

پیوند زیر پوستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی موشی کشت شده در آلژینیت و بررسی تمایز به غضروف آن‌ها

دکتر محمدرضا باغبان اسلامی^۱، لیلا تقی‌یار^۲، سحر کیانی^۳، عباس پیریایی^۴

چکیده

سابقه و هدف

سلول بنیادی مزانشیمی، کاندید مناسبی برای درمان انواع بیماری از جمله ترمیم ضایعات غضروف مفصلی محسوب می‌شود و تلاش‌های زیادی در جهت کاربردی کردن استفاده از این سلول‌ها، در حال انجام است. در همین راستا، در مطالعه حاضر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش NMRI، در داخل ژل آلژینیت کشت شد و با تضعیف سیستم ایمنی رت، در زیر پوست آن پیوند گردید تا پتانسیل تمایز به غضروف آن در محیط *in vivo* بررسی شود.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. در این مطالعه موش‌های NMRI با سن تقریبی ۶-۴ هفته کشته و سلول‌های مغز استخوان آن‌ها با تراکم ۵۰۰ سلول در سانتی‌متر مربع در ظروف ۶ خانه کشت شدند. با انجام دو پاساژ متوالی، جمعیت خالصی از سلول‌های فیروبلاستی مزانشیمی ظاهر شد. دو میلیون سلول مزانشیمی پاساژ دو، در یک میلی‌لیتر محلول آلژینیت معلق شد و ژل حاوی سلول به کمک محلول کلرید کلسیم به حالت ژل در آمد و به صورت زیر پوستی به رت پیوند شد. برای اجتناب از رد پیوند، رت‌ها به طور روزانه داروی سایکلوکسپورین دریافت کردند. ۵ هفته پس از پیوند، ژل‌ها از محل پیوند خارج شد و از لحاظ تمایز به غضروف با روش‌های ایمونوسیتوشیمی (رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو)، RT-PCR و میکروسکوپ الکترونی بررسی شدند.

یافته‌ها

پس از پنج هفته محل پیوند به آرامی باز شد. بر روی ژل‌های پیوند شده بافت همبند و چربی پر از عروق خونی تشکیل شده بود. رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو برش‌های تهیه شده از ژل‌های حاوی سلول نشان داد که سلول‌ها در درون ژل در داخل ساختارهای شبه لاکونا واقع شده‌اند و مورفولوژی بیضی شکل دارند. نتایج RT-PCR نشان داد که، مارکرهای غضروفی از جمله mRNA کلاژن تیپ II (مارکر غضروف هیالین)، X (مارکر کندروسیت‌های هیپرتروفه در آغاز استخوان‌سازی) و آگریکان به میزان زیادی تولید شده است. بررسی برش‌های ظریف نشان داد که سلول‌ها دارای شبکه آندوپلاسمی خشن فراوان و متسع هستند و در خارج آن‌ها ماتریکس خارج سلولی رشته‌ای ترشح شده است.

نتیجه‌گیری

سلول‌های مزانشیمی کشت شده در داخل ژل آلژینیت، پس از پیوند زیرپوستی، به سلول‌های غضروف هیالین، که در آن نشانه‌ای از آغاز فرآیند استخوان‌سازی وجود دارد، تمایز می‌یابند.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، آلژینیت، پیوند

تاریخ دریافت: ۱۵/۹/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۶/۴/۱۷

۱- مؤلف مسئول: PhD علوم تشریح - استادیار پژوهشگاه رویان - صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵

۲- فوق‌لیسانس علوم تکوینی - پژوهشگاه رویان

۳- دانشجوی PhD علوم تشریح - دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۴- دانشجوی PhD علوم تشریح - دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه

ضایعات غضروف مفصلی از جمله بیماری‌های شایع در افراد میانسال و سالمند است (۱). غضروف آسیب دیده یا تحلیل رفته دارای پتانسیل محدودی برای ترمیم است، هم‌چنین ضایعات بزرگتر قادر به ترمیم خود به خود نیستند به همین دلیل درمان بیماری‌های غضروفی یکی از چالش‌های بزرگ در پزشکی و ارتوپدی محسوب می‌شود (۲، ۳).

نتایج حاصل از روش‌های جراحی مرسوم، از جمله پیوند خودی استئوکندرال و پری‌کندرال، نشان دهنده این واقعیت است که بافت پیوند شده قادر به بازگرداندن ساختار طبیعی غضروف هیالین نمی‌باشد و عمل طبیعی مفصل به مقدار زیادی کاهش می‌یابد (۴). لذا یافتن منبع سلولی مناسب و کارا جهت پیوند در محل ضایعه دیده غضروف، همواره مورد توجه بوده است.

یکی از این منابع، استفاده از سلول‌های غضروفی است که پیوند آن برای اولین بار در سال ۱۹۶۸ انجام شد ولی میزان موفقیت این روش تنها ۴۰٪ بود (۵). استفاده از سلول تنها (بدون عوامل ماتریکس برون سلولی) در پیوند با مشکلاتی از قبیل خارج شدن سلول از محل ضایعه دیده غضروفی و رها شدن در فضای مفصلی همراه است. استفاده از داربست مناسب به عنوان حامل سلول تا حدود زیادی این مشکل را برطرف می‌کند. از بین داربست‌های موجود آلژنیت یکی از پلی‌ساکاریدهای طبیعی است که از جلبک قهوه‌ای استخراج شده و به راحتی در حضور یون‌های کلسیم به فرم ژل در می‌آید. این ترکیب به دلیل این که به فرم مایع بوده و شکل محل آسیب را به خود می‌گیرد، برای پیوند در محل ضایعه دیده غضروفی مناسب است (۶، ۷).

