JSST Journal of Space Science and Technology

Vol. 15 / Issue 4 / 2022 / (No. 54)
Print ISSN: 2008-4560 / Online ISSN: 2423-4516
https://doi.org/10.30699/jsst.2023.1334

OPEN ACCESS

Pages: 89-96 / Research Paper / Received: 07 February 2021 / Revised: 21 September 2021 / Accepted: 21 September 2021

Journal Homepage: https://jsst.ias.ir

Study of the Effect of the Microgravity on the Expression of Angiogenesis Marker in Endothelial Progenitor Cells

Vajihe Zarrinpour[1] and Zahra Hajebrahimi[2*]

1. Assistant Professor, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran
2. Associate Professor, Aerospace Research Institute, Ministry of Science, Research and Technology, Tehran, Iran

*****Corresponding Author's E-Mail: hajebrahimi@ari.ac.ir

Abstract

A study of the effect of microgravity on the endothelial progenitor cells is useful both in understanding cardiac changes in astronauts and in using microgravity as angiogenic stimuli. The aim of the present study was to investigate the effect of microgravity on VEGFR-2 and CD34 angiogenesis markers. Following extraction of progenitor cells from peripheral blood and its confirmation, gene expression was assessed by real-time PCR, and cell viability was assessed by MTT assay. The extracted cells were endothelial progenitor cells in terms of shape and surface markers CD31 and CD144. Microgravity increased the VEGFR-2 gene expression by 3.5 times after 24 hours. CD34 expression increased by 50% after 3 h but reached control level after 24 hours. Microgravity appears to have a positive effect on the expression of angiogenic markers and stimulation of endothelial progenitor cells, and it may be used as a new environment to differentiate these cells into blood vessels and to treat heart disease..

Keywords: Endothelial progenitor cells, Microgravity, Angiogenesis marker

COPYRIGHTS
© 2022 by the authors. Published by Aerospace Research Institute. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

How to cite this article:
V. Zarrinpour and Z. Hajebrahimi, "Study of the Effect of the Microgravity on the Expression of Angiogenesis Marker in Endothelial Progenitor Cells," *Journal of Space Science and Technology*, Vol. 15, No. 4, pp. 89-96, 2022 (in Persian), https://doi.org/10.30699/jsst.2023.1334.

JSST
علوم و فناوری فضایی
دوره ۱۵ / شماره ۴ / ۱۴۰۱ / (پیاپی ۵۴)
شاپای چاپی: ۴۵۶۰-۲۰۰۸ / شاپای الکترونیکی: ۴۵۱۶-۲۴۲۳
https://doi.org/10.30699/jsst.2023.1334
ص. ص. ۹۶-۸۹ / مقاله علمی- پژوهشی / دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۱۹ / بازنگری: ۱۴۰۰/۰۶/۳۰ / پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۳۰
Journal Homepage: https://jsst.ias.ir

مطالعه اثر بی‌وزنی بر بیان مارکرهای رگزایی در سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال

وجیهه زرین پور[۱] و زهرا حاج‌ابراهیمی[۲]*

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران
۲- پژوهشگاه هوافضا، وزارت علوم تحقیقات و فناوری، تهران، ایران

*ایمیل نویسنده مخاطب: hajebrahimi@ari.ac.ir

چکیده

مطالعه تاثیر بی‌وزنی بر سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال، هم در فهم تغییرات قلبی در فضانوردان، و هم در استفاده از بیوزنی به عنوان محرکی برای رگزایی به منظور سلول‌درمانی بیماری‌های قلبی موثر است. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر بی‌وزنی بر مارکر رگزایی VEGFR- 2 و CD34 بود. پس از استخراج سلول‌های پیش‌ساز از خون محیطی و تایید آن، بیان ژن‌ها با روش real-time PCR و زنده‌مانی سلول‌ها با روش MTT بررسی شد. سلول‌های استخراج شده از لحاظ شکل و شاخص‌های سطحی CD31و CD144 پیش‌ساز اندوتلیال بودند. بی‌وزنی منجر به افزایش ۳/۵ برابری ژن VEGFR- 2 پس از ۲۴ ساعت شد. بیان CD34 ۵۰٪ پس از ۳ ساعت افزایش یافت اما پس از ۲۴ ساعت به سطح کنترل رسید. به نظر می‌رسد بی‌وزنی تاثیر مثبت بر بیان مارکرهای رگزایی و تحریک سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال دارد و ممکن است بتوان از آن به عنوان محیطی جدید برای تمایز این سلول‌ها به عروق خونی و سلول درمانی بیماری‌های قلبی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال، بی‌وزنی، مارکر رگزایی

مقدمه

تا همین اواخر دانشمندان گمان می‌کردند که تمایز سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال به سلول‌های اندوتلیالی یا فرایند رگزایی تنها در دوران جنینی اتفاق می‌افتد[۱، ۲]. گزارشات اخیر حاکی از این است که نشان داده است که خون محیطی در افراد بالغ حاوی سلول‌های مشتق شده از مغز استخوان می‌باشد که خصوصیات آنها شبیه به آنژیوبلاست‌ها در جنین است. مطالعات نشان داده است که این سلول‌ها توانایی تکثیر و تمایز به سلول‌های اندوتلیال بالغ را دارند و سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال (Endothelial progenitor cell=EPC) خوانده می‌شوند، بنابراین مشخص شد که فرایند رگزایی در بزرگسالان نیز اتفاق می‌افتد [۳].

سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال قابلیت باز گرداندن عملکرد از دست رفته را به اندام‌هایی‌که دچار ایسکیمی شده‌اند دارند. همچنین آن‌ها در فرایند ترمیم زخم‌ها شرکت می‌کنند. این سلول‌ها، فعالیت‌های فوق را از طریق القای رگزایی و یا از طریق بازسازی مجدد سلول‌های اندوتلیال در عروقی که دچار آسیب شده‌اند انجام می‌دهند [۴]. محققان نشان دادند که تزریق کرونری سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال در بیمارانی که دچارسکته قلبی شده‌اند،منجر به اصلاح جریان خون در عروق می‌شود و وسعت ناحیه‌ای که دچار سکته شده است بعد از گذشت سه ماه کاهش می‌یابد. همچنین تزریق این سلول‌ها منجر به اصلاح حرکات دیواره قلب در ناحیه اسیب دیده می‌شود[۵].

شواهد همچنین از مهاجرت اختصاصی EPC ها به ناحیه توموری و شرکت در رگ‌زایی تومورها حکایت می‌کند. این خاصیت EPC سبب شده تا از آن‌ها به عنوان ناقل‌های سلولی برای درمان سرطان استفاده شود [۶]. این‌که تا چه حد سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال به عروق طبیعی کارامد و دارای پیامدهای عملکردی تبدیل می‌شود، هنوز به طور روشن

۱. استادیار
۲. دانشیار

COPYRIGHTS
© 2022 by the authors. Published by Aerospace Research Institute. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

مشخص نشده است. با این حال روش بازساخت عروقی به کمک سلول‌های بنیادی مغز استخوان سلول‌های پیش‌ساز، یکی از استراتژی‌های درمانی امیدوارکننده برای ترمیم ماهیچه قلبی در بیماری‌های قلبی- عروقی است [۳].

سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیوم دارای خواص سلول‌های بنیادی نیز هستند و همانند سلول‌های بنیادی توانایی تمایز به دیگر رده‌های سلولی چون عضله قلبی، عضله صاف و سلول‌های اندوتلیال هستند. ازآنجا که امروزه تمایز سلول‌های بنیادی به بافت‌های مختلف در شرایط بی‌وزنی بسیار مورد توجه می‌باشد؛ تعیین ویژگی‌های این سلول‌ها در شرایط نبود جاذبه می‌تواند جهت سلول درمانی و استفاده از آن‌ها در مهندسی بافت و ارگان در شرایط بی‌وزنی اطلاعات ارزشمندی را در اختیار ما قرار دهد. کشت بافت در فضا و شرایط بی‌وزنی در مقایسه با زمین، منجر به تولید میزان بیشتر بافت و بافت‌های بزرگ‌تر می‌گردد که این امر در زیست‌فناوری اهمیت ویژه‌ای دارد. بر روی زمین و در شرایط جاذبه، سلول‌ها در ظروف کشت در سطح دوبعدی رشد می‌کنند. در شرایط بی‌وزنی به دلیل ته‌نشین نشدن، سلول‌ها به‌صورت سه‌بعدی رشد کرده و تشکیل بافت سه‌بعدی می‌دهند. این امر در پزشکی و برای مهندسی بافت و تشکیل بافت برای پیوند اعضا و درمان بسیاری از بیماری‌ها سودمند است. امروزه بخش عظیمی از تحقیقات ناسا به مهندسی بافت در شرایط بی‌وزنی اختصاص یافته است [۷]. مطالعات زیادی گزارش کرده‌اند که یکی از عوامل اختلال در فعالیت قلب در فضانوردان، اختلال در سلول‌های اندوتلیال رگ‌ها می‌باشد. همچنین گزارشات حاکی از تغییر در شکل و بیان ژن‌های سلول‌های اندوتلیال در محیط جاذبه صفر است. همچنین، مشخص شده‌است که استراحت در بستر و بی‌تحرکی فیزیکی موجب تخریب سلول‌های اندوتلیال می‌شود[۸]. مطالعات اخیر نشان داده است که بی‌وزنی منجر به اتوفاژی در سلول‌های اندوتلیال عروق و افزایش آپوپتوز در سلول‌های اندوتلیال ریزرگ‌ها می‌شود [۹] بنابراین مطالعه سلول‌های EPC در شرایط بی‌وزنی هم در شناخت مشکلات قلبی عروقی فضانوردان و هم در کاربرد این سلول‌ها در مهندسی بافت و ارگان و سلول‌درمانی بر روی زمین برای محققین موثر است. هدف از مطالعه حاضر مطالعه تاثیر جاذبه ناچیز شبیه‌سازی شده توسط دستگاه کلینواستت بر بیان ژن‌های مارکر رگزایی VEGFR- 2 و CD 34 در سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال می‌باشد. ژن VEGFR- 2 یکی از رسپتورهای فاکتور رشد در سلول‌های اندوتلیال رگ‌ها می‌باشد و نخستین مارکری است که در زمان تمایز سلول‌های اندوتلیال بیان می‌شود [۱۰]. سلول‌های بنیادی جنینی که این ژن را بیان می‌کنند به سلول‌های اندوتلیال تمایز پیدا می‌کنند [۱۱، ۱۲]. سلول‌های اندوتلیال مولکول CD 34 را در مراحل اولیه رگزایی بیان می‌کنند. واسکولوژنزیز یکی از فرایندهای تولید عروق خونی است که طی آن عروق خونی از سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال تولید می‌گردد[۶].

