

خون

فصلنامه علمی تحقیقاتی

دوره ۴ شماره ۲ تابستان ۸۶ (۱۴۰۵-۱۴۱۴)

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

دکتر محمدرضا باغبان اسلامی نژاد^۱، لیلا تقی‌یار^۱، سحر کیانی^۱، عباس پیری‌ایی^۱

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 آلتزینت 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 ۴-۶ 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 آلتزینت 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 لحظه تمایز به غضروف با روش‌های ایمونوستیتوشیمی (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 لاقونا واقع شده‌اند و مورفو‌لوزی بیضی شکل دارند. نتایج RT-PCR نشان داد که، مارکرهای غضروفی از جمله mRNA کلاظن تیپ II (مارکر غضروف هیالین)، X (مارکر کندروسیت‌های هپیرتروفه 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.

نتیجه‌گیری

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

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، آلتزینت، پیوند

تاریخ دریافت: ۹/۱۹/۱۴۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۷/۴/۱۴۰۶

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

۲- فوق لیسانس علوم تکوینی - پژوهشکده رویان

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

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

۴۹۶

در کشت تک لایه به منظور تکثیر، کندروسیت‌ها دچار تمایز زدایی شده و خصوصیات ترشحی از جمله ماتریکس خارج سلولی حاوی اگریکان 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 کلارن 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 آژنیت مورد بررسی قرار گرفته است، ولی در ارتباط با پیوند سلول‌های مزانشیمی کشت شده در داخل ژل آژنیت، مطالعات بسیار اندک است(۲۰-۲۱).

در مطالعه حاضر این مبحث مورد توجه قرار گرفته است بدین ترتیب که سلول‌های مزانشیمی به شکل سه بعدی در داخل ژل آژنیت کشت شده و کندروژنیس آن‌ها پس از پیوند در زیر پوست موش، مورد بررسی قرار گرفته است. وقوع کندروژنیس با بررسی mRNA های داخل سلولی، مارکر غضروف و ماتریکس ترشح شده در خارج سلول انجام شده است. هم چنین به منظور بررسی مورفوژوئزی، بخشی از بافت پیونده زده شده خارج گردیده و فرآختار آن با روش میکروسکوپ الکترونی گذاره مورد بررسی قرار گرفته است. در این تحقیق، برای بررسی کندروژنیس در ژل آژنیت 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، ۲۳).

ما در تحقیق پیشین خود، سلول‌های فوق را با روش

ضایعات غضروف مفصلی از جمله بیماری‌های شایع در افراد میانسال و سالمند است(۱). غضروف آسیب دیده با 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 ارتقای 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 آژنیت یکی از پلی‌ساکاریدهای طبیعی است که از جلبک قهقهه‌ای 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 آژنیت برداشت 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

یک). دو هفته پس از پاساژ اول، پاساژ دوم انجام شد. این سلول‌ها پس از پر کردن کف طرف کشت، منجمد شدند و در مرحله بعدی تحقیق استفاده گردیدند. برای انجماد از ترکیب 30% DMSO (دایمیتیل سولفات، آمریکا، سیگما)، 5% FCS و 65% DMEM استفاده شد. هر فلاسک 25 سانتی‌متری به 5 ویال انجماد تقسیم شد.

کشت سلول‌های *MSCs* در ژل آژنیت:

دو میلیون سلول mMSCs پس از شمارش، در یک میلی‌لیتر محلول آژنیت (سیگما، آلمان) معلق شد. ژل حاوی سلول به یک ظرف کشت 12 خانه‌ای منتقل شد. سپس محلول CaCl_2 به حجم 2 میلی‌لیتر به ظرف کشت اضافه شد تا مایع آژنیت در حضور یون‌های کلسیم به فرم ژل درآید. پس از 20 دقیقه، ژل دوبار با محلول PBS^+ شسته شد و محیط تمایز کندروژنیک شامل DMEM حاوی 10 نانوگرم فاکتور رشد $\text{TGF-}\beta 3$ (سیگما، 50% BMP-6 (Bone Morphogenetic Protein-6)، 10% $\text{Transforming Growth Factor-}\beta 3$ میلی‌گرم $\text{Transferrin / Selenium}$ + premix TS $5/35$ میلی‌گرم لینولئیک اسید و $1/25$ میلی‌گرم BSA به 1% FBS (Bovine Serum Albomin) میلی‌لیتر به آن اضافه گردید. سلول‌ها به مدت یک هفته با محیط کندروژنیک تیمار شدند و سپس به صورت زیر پوستی به 6 سررت پیوند شدند.