پیچ و همکارانش در سال ۱۹۹۵ سلول‌های کندروسیت را بر روی ژل آلژنیت بردند و در محل آسیب غضروف مفصلی پیوند زدند. این بار نتیجه به دست آمده بهتر از قبل بود (۸). ولی این روش علیرغم این که تا حدودی سبب ترمیم غضروف می‌شد، به دو دلیل روش مناسبی محسوب نمی‌گردید: اولاً تهیه کندروسیت یک ضایعه ثانوی در غضروف مفصلی ایجاد می‌کرد و مهم‌تر این که

در کشت تک لایه به منظور تکثیر، کندروسیت‌ها دچار تمایزدایی شده و خصوصیات ترشحی از جمله ماتریکس خارج سلولی حاوی آگریکان را از دست می‌دادند (۹، ۱۰). در سال‌های اخیر استفاده از سلول‌های مزانشیمی در بازسازی ضایعات غضروفی مورد توجه قرار گرفته است. به طوری که در سال ۱۹۹۷ کاپلان گزارش کرد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) کشت شده بر روی ژل کلاژن بعد از ۲۴ هفته قادر به تشکیل بافتی شبیه غضروف شفاف می‌باشند (۱۱). سلول‌های مزانشیمی با توان تکثیر بالا در آزمایشگاه و پتانسیل تمایز به انواع سلول‌های دودمان مزانشیمی به عنوان یکی از بهترین منابع سلولی جهت ترمیم ضایعات غضروفی شناخته شده است (۱۲). اخیراً گزارش‌های زیادی از تشکیل موفقیت آمیز استخوان و غضروف به کمک سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در حیوانات آزمایشگاهی وجود دارد (۱۳-۱۶).

تا به حال در چندین تحقیق، کشت سلول‌های مزانشیمی در داخل ژل آلژنیت مورد بررسی قرار گرفته است، ولی در ارتباط با پیوند سلول‌های مزانشیمی کشت شده در داخل ژل آلژنیت، مطالعات بسیار اندک است (۲۰-۱۷).

در مطالعه حاضر این مبحث مورد توجه قرار گرفته است بدین ترتیب که سلول‌های مزانشیمی به شکل سه بعدی در داخل ژل آلژنیت کشت شده و کندروژنیز آن‌ها پس از پیوند در زیر پوست موش، مورد بررسی قرار گرفته است. وقوع کندروژنیز با بررسی mRNA های داخل سلولی، مارکر غضروف و ماتریکس ترشح شده در خارج سلول انجام شده است. هم‌چنین به منظور بررسی مورفولوژی، بخشی از بافت پیونده زده شده خارج گردیده و فراساختار آن با روش میکروسکوپ الکترونی گذاره مورد بررسی قرار گرفته است. در این تحقیق، برای بررسی کندروژنیز در ژل آلژنیت از سلول‌های مزانشیمی موش NMRI استفاده شده است. تحقیقات پیشین نشان داده است که خالص‌سازی سلول‌های مزانشیمی از مغز استخوان موش با مشکلاتی همراه است (۲۱، ۲۲). ما در تحقیق پیشین خود، سلول‌های فوق را با روش

جدیدی جدا کرده ایم (۲۴، ۲۳). در مطالعه حاضر، کندروژنیز *in vivo* آن‌ها را پس از کشت در داخل ژل آلژینیت و پیوند در زیر پوست موش بررسی نمودیم.

مواد و روش‌ها

کشت سلول‌های MSCs مغز/استخوان:

در مطالعه تجربی حاضر، سلول‌های مزانشیمی به روشی که در تحقیق پیشین ما ذکر شده، جداسازی و تکثیر شدند (۲۴، ۲۳). به طور خلاصه، ۶ سر موش نر، نژاد NMRI به سن تقریبی ۸-۶ هفته به روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شدند، سپس به وسیله الکلی ۷۰٪ ضدعفونی شده و در شرایط کاملاً استریل، استخوان‌های ران و ساق پای آن‌ها جدا گردید. بافت همبند اطراف استخوان‌ها به طور کامل پاک شده و به زیر هود لامینار منتقل شد. سپس با استفاده از قیچی استریل دو سر استخوان قطع گردید. مغز استخوان به کمک یک سرنگ و سر سوزن شماره ۱۸ که با محیط DMEM (Dubleco's) (آلمان؛ Modified Eagles Medium) حاوی ۱۵٪ سرم FBS (جیبکو؛ Fetal Bovine Serum)، ۱۰۰ واحد بین‌المللی آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و ۱۰۰ واحد بین‌المللی استرپتومایسین پر شده بود، به روش فلاشینگ در یک لوله ۱۵ میلی‌لیتر تخلیه گردید. در این مرحله مغز استخوان با دور ۱۲۰۰ g سانتریفوژ شد تا پلیت سلولی تشکیل گردد، سپس محیط رویی تخلیه شده و سلول‌ها در ۱ میلی‌لیتر محیط DMEM تازه معلق شده و با استفاده از فیش فیلتر ۷۰ میکرومتری فیلتر شدند. در این مرحله سلول‌های حاصل از هر استخوان دراز به کمک لازم نئوبار مورد شمارش سلولی قرار گرفت و تعداد ۵۰۰ سلول در هر یک از خانه‌های ظروف کشت ۶ چاهکی کشت شد. سپس ظرف حاوی سلول به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO₂ منتقل گردید. بعد از ۲ روز محیط رویی خارج گردید و محیط DMEM تازه اضافه شد. محیط سلول‌ها هر ۳-۴ روز یک بار به مدت دو هفته، تعویض شد و سپس پاساژ اول صورت گرفت. به این ترتیب که سلول‌ها با استفاده از ۰/۲٪ Trypsin-EDTA (جیبکو، آلمان) از کف ظرف کنده شد و به نسبت ۳ در ۱ در فلاسک‌های کشت ۲۵ سانتی‌متری کشت شد (پاساژ

یک). دو هفته پس از پاساژ اول، پاساژ دوم انجام شد. این سلول‌ها پس از پر کردن کف ظرف کشت، منجمد شدند و در مرحله بعدی تحقیق استفاده گردیدند. برای انجماد از ترکیب ۳۰٪ DMSO (دایمتیل سولفات، آمریکا، سیگما)، ۵٪ FCS و ۶۵٪ DMEM استفاده شد. هر فلاسک ۲۵ سانتی‌متری به ۵ ویال انجماد تقسیم شد.