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال

پژوهش حاضر در آزمایشگاه زیست-پزشکی فضایی، پژوهشگاه هوافضا انجام شد. خون محیطی از فرد داوطلب سالم و بدون سابقه وجود بیماری قلبی صورت گرفت و به لوله کشت ml ۵۰ حاوی محلول ضد انعقادی هپارین منتقل شد. سپس خون جداشده، توسط محلول PBS (با نسبت ۱:۱) رقیق شد. هر ۳۵ میلی لیتر از خونی که رقیق شده بود به‌آرامی بر روی ۱۵ میلی لیتر فایکول در یکلوله کشت جدید منتقل شد و سپس در دور g ۷۵۰ و در دمای محیط به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. بعد از اتمام سانتریفیوژ ۴ فاز در لوله تشکیل می‌گردد که از بالا به پایین شامل سرم، سلول‌های تک‌هسته‌ای خون، فایکول و گلبول‌های قرمز خون می‌باشد. سلول‌های تک‌هسته‌ای خون با استفاده از یک سرسمپلر کریستالی برداشته شد و به یک لوله ۵۰ میلی‌لیتری منتقل گردید و به آن حدود ۱۵تا ۲۰ میلی‌لیتر از محلول PBS اضافه شد. ساتاریفیوژ مجدد با دور g۷۵۰ و در دمای محیط به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. رسوب به‌دست آمده در ۵ میلی‌لیتر محلول PBS حل شد و مجدد سانتریفیوژ تکرار شد. رسوب در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت EGM2 (Endothelial Cell Basal Medium) حل شد و پس از شمارش به ظروف پتری دیش ۶ خانه که از قبل با فیبرونکتین (۲/۵ میکروگرم بر سانتی‌متر مربع) تیمار شده بود؛ منتقل شد. پس از گذشت چهار روز، سلول‌های متصل نشده جمع‌آوری شدند و پس از سانتریفوژ رسوب سلولی همراه محیط کشت تازه دوباره به پتری دیش حاوی سلول‌ها برگردانده شد. سلول‌های متصل به کف پتری دیش در روز هفتم سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال می‌باشند.

بیان شاخص‌های سطحی به‌روش فلوسایتومتری

سلول‌های کشت داده شده، پس از پاساژ سوم از فلاسک جدا شدند با PBS شسته شدند و سپس در PBS حل شدند. پس از آن به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه با آنتی‌بادی‌های کانجوگه CD144-PE و CD31-FITC تیمار شدند. آنالیز فلوسایتومتری با استفاده از دستگاه Cyflow Space (Partec) انجام شد. داده‌های حاصل با نرم‌افزار FloMax software (version 2.70) آنالیز شد.

تیمار بی‌وزنی

نمونه‌های مورد مطالعه شامل دو گروه بودند: گروه کنترل (۱Gیا کشت داده شده در شرایط طبیعی) و گروه بی‌وزنی (۳ ساعت و ۲۴ ساعت). میزان بی‌وزنی اعمال شده در گروه بی‌وزنی ۰/۰۰۱G بود. جهت شبیه‌سازی بی‌وزنی از دستگاه کلینواستت تک محوره در پژوهشگاه هوافضا که از سازمان ملل گرفته شده بود، استفاده شد. چرخش دستگاه به‌صورتی است که جاذبه برای سلول‌ها قابل تشخیص نیست. دستگاه

کلینواستت پس از استریل‌کردن توسط نور ماورای بنفش و الکل ۷۰ درصد، در داخل انکوباتور کشت سلولی قرار داده شد. دور دستگاه کلینواستت بر روی ۱۰RPM تنظیم شد. برای قراردادن نمونه‌های سلولی در دستگاه شبیه‌سازی بی‌وزنی، ابتدا سلول‌ها در مرحله پاساژ سوم را در فلاسک‌های ۲۵ می‌ریزیم. سپس فلاسک‌ها را ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده تا سلول‌ها کاملاً به کف فلاسک‌ها بچسبند. پس از گذشت ۲۴ ساعت فلاسک‌ها تا جایی که لبریز شود از محیط کشت پر می‌شوند. برای جلوگیری از ایجاد حباب و وارد شدن فشار اضافی به نمونه‌ها درب فلاسک‌ها به آرامی بسته می‌شوند. فلاسک‌ها به‌صورت عمودی در دستگاه قرار گرفته و برای جلوگیری از افتادن با بست مخصوص محکم به دستگاه شبیه‌ساز بسته می‌شوند. شایان ذکر است گروه کنترل همزمان در داخل انکوباتور CO2 و خارج از دستگاه کلینواستت گذاشته شد. ازآنجا که فلاسک‌ها از محیط کشت پر شده بودند و درب فلاسک‌ها محکم شده بود؛ امکان تبادلات گاز دی‌اکسیدکربن را نداشتند. به‌منظور رفع این معضل از HEPES ۱۵ میلی‌مولار استفاده و به محیط کشت اضافه شد. کلیه آزمایش‌ها ۳ بار تکرار شد. پس از خارج‌کردن نمونه‌ها از دستگاه محیط کشت را به‌آرامی خارج کرده و سلول‌ها با PBS شست و شو شدند. سپس محلول تریپسین/ EDTA را اضافه کرده و انکوباسیون در ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. سپس ml ۲ محیط کشت حاوی سرم را اضافه و پیپتاژ کرده و به مدت ۳ دقیقه در RPM ۱۰۰۰ سانتریفوژ قرار گرفت. مراحل استخراج RNA بر روی رسوب سلولی انجام شد.