پیوند:

به منظور تضعیف سیستم ایمنی رت‌های نر (به وزن تقریبی $200-250$ گرم) گیرنده پیوند، از داروی سایکلوسپورین (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. سایکلوسپورین به نسبت 1 به 1 از محلول سایکلوسپورین در الکل مطلق تهیه شد و 1 میلی‌لیتر به ازای 200 گرم وزن حیوان تزریق شد. در روز پیوند حیوان به کمک داروی بیهوشی به حجم 3 به 1 کتابین - زایلزین (آلفاسان، هلند) بیهوش شد. محل پیوند پشت گردن در بین گوش‌ها با الکل 70% ضدغونی شد و به

جدیدی جدا کرده‌ایم ($23, 24$). در مطالعه حاضر، کندروژنریس *in vivo* آن‌ها را پس از کشت در داخل ژل آژنیت و پیوند در زیر پوست موش بررسی نمودیم.

مواد و روش‌ها

کشت سلول‌های *MSCs* مغز استخوان:

در مطالعه تجربی حاضر، سلول‌های مزانشیمی به روشنی که در تحقیق پیشین ما ذکر شده، جداسازی و تکثیر شدند ($23, 24$). به طور خلاصه، 6 سر موش نر، نژاد NMRI به سن تقریبی $6-8$ هفته به روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شدند، سپس به وسیله الکل 70% ضدغونی 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 18 که با محیط 15% سرم آلمان؛ (Modified Eagles Medium) حاوی 100% FBS (جييكو؛ Fetal Bovine Serum) واحد بین‌المللی بین‌المللی آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و 100 واحد بین‌المللی استرپتومایسین پر شده بود، به روش فلاشینگ در یک لوله 15 میلی‌لیتر تخلیه گردید. در این مرحله مغز استخوان با دور $g 1200$ سانتی‌میکرومتر شد تا پلیت سلولی تشکیل گردد، سپس محیط رویی تخلیه شده و سلول‌ها در 1 میلی‌لیتر محیط DMEM تازه معلق شده و با استفاده از فیش فیلتر 70 میکرومتری فیلتر شدند. در این مرحله سلول‌های حاصل از هر استخوان دراز به کمک لازم نوبار مورد شمارش سلولی قرار گرفت و تعداد 500 سلول در هر یک از خانه‌های ظروف کشت 6 چاهکی کشت شد. سپس ظرف حاوی سلول به انکوباتور با دمای 37 درجه سانتی‌گراد و $5\% \text{CO}_2$ منتقل گردید. بعد از 2 روز محیط رویی خارج گردید و محیط DMEM تازه اضافه شد. محیط سلول‌ها هر $3-4$ روز یک بار به مدت دو هفته، تعویض شد و سپس پاساژ اول صورت گرفت. به این ترتیب که سلول‌ها با استفاده از $1/2$ Trypsin-EDTA (جييكو، آلمان) از کف ظرف کنده شد و به نسبت 3 در 1 در فلاسک‌های کشت 25 سانتی‌متری کشت شد (پاساژ

جدول ۱: آغازگرهای ژن‌های اختصاصی بافت غضروف

(۳۳۱ bp) Collagen type II	Forward primer 5'-GGCTTAGGGCAGAGA GAG AAG G-3' Reverse primer 5' - TGGACAGTAGACGGAGGA AAGTC-3'
(۱۰۰ bp) Collagen type X	Forward primer 5' – CAG CAG CAT TAC GAC CCA AG-3' Reverse primer 5' – CCTGAGAAGGACGAGTGGAC-3'
(۳۲۴ bp) 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 برش گیری 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).

