنبال دارد (۱۰). با استناد به یافته‌های این مطالعه، می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان اسب در شرایط کشت در محیط استاندارد و معمول تمایز به غضروف قابلیت تمایز به غضروف را دارا هستند اما در حضور فاکتور رشد TGF-β_3 این قابلیت تقویت می شود. لذا با توجه به ظرفیت تمایز به غضروف سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان اسب در حضور فاکتورهای رشد مناسب، می توان از این سلول ها به‌عنوان منبع مناسبی در طب ترمیمی و درمان آسیب های مفصلی استفاده کرد.

منابع

1. 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.
2. 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.

3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Zuk PA. The intracellular distribution of the ES cell totipotent markers OCT4 and Sox2 in adult stem cells differs dramatically according to commercial antibody used. Journal of cellular biochemistry. 2009;106(5):867-77.
10. Docheva D, Haasters F, Schieker M (2008). Mesenchymal stem cells and their cell surface receptors. Current Rheumatology Reviews, 4:155-160.