آنالیز بیان ژن به‌روش Real- time PCR

میزان بیان ژن‌های VEGFR- 2 و CD 34 قبل و بعد از تیمار بی‌وزنی توسط Real-time quantitative PCR بررسی شد. به‌منظور طراحی پرایمرها از نرم‌افزار OLIGO7 استفاده گردید. طراحی پرایمرهای بالادست و پائین دست بر روی دو اگزون جدا یا در مرز دو اگزون صورت گرفت؛ در نتیجه آن‌دسته از محصولات PCR که حاصل آلودگی با DNA ژنو می‌باشند، به‌دلیل اختلاف در اندازهٔ قطعه از محصول اصلی Real time PCR قابل تفکیک می‌باشد. تمامی پرایمرها، با استفاده از نرم‌افزار blast با ژنوم چک شدند تا از یکتا بودن محل جفت شدن پرایمرها اطمینان حاصل شود .نتایج حاکی از این بود که تمامی پرایمرها تنها به ژن موردنظر متصل می‌شوند. پرایمرها توسط شرکت Macrogen (South Korea) ساخته شد. توالی پرایمرها در جدول ۱ آورده شده است.

RNA تام سلولی با استفاده از کیت استخراج RNA (Cell AmpTM Direct RNA Prep Kit for RT-PCR; Takara, Japan) استخراج گردید و در نیتروژن مایع در دمای ۷۵- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد. یک میکروگرم از RNA تام برای سنتز cDNA و با استفاده از کیت Prime ScriptTM RT reagent (Takara, Japan) در حجم واکنش ۲۰ میکرولیتر و مطابق پروتکل شرکت سازنده استفاده شد. جهت تکثیر ژن‌های هدف و ژن کنترل داخلی، واکنش PCR با استفاده از ۲ میکرولیتر از محصول cDNA، پرایمرهای مخصوص هر ژن (جدول ۱)، کیت SYBR Green Real Time Master Mix (Takara, Japan) و دستگاه StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA) انجام شد. دماهای واکنش شامل یک مرحله دناتوراسیون ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه و در ادامه ۴۰ سیکل شامل دناتوراسیون ۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و گسترش همزمان به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس بود. برای اطمینان از اختصاصی‌بودن محصولات، منحنی ذوب برای ژن‌ها بعد از انجام واکنش Real time PCR رسم گردید. میزان بیان ژن با روش کمی نسبی و با استفاده از فرمول ۲-ΔΔCT محاسبه گردید. از GAPDH بعنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد.

جدول ۱- توالی پرایمرها

نام ژن	RefSeq شماره	توالی پرایمر (۵ به ۳)	طول محصول PCR (bp)
GAPDH	NG_007073.2	F:ACGACCACTTTGTCAAGCTCAT R:TCCACCACCCTGTTGCTGTA	101
CD34	AF523361.1	F: CTTGCTGAGTTTGCTGCCTTC R: CATTGCCATGTTGAGACACAGG	179
VEGFR-2	AF063658.1	F: ATGACAACACAGCAGGAATCAGT R: TGTCCGTCTGGTTGTCATCTG	138

تست MTT

جهت اندازه‌گیری میزان زنده‌مانی سلول‌ها از تکنیک MTT و کیت شرکت ATOCEL و شماره Cat no: ABM21-P1 استفاده شد. برای این منظور ابتدا سلول‌ها به تعداد ۵۰ هزار در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. سلول‌ها به مدت ۱ روز در شرایط بی‌وزنی کشت شدند. پس ازآن به‌هر چاهک، ۲۰ میکرو لیتر محلول MTT (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه شد. سپس نمونه‌ها برای مدت ۳ تا ۴ ساعت در انکوباتور تا ظاهر شدن رسوب بنفش ظاهر قرار داده شد. بعد از خارج کردن محیط، ۲۰۰ میکرو لیتر DMSO به هر چاهک اضافه و پیپتاژ شد. جذب نوری درطول موج ۵۷۰ نانومتر و با استفاده از دستگاه الایزا ریدر خوانده شد.

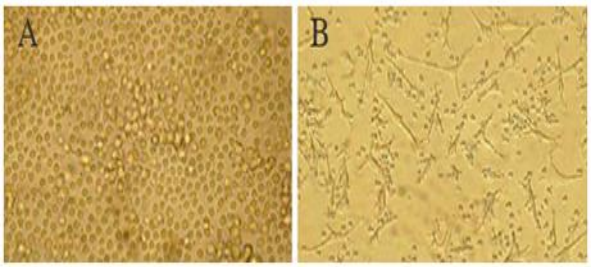
آنالیز آماری

آنالیز داده‌ها توسط آزمون آماری آنالیز independent samples t-test به وسیله نرم‌افزار SPSS version15 انجام گرفت. سطح معنی‌دار $P < 0.05$ در نظرگرفته شد.

نتایج

جداسازی و کشت سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال

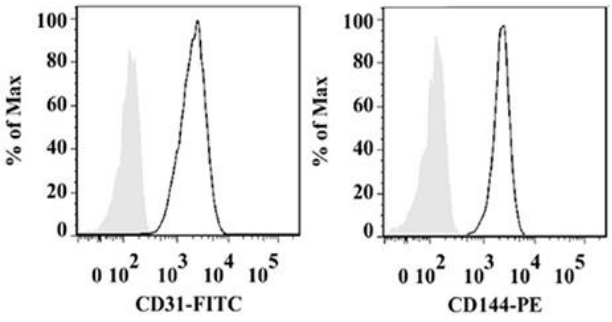
پس از گرفتن خون از افراد داوطلب، سلول‌های تک‌هسته‌ای خون با استفاده از فیکول استخراج شد. این سلول‌ها در ظروف پتری دیش که با فیبرونکتین تیمار شده بودند و در محیط کشت EGM 2 تکثیر شدند. قسمتی از این سلول‌ها که درواقع سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال هستند شروع به چسبیدن به کف ظرف پتری دیش می‌کنند و به تدریج از دیگر سلول‌های تک‌هسته‌ای خون تفکیک می‌شوند. سلول‌های چسبیده به کف ظرف پتری دیش، در روزهای اول جداسازی، کروی شکل هستند اما به تدریج و پس از گذشت ۴ روز شکل برخی از آنها تغییر کرده و دوکی می‌شوند.