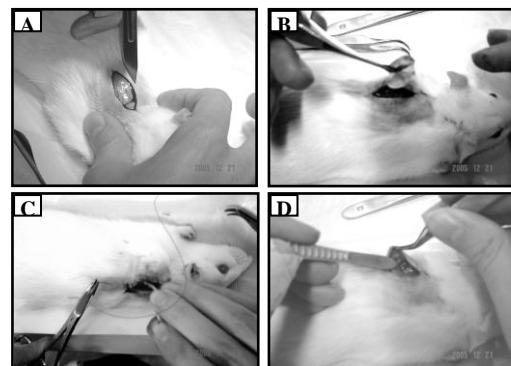
رنگ آمیزی تولوئیدن بلو: برای مطالعه تمایز به غضروف سلول‌های کشت شده درون ژل آلتنتیت به کمک میکروسکوپ نوری، ژل‌های مورد نظر ابتدا دوبار با محلول PBS⁺ شستشو داده شد، به مدت ۲ ساعت در پارافرمالدئید ۴٪ فیکس شد و پس از انجام مرحله آبگیری و تهیه بلوک پارافینی، برش‌های ۵ میکرومتری تهیه گردید و لامهای به دست آمده با استفاده از رنگ تولوئیدن بلو رنگ آمیزی 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 آلتنتیت حل شود. سپس سلول‌ها به کمک سانتریفوژ با دور ۱۲۰۰ g ۱۰۰ تنه‌شین 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 تیغه تراشیده شد. سپس برشی به طول ۲-۳ 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 سلوالی، 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.

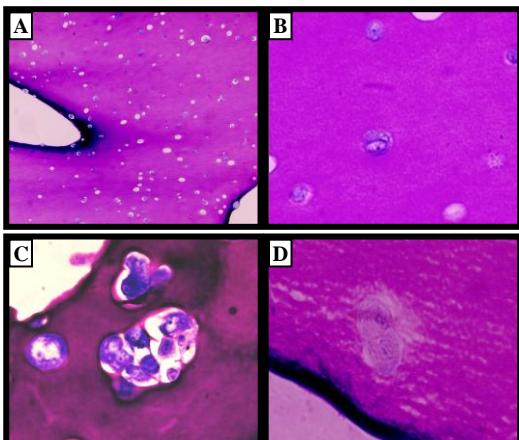


شکل ۱: پیوند زیر پوستی ژل آلتنتیت حاوی سلول‌های مزانشیمی. (A) ایجاد برش در پوست، (B) قرار دادن ژل در محل، (C) بستن محل به وسیله بخیه، (D) خارج کردن پیوند جهت ارزیابی تمایز، پنج هفته پس از عمل.

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

رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو:

برش‌های ژل آژنیت حاوی سلول‌های مزانشیمی، ۵ هفت‌ه پس از پیوند با تولوئیدن بلو رنگ‌آمیزی شد که در اثر آن ژل آژنیت 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 ییضی شکل با هسته‌ای نسبتاً کشیده بودند(شکل ۳B). این سلول معمولاً در تماس با آژنیت 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 آژنیتی متصل بودند(شکل ۳C). در مواردی سلول در حال تقسیم مشاهده شد(شکل ۳D).



شکل شماره ۳: سلول‌های کشت شده در ژل آژنیت پنج هفت‌ه پس از پیوند. A: ژل آژنیت در اثر رنگ‌آمیزی با تولوئیدن بلو، بنفش رنگ شده است. سلول‌ها در حفرات شبه لاکونایی قرار گرفته‌اند. (بزرگنمایی $\times 10$). B: این سلول‌ها اغلب مورفو‌لوزی ییضی 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 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.

