خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۴ شماره ۲تابستان۸۶ (۱۱۴-۱۰۵)

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

دکتر محمدرضا باغبان اسلامی‌نژاد[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 آلژنیت 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 فیبروبلاستی مزانشیمی ظاهر شد. دو میلیون سلول مزانشیمی پاساژ دو، در یک میلی‌لیتر محلول آلژنیت 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 سایکلوسپورین 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 اگریکان 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.

نتیجه گیری

سلول‌های مزانشیمی کشت شده در داخل ژل آلژنیت، 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، آلژنیت، پیوند

تاریخ دریافت : ۸۵/ ۹/۱۹
تاریخ پذیرش : ۸۶/ ۴/۱۷

۱- مؤلف مسؤول: PhD علوم تشریح ـ استادیار پژوهشکده رویان ـ صندوق پستی: ۱۹۳۹۵-۴۶۴۴
۲- فوق‌لیسانس علوم تکوینی ـ پژوهشکده رویان
۳- دانشجوی PhD علوم تشریح ـ دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۴- دانشجوی PhD علوم تشریح ـ دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

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(۳، ۲).

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(۷، ۶).

پیج 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 تمایززدایی شده و خصوصیات ترشحی از جمله ماتریکس خارج سلولی حاوی اگریکان را از دست می‌دادند(۱۰، ۹). 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(۱۶-۱۳).

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 کندروژنزیس آن‌ها پس از پیوند در زیر پوست موش، مورد بررسی قرار گرفته است. وقوع کندروژنزیس با بررسی mRNA های داخل سلولی، مارکر غضروف و ماتریکس ترشح شده در خارج سلول انجام شده است. هم چنین 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 کندروژنزیس 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(۲۲، ۲۱).

ما در تحقیق پیشین خود، سلول‌های فوق را با روش

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

جدیـدی جـدا کـرده‌ایـم(۲۴، ۲۳). در مطالعـه حاضـر، کندروژنزیس *in vivo* آن‌ها را پس از کشت در داخـل ژل آلژنیت و پیوند در زیر پوست موش بررسی نمودیم.

مواد و روش‌ها

کشت سلول‌های MSCs مغز استخوان:

در مطالعه تجربـی حاضـر، سـلول‌هـای مزانشـیمی بـه روشی که در تحقیق پیشـین مـا ذکـر شـده، جداسـازی و تکثیر شدند(۲۴، ۲۳). به طور خلاصه، ۶ سر موش نر، نژاد NMRI به سـن تقریبـی ۸-۶ هفتـه بـه روش جابـه‌جـایی مهره‌های گردنی کشته شدند، سپس بـه وسـیله الکـل ۷۰٪ ضدعفونی شده و در شرایط کاملاً استریل، اسـتخوان‌هـای ران و ساق پای آن‌ها جـدا گردیـد. بافـت همبنـد اطـراف استخوان‌ها به طور کامل پاک شده و به زیـر هـود لامینـار منتقل شـد. سـپس بـا اسـتفاده از قیچـی اسـتریل دو سـر استخوان قطع گردید. مغز استخوان به کمک یک سرنگ و سر سوزن شماره ۱۸ که بـا محـیط DMEM (Dubleco's آلمـان؛ Modified Eagles Medium) حـاوی ۱۵٪ سـرم FBS(جیبکـــو؛ Fetal Bovine Serum)، ۱۰۰ واحـــد بین‌المللی آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و ۱۰۰ واحد بـین‌المللـی استرپتومایسین پر شده بود، به روش فلاشینگ در یک لوله ۱۵ میلی‌لیتر تخلیه گردید. در این مرحله مغز اسـتخوان بـا دور g ۱۲۰۰ سانتریفوژ شد تا پلیت سلولی تشکیل گـردد، سپس محیط رویی تخلیه شده و سلول‌هـا در ۱ میلـی‌لیتـر محیط DMEM تازه معلق شده و با استفاده از فـیش فیلتـر ۷۰ میکرومتری فیلتـر شـدند. در ایـن مرحلـه سـلول‌هـای حاصل از هر اسـتخوان دراز بـه کمـک لازم نئوبـار مـورد شمارش سلولی قرار گرفت و تعداد ۵۰۰ سلول در هر یک از خانه‌های ظروف کشت ۶ چـاهکی کشـت شـد. سـپس ظـرف حـاوی سـلول بـه انکوبـاتور بـا دمـای ۳۷ درجـه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2 منتقل گردید. بعـد از ۲ روز محـیط رویی خارج گردید و محـیط DMEM تـازه اضـافه شـد. محیط سلول‌ها هر ۴-۳ روز یک بـار بـه مـدت دو هفتـه، تعویض شد و سپس پاساژ اول صـورت گرفـت. بـه ایـن ترتیب که سـلول‌هـا بـا اسـتفاده از Trypsin-EDTA ۰/۲٪ (جیبکو، آلمان) از کف ظرف کنده شد و به نسبت ۳ در ۱ در فلاسک‌های کشت ۲۵ سانتی‌متـری کشـت شـد(پاسـاژ 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. بـرای انجمـاد از ترکیب ۳۰٪ DMSO(دایمتیل سـولفات، آمریکـا، سـیگما)، ۵٪ FCS و ۶۵٪ DMEM اسـتفاده شـد. هـر فلاسـک ۲۵ سانتی‌متری به ۵ ویال انجماد تقسیم شد.