کشت سلول‌های MSCs در ژل آلژینیت:

دو میلیون سلول mMSCs پس از شمارش، در یک میلی‌لیتر محلول آلژینیت (سیگما، آلمان) معلق شد. ژل حاوی سلول به یک ظرف کشت ۱۲ خانه‌ای منتقل شد. سپس محلول CaCl₂ به حجم ۲ میلی‌لیتر به ظرف کشت اضافه شد تا مایع آلژینیت در حضور یون‌های کلسیم به فرم ژل درآید. پس از ۲۰ دقیقه، ژل دوبار با محلول PBS⁺ شسته شد و محیط تمایز کندروژنیک شامل DMEM حاوی ۱۰ نانوگرم فاکتور رشد TGF-β3 (سیگما، Transforming Growth Factor-β3)، ۱۰ نانوگرم BMP-6 (Bone Morphogenetic Protein-6)، ۵۰ میلی‌گرم TS premix (Transferrin / Selenium)، ۵/۳۵ میلی‌گرم لینولئیک اسید و ۱/۲۵ میلی‌گرم BSA (Bovine Serum Albumin) و ۱٪ FBS به حجم ۱ میلی‌لیتر به آن اضافه گردید. سلول‌ها به مدت یک هفته با محیط کندروژنیک تیمار شدند و سپس به صورت زیر پوستی به ۶ سر رت پیوند شدند.

پیوند:

به منظور تضعیف سیستم ایمنی رت‌های نر (به وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم) گیرنده پیوند، از داروی سایکلواسپورین (نوارتیس، سوئیس) به صورت تزریق زیر پوستی (یک میلی‌لیتر در روز) استفاده شد. این کار از یک روز پیش از عمل آغاز شد و تا زمان خارج کردن ژل ادامه یافت. سایکلواسپورین به نسبت ۱ به ۱ از محلول سایکلواسپورین در الکلی مطلق تهیه شد و ۱ میلی‌لیتر به ازای ۲۰۰ گرم وزن حیوان تزریق شد. در روز پیوند حیوان به کمک داروی بیهوشی به حجم ۳ به ۱ کتامین - زایلزین (آلفاسان، هلند) بیهوش شد. محل پیوند پشت گردن در بین گوش‌ها با الکلی ۷۰٪ ضدعفونی شد و به

جدول ۱: آغازگرهای ژن‌های اختصاصی بافت غضروف

(۳۳۱bp) Collagen type II	Forward primer 5'-GGCTTAGGGCAGAGA GAG AAG G-3' Reverse primer 5' - TGGACAGTAGACGGAGGA AAGTC-3'
(۱۰۰bp) Collagen type X	Forward primer 5' – CAG CAG CAT TAC GAC CCA AG-3' Reverse primer 5' – CCTGAGAAGGACGAGTGGAC-3'
(۳۲۹bp) Aggrecan	Forward primer 5'- CAG CAG CAT TAC GAC CCA AG-3' Reverse primer 5'- CCTGAGAAGGACGAGTGGAC-3'
β -Tubulin	Forward primer 5'- GGA ACA TAG CCG TAA ACT GC-3' Reverse primer 5'- TCA CTG TGC CTG AAC TTA CC-3'

ژل‌ها دوبار با محلول PBS^+ شستشو داده شدند و به منظور ارزیابی بیشتر مورد استفاده قرار گرفتند، برخی از آن‌ها پس از برش‌گیری با تولوئیدن بلو رنگ شد و برخی دیگر برای استخراج mRNA و بررسی مارکرهای غضروفی به کار رفت و تعدادی نیز برای مطالعه فراساختار به روش میکروسکوپ الکترونی، آماده‌سازی بافتی گردید (شکل ۱).

رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو:

برای مطالعه تمایز به غضروف سلول‌های کشت شده درون ژل آلژینیت به کمک میکروسکوپ نوری، ژل‌های مورد نظر ابتدا دوبار با محلول PBS^+ شستشو داده شد، به مدت ۲ ساعت در پارافمالدئید ۴٪ فیکس شد و پس از انجام مرحله آبگیری و تهیه بلوک پارافینی، برش‌های ۵ میکرومتری تهیه گردید و لام‌های به دست آمده با استفاده از رنگ تولوئیدن بلو رنگ‌آمیزی گردید.

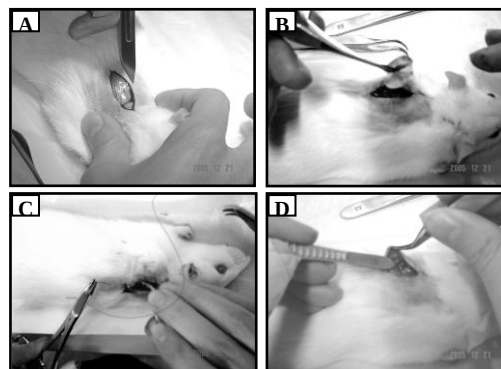
RT-PCR:

به منظور بررسی بیان ژن‌های کلاژن تیپ II و X، اگریکان، از ژل‌های حاوی سلول‌های بنیادی مزانشیمی پیش از پیوند و سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز یافته پس از پیوند زیر پوستی، RNA استخراج شد، بدین ترتیب که ابتدا ژل‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در محلول سیترات سدیم قرار داده شد تا آلژینیت حل شود. سپس سلول‌ها به کمک سانتریفوژ با دور ۱۲۰۰ g ته‌نشین شده، پس از تخلیه محیط رویی، به منظور استخراج mRNA سلول‌ها به کمک RNAase X (سیناژن) لیز شدند. از روی RNA حاصل cDNA در حجم بالا ساخته شد. سپس PCR در حجم ۲۵

کمک تیغ تراشیده شد. سپس برشی به طول ۳-۲ سانتی‌متر ایجاد شد، به کمک یک سواپ استریل پوست از بافت همبند زیری جدا شد، سپس ژل‌ها با یک پنس استریل در محل قرار داده شد و محل پیوند با بخیه بسته شد.