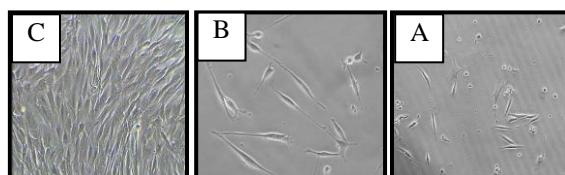
مطالعه فراساختار:

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 استریو میکروسکوپ به قطعات یک میلی‌متری بریده شدند. به کمک درجات مختلف الكل 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 انتهای مقاطع طریف 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 فیبروبلاستی، چند ضلعی، پهن و



شکل ۲: کشت سلول‌های مزانشیمی، A: کشت اولیه سلول‌های هتروژن چند وجهی، دوکی و گرد(بزرگنمایی $\times 20$)، B: پاساز اولیه(سلول‌های دوکی بیشتر از سلول‌های دیگر) (بزرگنمایی $\times 40$)، C: پاساز دوم(جمعیت خالص از سلول‌های مزانشیمی (بزرگنمایی $\times 20$)).

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 آژنیت به مدت یک هفته در داخل محیط کندروژنیک تیمار شدند، بیان آن‌ها در این سلول‌ها دور از انتظار نیست.

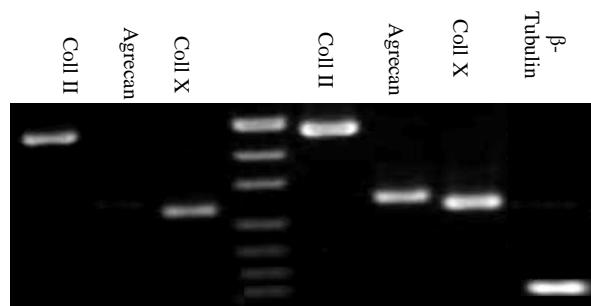
مطالعه فراساختار:

بر اساس تصاویر به دست آمده، سلول‌های کشت شده در ژل آژنیت، ۵ هفته پس از پیوند زیر پوستی، اغلب مرغولوژی بیضی شکل داشتند. با توجه به این که قسمت اعظم ژل آژنیت 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). هستک برخی سلول‌ها به وضوح قابل مشاهده بود و داخل سیتوپلاسم قطرات درشت چربی مشاهده می‌شد(شکل B) و در سطح سلول زوائد 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 آژنیت نیز به چشم می‌خورد(شکل E).

بحث

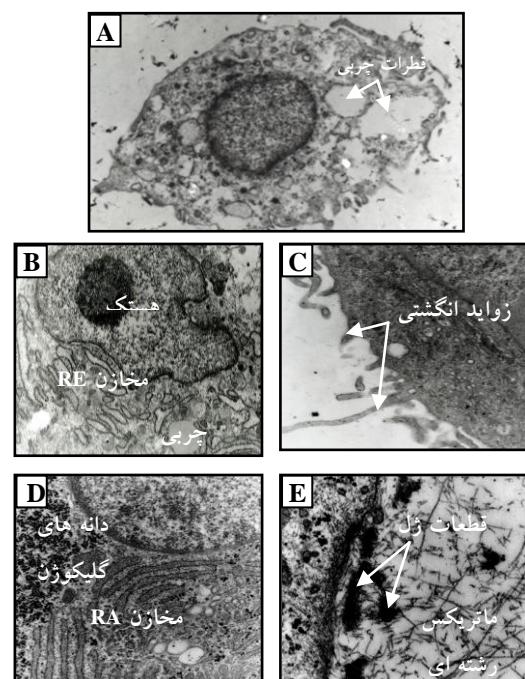
در مطالعه حاضر کندروژنیس سلول‌های مزانشیمی کشت شده در داخل ژل آژنیت به صورت *in vivo* بررسی شده است. در این ارتباط تنها یک گزارش وجود دارد. ما و همکاران در سال ۲۰۰۵ سلول‌های مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان انسان را در داخل ژل آژنیت، به مدت‌های متفاوت کشت دادند و سپس آن را در زیر پوست پشت موش unde پیوند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

عمل پیوند، در سلول‌های کشت شده در داخل ژل آژنیت، 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 آژنیت در پایان پیوند، ژن‌های کلاژن تیپ II



قبل از پیوند

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



شکل ۵: فراساختار سلول‌های تمایز یافته، A: سلول‌ها اغلب مرغولوژی 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 زوائد 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 آژنیت نیز وجود داشت(بزرگنمایی $\times 24000$)。

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 غیرفعال کندروسیت که کم ارگانل است و مورفولوژی کشیده‌تری دارند، مغایر می‌باشد (۲۵).