کشت سلول‌های MSCs در ژل آلژنیت:

دو میلیون سـلول mMSCs پـس از شـمارش، در یـک میلی‌لیتر محلول آلژنیـت(سـیگما، آلمـان) معلـق شـد. ژل حاوی سلول به یک ظرف کشت ۱۲ خانـه‌ای منتقـل شـد. سپس محلول $CaCl_2$ به حجم ۲ میلی‌لیتر به ظـرف کشـت اضافه شد تا مایع آلژنیت در حضور یون‌های کلسیم به فرم ژل درآید. پس از ۲۰ دقیقه، ژل دوبـار بـا محلـول $PBS6^+$ شسته شـد و محـیط تمـایز کنـدروژنیک شـامل DMEM حـاوی ۱۰ نـانوگرم فـاکتور رشـد TGF-β3 (سـیگما، Transforming Growth Factor-β3)، ۱۰ نانـوگـــرم BMP-6 (Bone Morphogenetic Protein-6)، ۵۰ میلـی‌گـرم TS premix+ (Transferrin / Selenium)، ۵/۳۵ میلی‌گـرم لینولئیـک اسـید و ۱/۲۵ میلـی‌گـرم BSA (Bovine Serum Albomin) و ۱٪ FBS بـه حجـم ۱ میلی‌لیتر به آن اضافه گردید. سلول‌ها به مدت یک هفته بـا محیط کندروژنیک تیمار شدند و سـپس بـه صـورت زیـر پوستی به ۶ سر رت پیوند شدند.

پیوند:

به منظور تضعیف سیستم ایمنـی رت‌هـای نـر(بـه وزن تقریبـــی ۲۵۰-۲۰۰ گـــرم)گیرنـــده پیونـــد، از داروی سایکلوسپورین(نوارتیس، سوئیس) به صورت تزریـق زیـر پوستی(یک میلی‌لیتر در روز) استفاده شد. این کار از یـک روز پیش از عمل آغاز شد و تا زمان خارج کردن ژل ادامه یافـت. سایکلوسـپورین بـه نسـبت ۱ بـه ۱ از محلـول سایکلوسپورین در الکل مطلق تهیه شد و ۱ میلـی‌لیتـر بـه ازای ۲۰۰ گـرم وزن حیـوان تزریـق شـد. در روز پیونـد حیوان به کمک داروی بیهوشی به حجم ۳ بـه ۱ کتـامین ـ زایلزین(آلفاسان، هلند) بیهـوش شـد. محـل پیونـد پشـت گردن در بیـن گوش‌هـا بـا الکل ۷۰٪ ضدعفونی شد و به

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

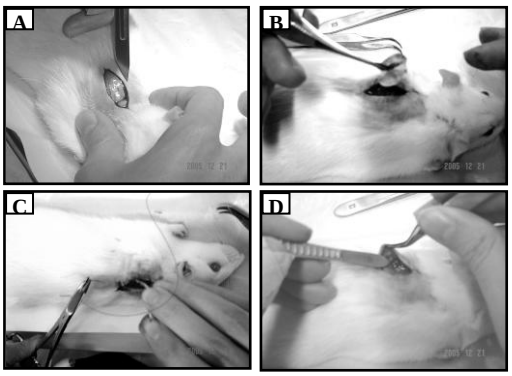
جدول ۱: آغازگرهای ژن‌های اختصاصی بافت غضروف

(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'

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 آلژنیت 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.

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 آلژنیت به کمک میکروسکوپ نوری، ژل‌های مورد نظر ابتدا دوبار با محلول PBS^+ شستشو داده شد، به مدت ۲ ساعت در پارافرمالدئید 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 X,II و 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 آلژنیت حل شود. سپس سلول‌ها به کمک سانتریفوژ با دور g ۱۲۰۰ 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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

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.