خارج کردن ژل‌ها از محل پیوند:

پنج هفته پس از پیوند سلولی، موش‌ها مطابق مرحله قبل بیهوش شدند و محل پیوند به آرامی باز شد. بر روی ژل‌های پیوند شده، بافت همبند و مقداری بافت چربی به همراه عروق خونی فراوان تشکیل شده بود که این عروق تا سطح ژل نفوذ کرده و نشان‌دهنده خون‌رسانی به سلول‌های موجود در ژل بود. تکه‌های ژل به همراه بافت‌های اطراف جدا شد و در داخل PBS^+ قرار گرفت. سپس بافت همبند تشکیل شده در اطراف آن به آرامی پاک گردید.

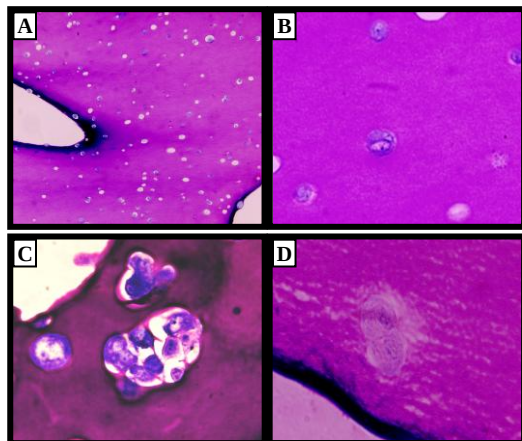


شکل ۱: پیوند زیر پوستی ژل آلژینیت حاوی سلول‌های مزانشیمی. (A) ایجاد برش در پوست، (B) قرار دادن ژل در محل، (C) بستن محل به وسیله بخیه، (D) خارج کردن پیوند جهت ارزیابی تمایز، پنج هفته پس از عمل.

گرد مشاهده شدند (شکل ۲A). در پاساژ یک، سلول‌های شناور و سلول‌های غیر دوکی به تعداد زیاد حذف شدند (شکل ۲B). در پاساژ دو، سلول‌های دوکی فیروپلاستی تقریباً خالص شدند (شکل ۲C).

رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو:

برش‌های ژل آلژینیت حاوی سلول‌های مزانشیمی، ۵ هفته پس از پیوند با تولوئیدین بلو رنگ‌آمیزی شد که در اثر آن ژل آلژینیت به رنگ بنفش درآمد (شکل ۳A). بر اساس تصاویر میکروسکوپی، در داخل ژل حفرات شبه لاکونایی به چشم می‌خورد. اغلب این حفرات حاوی یک سلول بیضی شکل با هسته‌ای نسبتاً کشیده بودند (شکل ۳B). این سلول معمولاً در تماس با آلژینیت اطراف خود بود. در برخی مناطق تجمع چند سلول در داخل یک حفره واحد مشاهده شد. در این تجمع، سلول‌ها با زوایدی به یکدیگر و به دیواره آلژینیته متصل بودند (شکل ۳C). در مواردی سلول در حال تقسیم مشاهده شد (شکل ۳D).



شکل شماره ۳: سلول‌های کشت شده در ژل آلژینیت پنج هفته پس از پیوند. A: ژل آلژینیت در اثر رنگ‌آمیزی با تولوئیدین بلو، بنفش رنگ شده است. سلول‌ها در حفرات شبه لاکونایی قرار گرفته‌اند. (بزرگ‌نمایی $\times 10$) B: این سلول‌ها اغلب مورفولوژی بیضی دارند (بزرگ‌نمایی $\times 20$). C: در بعضی مناطق تجمعات سلول‌ها در یک حفره لاکونایی واحد مشاهده شد (بزرگ‌نمایی $\times 40$). D: در بعضی موارد سلول‌ها در حال تقسیم مشاهده گردید (بزرگ‌نمایی $\times 40$).

RT-PCR:

نتایج بررسی مولکولی نشان داد که پنج هفته پس از

ماکرولیتر با dNTPs به حجم ۱۰ میکرولیتر و آنزیم DNA تک پلی‌مراز به حجم ۲/۵ میکرولیتر و ۱۰۰ پیکومول از آغازگرهای ژن‌های اختصاصی بافت غضروف که در جدول ۱ نشان داده شده است انجام شد.

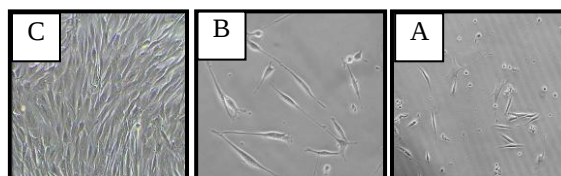
مطالعه فراساختار:

به منظور مطالعه فراساختار، ابتدا نمونه‌ها به کمک گلو تار آلدئید ۲/۵٪ به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ثبوت اولیه شدند و سپس در بافر فسفات سورنسون شسته شدند و ثبوت ثانویه به کمک محلول آبی ۱٪ ترا اکسید اسمیوم انجام شد (به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد). آن گاه نمونه‌ها در آگار ۱٪ مذاب قرار داده شدند و در زیر استریومیکروسکوپ به قطعات یک میلی‌متری بریده شدند. به کمک درجات مختلف الکل اتیلیک و استون به ترتیب عمل آبگیری و شفاف‌سازی انجام شد. پس از آن نمونه‌ها در رزین آرالدایت قالب‌گیری شدند. عمل پلی‌مریزاسیون در درجه حرارت 60°C و به مدت ۲۴ ساعت انجام شد و در انتها مقاطع ظریف ۷۰-۹۰ نانومتری تهیه شد. پس از رنگ‌آمیزی با سیترات سرب و استات آمونیوم در زیر میکروسکوپ الکترونی مشاهده گردید.