ژل آژنیت به شکل نیمه جامد بوده و از این نظر نسبت به داربست‌های دیگر، نظریه پلی لاکتیک اسید که کاملاً جامد و سفت است و آکارز که به شکل مایع می‌باشد، مزیت دارد. در ضایعات غضروفی باقیستی از پلیمری استفاده کرد که قابلیت شکل‌پذیری داشته باشد و بتوان آن را به شکل محل ضایعه دیده غضروفی درآورد و از این نظر پلیمری مربوط به شکل پذیری اسید که به راحتی شکل پذیر نیست، مناسب پیوند نمی‌باشد. از طرفی قرار دادن آکارز در محل ضایعه دیده غضروف مفصلی که معمولاً محل تحمل وزن است، به دلیل مایع بودن انجام نمی‌شود (۲۶). به همین دلیل بررسی کندروزنیس سلول‌های مزانشیمی در داخل ژل آژنیت 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 آژنیت) کاندیدای مناسبی برای مقاصد سلول درمانی ضایعات غضروفی باشد.

نکته دیگری که این تحقیق داشت در ارتباط با شرایط لازم برای وقوع پدیده کندروزنیس است. مطالعات پیشین نشان داده است که یکی از شرایط مهم برای کندروزنیس، 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 کندروزنیس سلول‌های مزانشیمی کشت شده در ژل آژنیت پس از پیوند زیر پوستی در موش. در این ارتباط وقوع کندروزنیس 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 آژنیت 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 (ایمنوساپرینگ). با توجه به مقاومت 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 شباht زیادی به غضروف

تعذیب اتفاق می‌افتد(۲۹). شاید وقوع این پدیده، در سلول‌های کشت شده در داخل آژنیت نیز به دلیل اختلالات تعذیبی‌ای 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 آژنیت 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 کندروژنریس مهار گردد، با توجه به شکل پذیری ژل آژنیت و راحتی کشت سلول مزانشیمی در داخل آن، می‌توان امیدوار بود که در آینده بتوان از این ترکیب(ژل آژنیت 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 نویسنگان مقاله مرتب تقدیر و تشکر خود را از مسؤولین 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 فیبروبلاستی مزانشیمی بدون فراهم شدن تراکم سلولی و تنها در تماس با ژل آژنیت به غضروف تمایز یافتد. به نظر می‌رسد که بر هم کنش سلول و ماکرومولکول‌های آژنیت نیاز به تراکم سلولی را برطرف می‌کند.

یکی دیگر از نتایج جالب تحقیق حاضر، بیان بالای ژن کلارزن تیپ X در سلول‌های کشت شده در آژنیت در پایان دوره ۵ هفتاهی پیوند بود. مطالعات نشان داده است که بیان این ژن در سلول‌های غضروفی هیپرترووفه و در زمان شروع استخوان‌سازی داخل غضروفی افزایش می‌یابد(۲۹). با توجه به نتایج ما(بیان بالای ژن کلارزن X)، به نظر می‌رسد پیوند زیر پوستی سلول‌های کشت شده در داخل آژنیت سبب شده تا سلول‌های فوق یک گام از تمایز کندروژنریس فراتر رفته و به مرحله هیپرترووفه برسند. البته این پدیده نیاز به توضیح منطقی دارد. با توجه به این که در شرایط *in vivo* هیپرترووفه شدن سلول‌ها در زمان آغاز استئوژنریس 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- Marijissen 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, 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- باغیان 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), Piryaee 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. 2×10^6 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 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