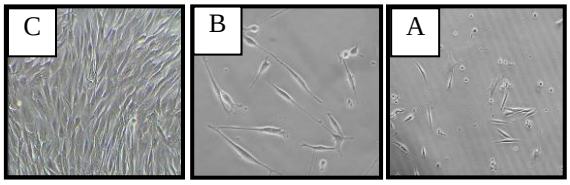
مطالعه فراساختار:

به منظور مطالعه فراساختار، ابتدا نمونه‌ها به کمک گلوتارآلدئید 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٪ تترا 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 ۶۰°C و به مدت ۲۴ ساعت انجام شد و در انتها مقاطع ظریف ۹۰-۷۰ 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 کنتراست معکوس نشان داد که در کشت اولیه، سلول‌ها به صورت هتروژن هستند. در این کشت، سلول‌های چسبیده به کف با اشکال ستاره‌ای، دوکی فیبروبلاستی، چند ضلعی، پهن و

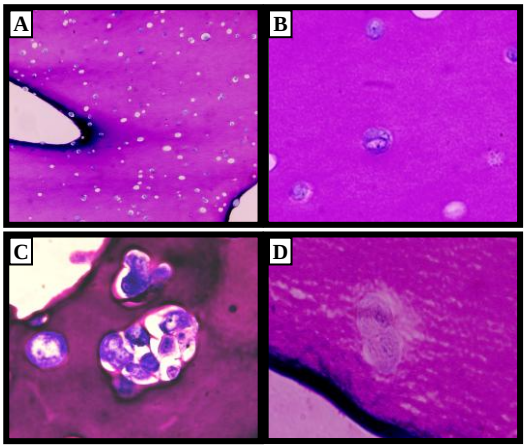


شکل ۲: کشت سلول‌های مزانشیمی، A: کشت اولیه سلول‌های هتروژن چند وجهی، دوکی و گرد(بزرگ‌نمایی× ۲۰)، B: پاساژ اولیه(سلول‌های دوکی بیشتر از سلول‌های دیگر)(بزرگ‌نمایی×۴۰)، C: پاساژ دوم(جمعیت خالص از سلول‌های مزانشیمی (بزرگ‌نمایی×۲۰).

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 فیبروبلاستی تقریباً خالص شدند(شکل ۲C).

رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو:

برش‌های ژل آلژنیت حاوی سلول‌های مزانشیمی، ۵ هفته پس از پیوند با تولوئیدن بلو رنگ‌آمیزی شد که در اثر آن ژل آلژنیت 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 آلژنیت اطراف خود بود. در برخی مناطق تجمع چند سلول در داخل یک حفره واحد مشاهده شد. در این تجمع، سلول‌ها با زوائدی به یکدیگر و به دیواره آلژنیتی متصل بودند(شکل ۳C). در مواردی سلول در حال تقسیم مشاهده شد(شکل ۳D).



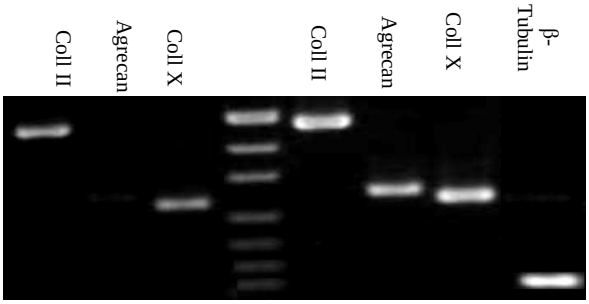
شکل شماره ۳: سلول‌های کشت شده در ژل آلژنیت پنج هفته پس از پیوند. A: ژل آلژنیت در اثر رنگ‌آمیزی با تولوئیدن بلو، بنفش رنگ شده است. سلول‌ها در حفرات شبه لاکونایی قرار گرفته‌اند. (بزرگ‌نمایی× ۱۰) B: این سلول‌ها اغلب مورفولوژی بیضوی دارند(بزرگ‌نمایی×۲۰). C: در بعضی مناطق تجمعات سلول‌ها در یک حفره لاکونایی واحد مشاهده شد(بزرگ‌نمایی×۴۰). D: در بعضی موارد سلول‌ها در حال تقسیم مشاهده گردید (بزرگ‌نمایی×۴۰).