یافته‌ها

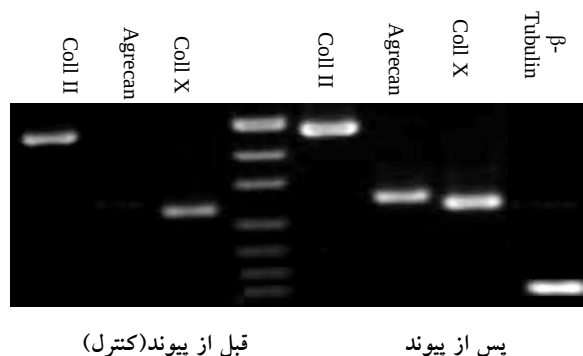
کشت سلول‌های مزانشیمی:

مشاهده کشت سلول با میکروسکوپ فاز کتراست معکوس نشان داد که در کشت اولیه، سلول‌ها به صورت هتروژن هستند. در این کشت، سلول‌های چسبیده به کف با اشکال ستاره‌ای، دوکی فیروپلاستی، چند ضلعی، پهن و

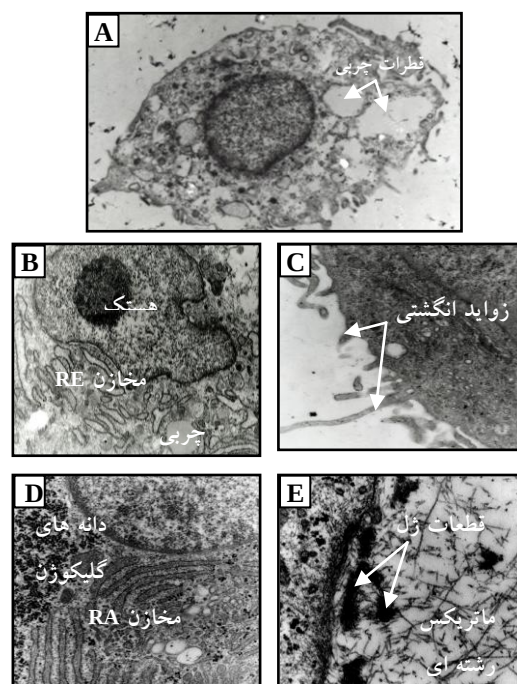


شکل ۴: کشت سلول‌های مزانشیمی، A: کشت اولیه سلول‌های هتروژن چند وجهی، دوکی و گرد (بزرگ‌نمایی $\times 20$)، B: پاساژ اولیه (سلول‌های دوکی بیشتر از سلول‌های دیگر) (بزرگ‌نمایی $\times 40$)، C: پاساژ دوم (جمعیت خالص از سلول‌های مزانشیمی (بزرگ‌نمایی $\times 20$)).

عمل پیوند، در سلول‌های کشت شده در داخل ژل آلژنیت، mRNA اگریکان (مجمع پروتئوگلیکانی ویژه غضروف) به مقدار زیادی تولید شده است. این ژن در سلول‌های پیش از پیوند بیانی نداشت. هم چنین با توجه به این نتایج، در سلول‌های ژل آلژنیت در پایان پیوند، ژن‌های کلاژن تیپ II



شکل ۴: بررسی بیان ژن‌های ویژه غضروف در ژل‌های حاوی سلول



شکل ۵: فراساختار سلول‌های تمایز یافته، A: سلول‌ها اغلب مورفولوژی بیضی شکل داشتند (بزرگ‌نمایی $\times 7000$). B: مخازن شبکه آندوپلاسمی خشن متسع بود و در مواردی قطرات چربی نیز در داخل سلول حضور داشت (بزرگ‌نمایی $\times 14000$). C: سطح آن‌ها دارای زوایدی بود (بزرگ‌نمایی $\times 12000$). D: در سیتوپلاسم سلول مقدار زیادی دانه‌های گلیکوژن تجمع داشت (بزرگ‌نمایی $\times 20000$). E: در خارج سلول ماتریکس رشته‌ای ترشح شده بود و قطعاتی از آلژنیت نیز وجود داشت (بزرگ‌نمایی $\times 24000$).

و X به مقدار زیادی بیان شده بود. البته این دو ژن در سلول‌های پیش از پیوند نیز به مقدار کمی بیان شده بود (شکل ۴). با توجه به این که سلول‌های کشت شده در داخل ژل آلژنیت به مدت یک هفته در داخل محیط کندروژنیک تیمار شدند، بیان آن‌ها در این سلول‌ها دور از انتظار نیست.

مطالعه فراساختار:

بر اساس تصاویر به دست آمده، سلول‌های کشت شده در ژل آلژنیت، ۵ هفته پس از پیوند زیر پوستی، اغلب مورفولوژی بیضی شکل داشتند. با توجه به این که قسمت اعظم ژل آلژنیت در اثر آماده سازی بافتی حذف شده بود، تنها قطعاتی از آن در موارد نادر در اطراف سلول قابل مشاهده بود. هسته سلول‌ها در مرکز یوکروماتین و در اطراف، در زیر پوشش هسته، هتروکروماتین بود (شکل A). هسته برخی سلول‌ها به وضوح قابل مشاهده بود و داخل سیتوپلاسم قطرات درشت چربی مشاهده می‌شد (شکل B) و در سطح سلول زواید انگشتی شکل وجود داشت (شکل C). شبکه آندوپلاسمی سلول، وسیع و کاملاً متسع بود. هم چنین در مواردی در داخل سیتوپلاسم سلول، گلیکوژن تجمع پیدا کرده بود (شکل D). در اطراف برخی از سلول‌ها ماتریکس رشته‌ای تجمع یافته بود و قطعاتی از ژل آلژنیت نیز به چشم می‌خورد (شکل E).