شکل ۱- شکل A سلول‌های تک هسته‌ای خون را در روز اول جداسازی از خون نشان می‌دهد. شکل D سلول‌ها را بعد از گذشت ۱۴ روز از کشت نشان می‌دهد (بزرگ‌نمایی x ۲۰۰).

بیان شاخص‌های سطحی

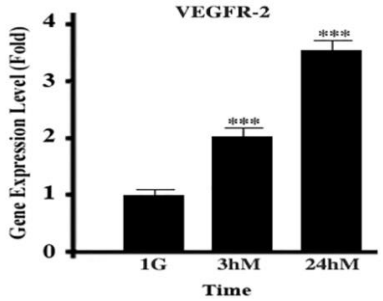
به منظور تایید سلول‌های اندوتلیال، بیان مارکرهای CD اختصاصی در سلول‌های استخراج شده توسط تکنیک فلوسایتومتری انجام شد. نتایج فلوسایتومتری نشان داد که حدود ۹۹ درصد سلول‌های استخراج شده مارکر CD31 و CD144 را بیان می‌کنند. این امر بیانگر این است که سلول‌های استخراج شده اندوتلیالی می‌باشند.



شکل ۲- نتایج فلوسایتومتری سلول های استخراج شده. بیش از ۹۰٪ درصد سلول های استخراج شده مارکر CD31 و CD144 را بیان کردند.

بیان ژن *VEGFR- 2*

مولکول VEGFRکی از فاکتورهای مهم رشد در سلول اندوتلیال است. عملکردهای اصلی VEGFR تکثیر سلول‌های اندوتلیال، بقا، مهاجرت می‌باشد. شکل زیر تغییرات بیان ژن VEGFR- 2 را در سلول‌های EPC در نمونه‌های کنترل ۱جی و گروه بی‌وزنی نشان می‌دهد. بی‌وزنی موجب افزایش معنی‌داری ($P\leq 0.001$) در بیان این ژن شده است. پس از ۳ ساعت بی‌وزنی بیان این ژن به میزان ۲ برابر در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت. بعد از اعمال بی‌وزنی به مدت ۲۴ ساعت، بیان این ژن در مقایسه با گروه کنترل به میزان ۳/۵ برابر افزایش یافت.

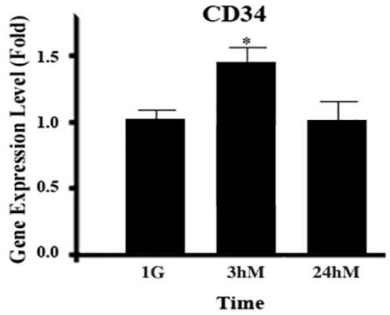


شکل ۳- شدت بیان نسبی ژن VEGFR- 2 در سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال، قبل از بی‌وزنی (ستون اول؛ 1G) و بعد از آن در زمان‌های ۳ساعت (ستون دوم؛ 3hM) و ۲۴ساعت (ستون دوم؛ 24hM).

بیان ژن CD34

مولکول CD34 یک گلیکوپروتئین سطح سلولی و عامل چسبندگی سلول–سلول است. همچنین نقش مهمی در چسبندگی مولکول‌ها دارد و مورد نیاز سلول‌های T برای ورود به گره لنفاوی می‌باشد و در اندوتلیال غدد لنفاوی و هماتوپوئیتیک بیان می‌شود. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که CD34 بیشتر در مهاجرت کموکین‌ها از ائوزینوفیل ودندریتیک سل‌ها نقش دارد.

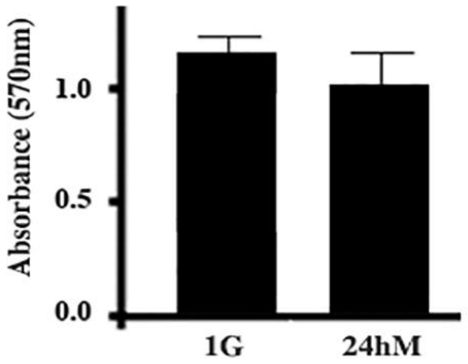
شکل زیر بیان ژن CD34 را در سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال انسان در شرایط کنترل ۱جی و بی وزنی (۳ ساعت و یک روز) نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود بی‌وزنی منجر به ۵۰٪ افزایش بیان ژن CD34 ($P\leq 0.05$) پس از ۳ ساعت شده است. در این نمودار پس از گذشت ۲۴ ساعت بیان ژن CD34 کاهش یافت و به سطح کنترل رسید.



شکل ۴- شدت بیان نسبی ژنCD34 در سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال، قبل از بی‌وزنی (ستون اول؛ 1G) وبعد از آن در زمان‌های ۳ ساعت (ستون دوم؛ 3hM) و ۲۴ساعت (ستون سوم؛ 24hM).