RT-PCR:

نتایج بررسی مولکولی نشان داد که پنج هفته پس از

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

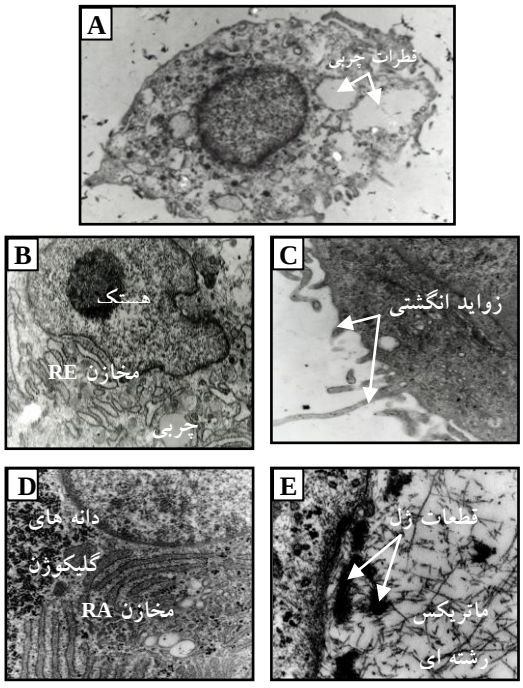
عمل پیوند، در سلول‌های کشت شده در داخل ژل آلژنیت، mRNA اگریکان(مجتمع پروتئوگلیکانی ویژه غضروف) به مقدار زیادی تولید شده است. این ژن در سلول‌های پیش از پیوند بیانی نداشت. هم چنین با توجه به این نتایج، در سلول‌های ژل آلژنیت در پایان پیوند، ژن‌های کلاژن تیپ II و X به مقدار زیادی بیان شده بود. البته این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



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

مطالعه فراساختار:

بر اساس تصاویر به دست آمده، سلول‌های کشت شده در ژل آلژنیت، ۵ هفته پس از پیوند زیر پوستی، اغلب مرفولوژی 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 A۵). هستک برخی سلول‌ها به وضوح قابل مشاهده بود و داخل سیتوپلاسم قطرات درشت چربی مشاهده می‌شد(شکل ۵B) و در سطح سلول زوائد انگشتی شکل وجود داشت(شکل ۵C). شبکه اندوپلاسمی سلول، وسیع و کاملاً متسع بود. هم چنین در مواردی در داخل سیتوپلاسم سلول، گلیکوژن تجمع پیدا کرده بود(شکل ۵D). در اطراف برخی از سلول‌ها ماتریکس رشته‌ای تجمع یافته بود و قطعاتی از ژل آلژنیت نیز به چشم می‌خورد(شکل ۵E).



شکل ۵: فراساختار سلول‌های تمایز یافته، A: سلول‌ها اغلب مورفولوژی بیضی شکل داشتند(بزرگ‌نمایی×۷۰۰۰)، B: مخازن شبکه آندوپلاسمی خشن متسع بود و در مواردی قطرات چربی نیز در داخل سلول حضور داشت(بزرگ‌نمایی×۱۴۰۰۰) C: سطح آن‌ها دارای زوائدی بود(بزرگ‌نمایی×۱۲۰۰۰) D: در سیتوپلاسم سلول مقدار زیادی دانه‌های گلیکوژن تجمع داشت(بزرگ‌نمایی×۲۰۰۰۰)، E: در خارج سلول ماتریکس رشته‌ای ترشح شده بود و قطعاتی از آلژنیت نیز وجود داشت(بزرگ‌نمایی×۲۴۰۰۰).

بحث

در مطالعه حاضر کندروژنزیس 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 unde 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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

شود و بعد پیوند شود، مناطق استخوانی شده افزایش خواهد یافت(۲۰). هدف مطالعه حاضر کاملاً متفاوت بوده و عبارت بود از بررسی کندروژنزیس سلول‌های مزانشیمی کشت شده در ژل آلژنیت پس از پیوند زیر پوستی در موش. در این ارتباط وقوع کندروژنزیس 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 آلژنیت 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 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 آلژنیت 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 شکل پذیر 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 کندروژنزیس سلول‌های مزانشیمی در داخل ژل آلژنیت 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 آلژنیت) کاندیدای مناسبی برای مقاصد سلول درمانی ضایعات غضروفی باشد.

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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

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 فیبروبلاستی 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 استخوان سازی 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 کندروژنزیس 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 استئوژنزیس به دنبال تشکیل Collar Bone و مختل شدن 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 کندروژنزیس 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. بدین‌وسیله نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسؤولین آن سازمان ابراز می‌دارند.

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, Emmanual 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.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

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, Kortesidis 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, Bergar 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 hematopoetic cells and macrophages from mouse bone marrow cultures: isolation of fibrobalstlike 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 یار.ل. جداسازی و تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان موش NMRI ،بهار ۱۳۸۵، مجله پزشکی کوثر، دوره۱۱،شماره ۱ ،صفحه ۳۹-۲۹.
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.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

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), Piryaee A.[3](PhD)

[1]Royan Research Center
[2]Medical University of Shaheed Beheshti
[3]Tarbiat 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/cm^2. The pure fibroblastic cells appeared after two passages. 2×10^6 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 aggreacan 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*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]