بحث

در مطالعه حاضر کندروژنیز سلول‌های مزانشیمی کشت شده در داخل ژل آلژنیت به صورت *in vivo* بررسی شده است. در این ارتباط تنها یک گزارش وجود دارد. ما و همکاران در سال ۲۰۰۵ سلول‌های مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان انسان را در داخل ژل آلژنیت، به مدت‌های متفاوت کشت دادند و سپس آن را در زیر پوست پشت موش پیوند زدند. این محققین تاثیر زمان‌های مختلف کشت *in vitro* را بر میزان تشکیل مناطق استخوانی شده در آلژنیت پیوند شده بررسی کردند و نتیجه گرفتند که اگر آلژنیت بیش از دو هفته در محیط کشت نگهداری

هیالین داشت. سلول‌ها در داخل حفرات شبه لاکونایی واقع بودند و در مواردی گروه‌های ایزوژنیک در حال شکل‌گیری بود (سلول واقع در یک لاکونا در حال تقسیم بود). تولید کلاژن تیپ II دلیل دیگری بر شبه هیالینی بودن غضروف حاصل بود (۲۵).

بررسی فراساختاری ما، حاکی از ماهیت کندروبلاستی سلول‌ها بود. با توجه به تصاویر میکروسکوپ الکترونی، سلول‌ها نمای فعالی داشتند که این قضیه در مورفولوژی و ارگانل‌های سلول‌ها به خوبی منعکس بود. سلول‌ها بیضی شکل بوده و شبکه آندوپلاسمی فراوان و متسعی داشتند و از طرفی سطح آن‌ها ناهموار بود. این خصوصیات، ویژگی‌های یک سلول کندروبلاست بوده و با سلول‌های غیر فعال کندروسیت که کم ارگانل است و مورفولوژی کشیده‌تری دارند، مغایر می‌باشد (۲۵).

ژل آلژینیت به شکل نیمه جامد بوده و از این نظر نسبت به داربست‌های دیگر، نظیر پلی لاکتیک اسید که کاملاً جامد و سفت است و آگارز که به شکل مایع می‌باشد، مزیت دارد. در ضایعات غضروفی بایستی از پلی‌مری استفاده کرد که قابلیت شکل‌پذیری داشته باشد و بتوان آن را به شکل محل ضایعه دیده غضروفی درآورد و از این نظر پلی‌مر پلی‌لاکتیک اسید که به راحتی شکل‌پذیر نیست، مناسب پیوند نمی‌باشد. از طرفی قرار دادن آگارز در محل ضایعه دیده غضروف مفصلی که معمولاً محل تحمل وزن است، به دلیل مایع بودن انجام نمی‌شود (۲۶). به همین دلیل بررسی کندروژنیز سلول‌های مزانشیمی در داخل ژل آلژینیت که به راحتی شکل‌پذیر است و کشت سلول مزانشیمی در آن به دلیل وضعیت سل آن در دمای معمولی به راحتی انجام می‌گیرد، اهمیت فراوانی دارد (۲۷). با توجه به نتایج تحقیق حاضر به نظر می‌رسد که این ترکیب (سلول مزانشیمی و ژل آلژینیت) کاندیدای مناسبی برای مقاصد سلول درمانی ضایعات غضروفی باشد.

نکته دیگری که این تحقیق داشت در ارتباط با شرایط لازم برای وقوع پدیده کندروژنیز است. مطالعات پیشین نشان داده است که یکی از شرایط مهم برای کندروژنیز، ایجاد تراکم سلولی در سلول‌های پیش‌ساز غضروفی است.

شود و بعد پیوند شود، مناطق استخوانی شده افزایش خواهد یافت (۲۰). هدف مطالعه حاضر کاملاً متفاوت بوده و عبارت بود از بررسی کندروژنیز سلول‌های مزانشیمی کشت شده در ژل آلژینیت پس از پیوند زیر پوستی در موش. در این ارتباط وقوع کندروژنیز با روش‌های مولکولی، هیستوشیمی و بررسی فراساختار مورد بررسی قرار گرفت و تایید شد.

نکته دیگری که تحقیق حاضر داشت، نوع سلول مورد استفاده بود. ما از سلول‌های مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان موش استفاده کردیم. این سلول‌ها با روش نوین کشت با تراکم کم جداسازی و تخلیص شدند. روش کار قبلاً در کار پیشین ما مفصل توضیح داده شده است (۲۳). در این مقاله ما نشان داده‌ایم که سلول‌هایی که با این روش جدا می‌شوند سلول بنیادی مزانشیمی با توان تمایز به سه رده استخوانی، غضروفی و چربی هستند. تحقیق حاضر نشان داد که این سلول‌ها این پتانسیل را دارند که در داخل ژل آلژینیت به صورت *in vivo* به سلول‌های غضروفی تمایز یابند که این قضیه به خوبی در آنالیز RT-PCR با تولید فراوان مارکرهای غضروفی به ویژه اگریکان به خوبی آشکار بود. در گروه کنترل ما این مولکول بیان نشد. باید توجه داشت که اگریکان، مارکر اختصاصی غضروف بوده و بیان آن در سلول‌های بنیادی مزانشیمی (بدون مواد القا کننده) می‌تواند بیانگر این نکته باشد که سلول‌های فوق کاملاً نابالغ (immature) نبوده و به طور خود به خود، تا حدودی در مسیر تمایز به غضروف وارد شده‌اند.