تست MTT

اساس روش MTT سنجش ماده‌ای به نام فورمازان می‌باشد. مادهٔ MTT توسط زنجیرهٔ سیتوکرومی که در غشای میتوکندری سلول قرار دارد اکسید می‌گردد و تولید کریستال‌های فورمازان می‌کند. درنتیجه هرچه میزان متابولیسم سلولی بیشتر باشد میزان اکسیداسیون این ماده بیشتر بوده و فورمازان بیشتری تولید می‌گردد. درنتیجه، میزان فورمازان ایجاد شده به عنوان شاخصی برای اندازه‌گیری سلامت و رشد سلولی است. فورمازان، ترکیبی رنگی است. درنتیجه، میزان تولید این ماده را می‌توان با کمک تکنیک اسپکتروفتومتری رنگی سنجید. نتایج تست MTT پس از ۲۴ ساعت تیمار بی وزنی بر روی سلول‌ها در نمودار زیر آورده شده‌است. از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری بین سلول‌های گروه بی‌وزنی و سلول‌های گروه کنترل وجود نداشت. بنابراین بی‌وزنی تاثیری در میزان مرگ و میر سلولی نداشته است.



شکل ۵- تست MTT برای سلول‌های اندوتلیال در شرایط جاذبه نرمال G ۱و بعد از ۲۴ ساعت تیمار بی‌وزنی

بحث

به طورکلی، دو مکانیسم آنژیوژنز و واسکولوژنز برای ایجاد عروق خونی وجود دارد. در مکانیسم آنژیوژنز، عروق جدید، از عروق قبلی تولید می‌شوند در حالی‌که درروش واسکولوژنز، عروق تازه از سلول‌های پیش‌ساز و بنیادی اندوتلیال ایجاد می‌گردند. تا همین اواخر دانشمندان گمان می‌کردند که تمایز سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال به سلول‌های اندوتلیالی یا فرایند رگزایی تنها در دوران جنینی اتفاق می‌افتد [۱، ۲]. گزارشات اخیر حاکی از این‌است که نشان داده است که خون محیطی در افراد بالغ حاوی سلول‌های مشتق شده از مغز استخوان می‌باشد که خصوصیات آنها شبیه به آنژیوبلاست‌ها در جنین است. مطالعات نشان داده است که این سلول‌ها توانایی تکثیر و تمایز به سلول‌های اندوتلیال بالغ را دارند و سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال نامیده می‌شوند، بنابراین مشخص شد که فرایند رگزایی در بزرگسالان نیز اتفاق می‌افتد [۱۳].

این سلول‌ها توانایی زیادی در درمان بیماری‌های قلبی دارند، به ویژه ترمیم نواحی از قلب که در اثر سکته قلبی آسیب دیده‌اند.سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال علاوه بر اینکه می‌توانند رگ‌زایی را در محل آسیب دیده القا کنند؛ قادر هستند که به سلول‌های ماهیچه قلب نیز تمایز پیدا کنند[۱۴]. همچنین نشان داده شده است که عواملی چون فشار خون بالا، دیابت و کلسترول بالا موجب کاهش تعداد و فعالیت این سلول‌ها در خون می‌گردد. از آنجا سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال در حفظ هموستاری رگ‌ها در بدن نقش دارند، کم شدن این سلول‌ها در بدن احتمال بیماری‌های قلبی عروقی را افزایش می‌دهد [۱۵]. درنتیجه به علت کاربرد بالای این سلول‌ها در سلول‌درمانی اختلالات قلبی-عروقی و ارتباط آن با مشکلات قلبی-عروقی، جداسازی و مطالعه این سلول‌ها از خون محیطی انسان اهمیت زیادی دارد.

قرارگرفتن در معرض میکروگراویتی در طول ماموریت‌های فضایی اثراتی در سیستم‌های مختلف می‌گذارد. در انسان تغییرات میکروگرانشی شامل ازدست‌دادن استخوان، آتروفی عضلانی، مشکلات قلبی-عروقی، اختلال در عملکرد ریوی است [۱۶].

یکی از مشکلاتی که فضانوردان در ماموریت‌های فضایی با آن درگیر هستند اختلالات قلبی، کاهش اندازه قلب وکاهش ظرفیت هوازی است [۱۷]. گزارشات زیادی حاکی از این است که اختلال در سلول‌های اندوتلیال رگ‌ها عامل اختلال در فعالیت قلب در فضا و در شرایط نبود جاذبه می‌باشد. این تغییرات می‌توانند باعث مشکلات سازگاری در هنگام بازگشت فضانورد به زمین به ویژه پس از پرواز های طولانی مدت شوند.

با توجه به‌اینکه سلول‌های اندوتلیال نقش اساسی در نگهداری و یکپارچگی رگ‌ها و در تولید عروق جدید دارند؛ بنابراین مطالعات گوناگونی نشان داده که میکروگراویتی در عملکرد این سلول ها اثر می‌گذارد.

استراحت در بستر و بی‌تحرکی موجب تخریب سلول‌های اندوتلیال می‌شود. مطالعات اخیر توسط کانگ وهمکاران نشان داده است که بی‌وزنی برای مدت ۷۲ ساعت منجر به اتوفاژی در سلول‌های اندوتلیال عروق و افزایش آپوپتوز در سلول های اندوتلیال ریزرگ‌ها می‌شود.آن‌ها با استفاده از تکنیک وسترن بلات و real-time PCR به این نتیجه رسیدند که در شرایط بی‌وزنی میزان آپوپتوز در سلول‌های اندوتلیال ریز رگ ها افزایش می‌یابد که این تغییرا ت مرتبط با کاهش بیان P13K/AKT و افزایش بیان NF-KB ودپلیمریزه شدن اکتین F است [۱۸].