در این تحقیق از مدل حیوانی رت به منظور پیوند زیر پوستی استفاده شد به دلیل این که موش اولیه که مغز استخوان آن جداسازی می‌شد از بین می‌رفت، لذا برای پیوند زیر پوستی در هر دو صورت استفاده از موش سوری یا رت، نیاز به تضعیف کردن سیستم ایمنی بود (ایمنوساپرسینگ). با توجه به مقاوم‌تر بودن رت برای تضعیف سیستم ایمنی و هم چنین راحتی کار به دلیل بزرگ‌تر بودن جثه از این مدل حیوانی استفاده گردید.

با توجه به نتایج این مطالعه، بافت تولید شده نسبت به غضروف الاستیک و فیبرو شباهت زیادی به غضروف

تغذیه اتفاق می‌افتد (۲۹). شاید وقوع این پدیده، در سلول‌های کشت شده در داخل آلژنیت نیز به دلیل اختلالات تغذیه‌ای در زمان پیوند بوده باشد. به هر حال این موضوع به مطالعه بیشتری نیاز دارد.

نتیجه‌گیری

روی هم رفته می‌توان گفت که سلول‌های مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان موش به راحتی در داخل ژل آلژنیت و در شرایط *in vivo* زیر پوست، به بافتی شبیه غضروف هیالین تمایز می‌یابد که در این بافت نشانه‌هایی از آغاز استخوان‌سازی وجود دارد.

چنانچه این موضوع در تحقیقات آینده مورد توجه قرار گیرد و شرایطی فراهم شود که آغاز استخوان‌سازی در کشت کندروژنیزس مهار گردد، با توجه به شکل‌پذیری ژل آلژنیت و راحتی کشت سلول مزانشیمی در داخل آن، می‌توان امیدوار بود که در آینده بتوان از این ترکیب (ژل آلژنیت و سلول مزانشیمی) برای مقاصد سلول درمانی ضایعات غضروفی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر با حمایت‌های مالی سازمان گسترش و نوسازی صنایع انجام گرفته است. بدین وسیله نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین آن سازمان ابراز می‌دارند.

به طوری که در تکامل جوانه اندامی، سلول‌های مزانشیمی در آغاز غضروف‌زایی در محور مرکزی اندام تجمع یافته، فواصل بین آن‌ها حذف شده و متراکم می‌شوند (۲۸). هم چنین در محیط آزمایشگاهی نیز بدون تراکم سلولی، غضروف تشکیل نمی‌شود. به همین دلیل محققین با انجام سانتریفوژ، این تراکم را به طور مصنوعی ایجاد می‌کنند (۱۱). در مطالعه حاضر سلول‌های فیروبلاستی مزانشیمی بدون فراهم شدن تراکم سلولی و تنها در تماس با ژل آلژنیت به غضروف تمایز یافتند. به نظر می‌رسد که بر هم کنش سلول و ماکرومولکول‌های آلژنیت نیاز به تراکم سلولی را برطرف می‌کند.

یکی دیگر از نتایج جالب تحقیق حاضر، بیان بالای ژن کلاژن تیپ X در سلول‌های کشت شده در آلژنیت در پایان دوره ۵ هفته‌ای پیوند بود. مطالعات نشان داده است که بیان این ژن در سلول‌های غضروفی هیپرتروفه و در زمان شروع استخوان‌سازی داخل غضروفی افزایش می‌یابد (۲۹). با توجه به نتایج ما (بیان بالای ژن کلاژن X)، به نظر می‌رسد پیوند زیر پوستی سلول‌های کشت شده در داخل آلژنیت سبب شده تا سلول‌های فوق یک گام از تمایز کندروژنیزس فراتر رفته و به مرحله هیپرتروفه برسند. البته این پدیده نیاز به توضیح منطقی دارد. با توجه به این که در شرایط *in vivo* هیپرتروفه شدن سلول‌ها در زمان آغاز استئوژنیزس به دنبال تشکیل Collar Bone و مختل شدن

References:

- 1- Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. Instr Course Lect 1998; 47:487-504.
- 2- Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. Instr Course Lect 1998; 47:477-86.
- 3- Hangody L, Kish G, Karpati Z, Udvarhelyi I, Szigeti I, Bely M. Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice. Orthopedics 1998; 21(7):751-6.
- 4- Fortier LA, Nixon AJ, Williams J, Cable CS. Isolation and chondrocytic differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Am J Vet Res 1998; 59(9):1182-7.
- 5- Aston JE, Bentley G. Repair of articular surfaces by allografts of articular and growth-plate cartilage. J Bone Joint Surg Br 1986; 68(1):29-35.
- 6- Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upton J, Vacanti CA. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer - cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. Plast Reconstr Surg 1997; 100(2):297-302.
- 7- Freed LE, Marquis JC, Nohria A, Emmanuel J, Mikos AG, Langer R. Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. J Biomed Mater Res 1993; 27(1):11-23.
- 8- Paige KT, Cima LG, Yaremchuk MJ, Schloo BL, Vacanti JP, Vacanti CA. De novo cartilage generation using calcium alginate-chondrocyte constructs. Plast Reconstr Surg 1996; 97(1):168-78.
- 9- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. N Engl J Med 1994; 331(14):889-5.

- 10- Marijnissen WJ, Van Osch GJ, Aigner J, Verwoerd-Verhoef HL, Verhaar JA. Tissue-engineered cartilage using serially passaged articular chondrocytes. Chondrocytes in alginate, combined in vivo with a synthetic (E210) or biologic biodegradable carrier (DBM). *Biomaterials* 2000 ;21(6):571-80.
 - 11- Caplan AI, Elyaderani M, Mochizuki Y, Wakitani S, Goldberg VM. Principles of cartilage repair and regeneration. *Clin Orthop Relat Res* 1997; (342):254- 69.
 - 12- Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, *et al.* Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 2003;116(Pt 9):1827-35.
 - 13- Tropel P, Noel D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Berger F. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res* 2004 ; 295(2):395-406
 - 14- Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res* 2001;268(2):189-200.
 - 15- Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 ; 96(19):10711- 6.
 - 16- Sun S, Guo Z, Xiao X, Liu B, Liu X, Tang PH, Mao N. Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method. *J of Stem Cells* 2003; 1(5):527-35.
 - 17- Ma HL, Hung SC, Lin SY, Chen YL, Lo WH. Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulated in alginate beads. *J Biomed Mater Res A* 2003 ;64(2):273-81.
 - 18- Mehlhorn AT, Schmal H, Kaiser S, Lepski G, Finkenzeller G, Stark GB, *et al.* Mesenchymal stem cells maintain TGF-beta-mediated chondrogenic phenotype in alginate bead culture. *Tissue Eng* 2006 ; 12(6): 1393-1403.
 - 19- Steinert A, Weber M, Dimmler A, Julius C, Schutze N, Noth U, *et al.* Chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells encapsulated in ultrahigh-viscosity alginate. *J Orthop Res* 2003 ; 21(6): 1090- 7.
 - 20- Ma HL, Chen TH, Low-Tone Ho L, Hung SC. Neocartilage from human mesenchymal stem cells in alginate: implied timing of transplantation. *J Biomed Mater Res A* 2005 ; 74(3): 439- 46.
 - 21- Tropel P, Noel D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Berger F. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res* 2004;295(2):395-406.
 - 22- Modderman WE, Vrijheid-Lammers T, Lowik CW, Nijweide PJ. Removal of hematopoietic cells and macrophages from mouse bone marrow cultures: isolation of fibroblastlike stromal cells. *Exp Hematol* 1994;22(2):194-201.
 - 23- Eslaminejad MB, Nikmahzar A, Taghiyar L, Nadri S, Massumi M. Murine mesenchymal stem cells isolated by low density primary culture system. *Dev Growth Differ* 2006; 48(6):361- 70.
- ۲۴- باغبان اسلامی نژاد. م، نیک محضر. آ، ندری. ص، تقی یارل. جداسازی و تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان موش NMRI، بهار ۱۳۸۵، مجله پزشکی کوثر، دوره ۱۱، شماره ۱، صفحه ۲۹-۳۹.
- 25- Junqueira LC, Carneiro J, Kelly RO. Cartilage, basic histology. 7th edition. New Jersey: Connecticut, Appleton & Lange;1992:132-9.
 - 26- Selden C, Khalil M, Hodgson H. Three dimensional culture upregulates extracellular matrix protein expression in human liver cell lines-a step towards mimicking the liver in vivo? *Int J Artif Organs* 2000; 23(11):774-81.
 - 27- De Vos P, De Haan BJ, Wolters GH, Strubbe JH, Van Schilfgaarde R. Improved biocompatibility but limited graft survival after purification of alginate for microencapsulation of pancreatic islets. *Diabetologia* 1997; 40(3):262-70.
 - 28- Ballock RT, Reddi AH. Thyroxine is the serum factor that regulates morphogenesis of columnar cartilage from isolated chondrocytes in chemically defined medium. *J Cell Biol* 1994; 126(5):1311- 8.
 - 29- Hall BK. Chondrocyte diversity, bones and cartilage: developmental and evolutionary skeletal biology, 1st edition. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2005:301-312.

Subcutaneous transplantation of marrow-derived murine mesenchymal stem cells cultivated in alginate and their chondrogenesis

Baghaban Eslaminejad M.R.¹(PhD), Taghiyar L.¹(MS), Kiani S.²(PhD), Piryae A.³(PhD)

¹Royan Research Center

²Medical University of Shaheed Beheshti

³Tarbiat Modarres University

Abstract

Background and Objectives

Mesenchymal stem cells are appropriate candidates to treat diseases including articular cartilage defects. There are plenty of researches being conducted to make the application of these cells possible. The purpose of this study was to cultivate murine mesenchymal stem cells (MSCs) in alginate gel and transplant them subcutaneously to immuno-suppressed rats to examine their chondrogenic potential *in vivo*.

Materials and Methods

4-6 week old NMRI mice were sacrificed and their bone marrow cells were cultivated in 6-cell plates at the density of 500 cell/cm². The pure fibroblastic cells appeared after two passages. 2×10⁶ fibroblastic cells were mixed with 1 ml of alginate solution and converted into gel by being exposed to calcium chloride solution. MSCs-embedded alginate gel were then transplanted subcutaneously to 6 rats that had received an immunosuppressive drug (cyclosporine) for transplant rejection to be avoided. 5 weeks after transplantation, the alginate gels were removed and evaluated by histochemistry, RT-PCR for certain cartilage markers, and transmission electron microscopy.

Results

5 weeks after transplantation, the skin was incised and the alginate gel with its surrounding vascular connective tissue were removed. Tuloidine blue staining indicates that the cells within the gel assumed oval morphology and occupied lacuna-like cavities. RT-PCR analysis revealed that in these cells the mRNA of some cartilage markers such as collagen II (the marker of hyaline cartilage), collagen X (hypertrophied chondrocyte marker in osteogenesis), and aggrecan were largely produced. Ultra-thin sections analysis showed that the cells within the lacuna-like cavity of alginate gel contain a large amount of expanded rough endoplasmic reticulum and secret fibrillar extra cellular matrix.

Conclusions

Transplanted murine MSCs cultivated in alginate gel can differentiate into hyaline cartilage with the sign of osteogenic initiation.

Key words: Mesenchymal stem cells, Alginate, Transplantation
SJIBTO 2007; 4(2):105-114

Received: 10 Dec 2006

Accepted: 8 Jul 2007

Correspondence: Baghaban Eslaminejad M.R., PhD of Anatomy, Royan Research Center.
P.O.Box:4644-19325,Tehran, Iran. Tel: (+9821)22307963; Fax: (+9821)22310406
E-mail: bagesla@yahoo.com