تعمیر اندوتلیوم ازطریق دو مکانیسم صورت می‌گیرد. اولین مکانیسم تقسیم سلول‌های اندوتلیال سالم مجاور و جایگزینی با سلول‌های آسیب دیده است. مطالعات نشان داده است که اگرچه تکثیر این سلول‌های مجاور در شرایط نرمال برای حفظ تمامیت رگ کافی است؛ اما در شرایط ریسک فاکتورها و در شرایط استرس زا، این مسیر به‌تنهایی قادر به حفظ تمامیت رگ و ساختار آن نمی‌باشد. مکانیسم دوم برای تعمیر سلول‌های آسیب دیده، سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیوم گردش خون است. این سلول‌ها از مغز

استخوان فرا خوانده شده در خون محیطی گردش کرده و به سلول‌های بالغ با خواص اندوتلیالی تمایز پیدا می‌کنند.

مجموع موارد ذکر شده در بالا ما را برآن داشت تا به مطالعه اثر شبیه‌سازی بی‌وزنی بر روی سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال بپردازیم تا هم از تاثیر شرایط بی وزنی بر روی سیستم قلبی عروقی فضانوردان بیشتر مطلع شویم و هم اینکه آیا میتوان از بی وزنی به عنوان محرکی برای رگزایی در شرایط آزمایشگاهی به منظور تولید رگ‌های جدید برای سلول درمانی بیماری های قلبی عروقی چون ایسکمی و تصلب شرائین بهره برد یا خیر.

در مطالعه حاضر ما به تاثیر شرایط بی‌وزنی برای مدت ۳ ساعت و ۲۴ ساعت بر روی بیان ۲ ژن VGEFR2 و CD34 پرداختیم. برای ایجاد شرایط بی‌وزنی از دستگاه کلینواستت دو محوره استفاده کردیم.

مولکولVEGF یک فاکتور آنژیوژنیک می باشد. این مولکول اثر خود را بر روی سلول از طریق گیرنده VEGFR–2 اعمال می‌کند. مولکول VEGFR–2 یکی از فاکتورهای مهم رشد در سلول اندوتلیال است. بیان ژن VEGFR–2 در سلول‌های EPC پس از ۳ ساعت قرارگیری در محیط بی‌وزنی که توسط دستگاه کلینو استت ایجاد شده بود؛ به میزان ۲ برابر در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت. این افزایش بیان تا یک روز ادامه داشت به گونه‌ای که پس از ۲۴ ساعت اعمال بی‌وزنی، میزان بیان این ژن در مقایسه با گروه کنترل به میزان ۳/۵ برابر افزایش یافت. این مسئله ممکن است بیانگر این باشد که تاثیر پروتئین VEGF که یک فاکتور القاکننده رگزایی است می‌تواند در شرایط بی‌وزنی زیاد گردد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که بی‌وزنی محرک مناسبی برای تولید عروق جدید در شرایط آزمایشگاه می‌باشد.

نتایج مطالعه ما در رابطه با بیان ژن VEGFR–2 مشابه با نتایج چی یو و همکارانش در سال ۲۰۰۵ بود. چی یو و همکارانش بیان ژن VEGFR –2 را در شرایط بی‌وزنی و با استفاده از بیوراکتور RWV وتکنیک فلوسایتومتری بررسی کردند ومشاهده کردند بی‌وزنی منجر به افزایش معنی‌دار ($P < 0.01$)در بیان این ژن می‌شد به گونه‌ای که بیان ژنVEGFR – 2در روز اول، روز سوم و روزهفتم اعمال بی وزنی در مقایسه با نمونه کنترل افزایش می یافت [۱۹].

مارکراندوتلیالی دیگری که به بررسی و مطالعه آن پرداختیم مولکول CD34 بود که یک گلیکوپروتئین سطح سلولی و عامل چسبندگی سلول- سلول است. بیان این ژن در سلول‌های EPC پس از اعمال بی‌وزنی به مدت ۳ ساعت، به مقدار ۵۰درصد در مقایسه با گروه کنترل افزایش پیدا کرد. اما پس از ۲۴ ساعت بی‌وزنی، میزان بیان این ژن کاهش یافت و به سطح کنترل رسید. این پروتئین ۱۱۰ کیلو دالتونی توسط چی یو و همکارانش در سال ۲۰۰۵ [۱۹] مورد مطالعه قرار گرفت. آنها در بررسی‌های خود نشان دادند که قرار دادن این ژن در شرایط بی‌وزنی و در دستگاه RWV برای بازه زمانی۷ الی ۱۴ روز منجر به افزایش بیان آن می‌شود.

بنابراین این احتمال وجود دارد که در مطالعه ما نیز درصورتی‌که زمان بی‌وزنی افزایش یابد بیان آن افزایش داشته باشد که این امر نیاز به آزمایش مجدد در شرایط بی‌وزنی و برای مدت زمان ۷ الی ۱۴ روز را دارد.

نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت تولید عروق جدید در رشد و تکامل رگ‌های خونی جدید و همچنین اهمیت توانایی تولید عروق در پزشکی بالینی جهت درمان بیماری‌هایی چون سکته قلبی، تصلب شرائین و سختی عروق و همچنین پیوند عروق، در این مطالعه ما به مطالعه ژن‌های دخیل در فرآیند رگزایی در محیط بی‌وزنی پرداختیم. تولید عروق جدید در افراد سالم و بالغ فرآیند نادری است که فقط به‌صورت موضعی و موقت، و تحت شرایط فیزیولوژیک خاص مانند ترمیم زخم، التهاب و چرخه جنسی زنان انجام می‌شود. سلول‌های اصلی که در فرایند رگزایی شرکت می کنند سلولهای اندوتلیالی می‌باشند که دیواره رگ‌های خونی را می‌پوشانند و تقریباً تمام ساختمان مویرگ‌های خونی را تشکیل می‌دهند.

دراین تحقیق، مشخص شد VEGFR–2 افزایش بیان قابل توجهی را در سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال در شرایط شبیه‌سازی شده بی‌وزنی با کمک دستگاه کلینواستت دارد. ازطرف دیگر بی‌وزنی تغییری در بیان ژن CD34 پس از ۲۴ ساعت ایجاد نکرد. به طورکلی بی وزنی می تواند موجب تغییر مارکرهای رگزایی شود. با توجه به افزایش بیان VEGFR–2 ، به نظر می‌رسد که بی‌وزنی تاثیر مثبت بر سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال دارد و ممکن است بتوان به عنوان محیطی جدید برای تمایز این سلول‌ها به عروق خونی و سلول درمانی بیماری‌های قلبی عروقی و ایسکمی استفاده شود. پیشنهاد می‌شود تا در مطالعات آتی به بررسی بیشتر سایر مارکرهای رگزایی در شرایط بی‌وزنی و همچنین تمایز این سلول‌ها در این شرایط به عروق خونی پرداخته شود.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

مراجع

[1] W. Risau, and I. Flamme, "Vasculogenesis," *Annual Review of Cell and Developmental Biol*ogy, Vol. 11, No.1, pp.73-91, 1995.

[2] N. Akhtar, E.B. Dickerson, and R. Auerbach, "The sponge/Matrigel angiogenesis assay." *Angiogenesis*, Vol. 5, pp. 75-80, 2002.

[3] M. Histov, W. Erl, and P.C. Weber, "Endothelial Progenitor cells, isolation and characterization," *Trends in Cardiovascular Medicine*, vol. 13, no. 5, pp. 201-206 , 2003.

[4] C. Kalka, M. Haruchika, T. Takahashi, and et. al., "Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 97, no. 7, P.P. 3422– 3427, 2000.

[5] R.M. Seaberg, and D.V Kooy, "Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions," *Trends Neurosciences*, vol. 26, no. 3, pp. 125-31, 2003.

[6] T. Murohara, I. Hisao, J Duan. and et al., "Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization.", *The Journal of clinical investigation*, vol. 105, no. 11, pp. 1527–1536, 2000.

[7] G. Clement, and K. Slenzka, *Fundamentals of Space Biology, Research on Cells, Animals, and Plant in Space*, vol.18, Springer Science & Business Media, 2006.

[8] E.V. Nosova, P. Yen, K.C. Chong, and et al, "Short-term physical inactivity impairs vascular function.", *Journal of Surgical Research*, vol.190, no.2, pp. 672-682, 2014.

[9] Y.C. Wang, D-Y. Lu, F. Shi, and et al, "Clinorotation enhances autophagy in vascular endothelial cells", *Biochemistry and Cell Biology*, vol. 91, no.5, pp. 309-314, 2013.

[10] A. Eichmann, K. Corbel, V. Nataf, and et. al., "Ligand-dependent development of the endothelial and hemopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 94, no. 10, pp. 5141-5146, 1997.

[11] J. Yamashita, H. Itoh, M. Hirashima, and et. al., "Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors." *Nature*, vol. 408, no. 6808, pp. 92-96, 2000.

[12] M.R. Kordi, A.Nekouei, A. Shafiee, and V. Hadidi, "The Effect of Eight Weeks High Intensity Aerobic Continuous and Interval Training on Gene Expression of Vascular Endothelial Growth Factor In Soleus Muscle of Healthy Male Rats." *Arak Medical University Journal*, vol. 18, no. 8, pp. 53- 62, 2015 (in Persian).

[13] T. Asahara, T. Murohara, A. Sullivan, and et al., "Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis." *Science*, vol. 275, no. 5302, pp. 964-966, 1997.

[14] M. Koyanagi, C. Urbich, E. Chavakis, and et al. "Differentiation of circulating endothelial progenitor cells to a cardiomyogenic phenotype depends on E-cadherin." *FEBS Letters*, vol. 579, no.27, pp. 6060–6066, 2005.

[15] J. Hill, G. Zalos, J. Halcox, and et al., "Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk." *New England Jornal of Medicine*, vol. 348, no. 7, pp. 593–600, 2003.

[16] J. Pietsch, J. Bauer, M. Egli, and et al., "The effects of weightlessnesson the human organism and mammalian cells." *Current MolecularMedicine*, vol. 11, no. 5, pp. 350–364, 2011.

[17] V.A. Convertino, "Status of cardiovascular issues related tospace flight: implications for future research directions", *Respiratory physiology and neurobiology*, vol. 169, pp. S34–S37, 2009.

[18] C.Y. Kang, L. Zou, M. Yang, and et al., "Impact of simulated microgravity on microvascular endothelial cell apoptosis," *European journal of Applied Physiology*, vol. 111, no. 9, pp. 2131-2138, 2011.

[19] B. Chiu, J.Z. Wan, D. Abley, and J. Akabutu, "Induction of vascular endothelial phenotype and cellular proliferation from human cord blood stem cells cultured in simulated microgravity," *Acta astronautica*, vol. 56, no. 9, pp. 918-922, 2005.