

بررسی تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان موش به غضروف در کشت سه بعدی با استفاده از ژل آلژینت

محمد رضا باغبان اسلامی نژاد^ک، Ph.D.، لیلا تقی یار*، M.Sc.

چکیده

هدف: هدف از انجام این مطالعه کشت سه بعدی سلولهای بنیادی مزانشیمی موشی در داخل ژل آلژینت و بررسی تمایز به غضروف آن می باشد.

روش بررسی: موشهای NMRI با سن تقریبی ۴-۶ هفته قربانی شدند و سلولهای مغز استخوان آنها با تراکم کم (به تعداد ۵۰۰ سلول در هر خانه از ظروف ۶ خانه ای) کشت شد. با انجام دو پاساژ متوالی، جمعیت خالصی از سلولهای فیبروبلاستی ظاهر شد. به منظور کشت سه بعدی و تمایز به غضروف، ده میلیون سلول حاصل از پاساژ دو، در ده میلی لیتر محلول آلژینت معلق شد و سوسپانسیون حاصل به ده قسمت مساوی تقسیم شد و در ظروف ۱۲ خانه ای توزیع گردید. با استفاده از محلول کلرید کلسیم، سوسپانسیون سلولهای مزانشیمی به حالت ژل در آمد. به منظور تمایز به غضروف، محیط کندروژنیک حاوی ۱۰ نانو گرم فاکتور رشد TGF- β 3 و ۱۰ نانوگرم BMP-6 به ژل حاوی سلولهای مزانشیمی اضافه شد. در پایان مدت کشت (۳ هفته)، وقوع تمایز با بهره گیری از روشهای رنگ آمیزی اختصاصی تولوئیدین بلو، تکنیک RT-PCR و فراساختار مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: در کشت اولیه سلولهایی با مورفولوژی چند ضلعی، کشیده، پهن و دوکی مشاهده شد. با انجام اولین پاساژ، جمعیت نسبتاً خالصی از سلولهای دوکی ظاهر شد و دومین پاساژ سبب شد تا به اندازه کافی سلول برای مرحله بعدی مطالعه فراهم شود. نتایج رنگ آمیزی تولوئیدین بلو نشان داد که سلولها در درون ژل در داخل ساختارهای شبه لاکونایی قرار گرفته اند و اطراف آنها، با مناطق متاکروماتیک احاطه شده است. ژل آلژینت خود به حالت متاکروماتیک ظاهر شد. همچنین نتایج RT-PCR نشان داد که mRNA کلاژن تایپ II، X و aggrecan به میزان زیادی در سلولهای تمایز یافته تولید شده است. از طرفی بررسی برشهای ظریف حاکی از این بود که سلولهای تمایز یافته در مرکز کشت سه بعدی، دارای دستگاههای ترشحی رشد کرده بودند که بیانگر وضعیت نسبتاً فعال آنها بود.

نتیجه گیری: سلولهای مزانشیمی موشی، در کشت سه بعدی در داخل ژل آلژینت، به راحتی فنوتیپ غضروف را کسب می نمایند. نکته جالب توجه این است که در پایان دوره تمایز، سلولها از لحاظ فراساختاری فعال به نظر می رسند.

واژه های کلیدی: سلولهای بنیادی مزانشیمی، ژل آلژینت، کشت سه بعدی.

مقدمه

یکی از اختلالات شایع در افراد میان سال و بویژه سالمند، بیماریهای مربوط به غضروف مفصلی است. در اثر تحلیل رفتگی بافت غضروفی که بدنبال افزایش سن یا تروما عارض می‌شود، بیماری استئوآرتریت ایجاد می‌شود (۱). از طرفی به دلیل محدود بودن ترمیم طبیعی در غضروف، چنین بیماریهایی صعب‌العلاج محسوب می‌شوند. به همین دلیل محققین و جراحان همواره در صدد بودند تا راه حل مناسبی برای این مشکل پیدا کنند. امروزه، فناوریهای مهندسی بافت امیدهای زیادی را برای جبران عدم بازسازی غضروف بوجود آورده است (۲،۳).

استراتژی سلول درمانی یکی از راههای ارزشمند جهت درمان آسیب‌های غضروفی محسوب می‌شود برای این منظور، تاکنون منابع سلولی متفاوتی بکار گرفته شده است که یکی از آنها استفاده از کندروسیت‌های غضروف مفصلی است. از مشکلات بزرگ این سلولها می‌توان به محدود بودن تعداد آنها و تمایززدایی‌شان در محیط کشت اشاره کرد (۴). تحقیقات پیشین نشان داده است که کندروسیت‌ها در زمان کشت، در ظرف کمتر از یک هفته مورفولوژی خود را از دست می‌دهند (۵) و خصوصیات بیوشیمیایی آنها تغییر می‌یابد. مهمتر اینکه عملکرد سلول از لحاظ ترشح ماتریکس اختصاصی بافت غضروف متوقف می‌شود (۶).

سلول دیگری که کاندیدای ارزشمندی برای سلول درمانی محسوب می‌شود، سلولهای بنیادی مزانشیمی (MSCs) است. این سلولها چند توان بوده و قادر به ایجاد سلولهای استخوانی، چربی و غضروفی می‌باشند. سلولهای مزانشیمی براحتی از مغز استخوان قابل جداسازی بوده و در محیط آزمایشگاه قابل تکثیر هستند. این سلولها قادرند تحت شرایط مناسب به غضروف تمایز یابند (۷-۱۰). برای تمایز به غضروف سلولهای مزانشیمی دو تکنیک وجود دارد یکی سیستم کشت micromass است که به عنوان یک روش پایه تمایز در نظر گرفته می‌شود (۱۱) و دیگری سیستم کشت سلول بر روی یک داربست خاص است. عملکرد این داربست پوشاندن سلولها (encapsulation) و حفظ فنوتیپ تمایزی آنها برای مدت طولانی است (۱۲). در زمان کشت، سلولها به این

تگیه‌گاه چسبیده و ماتریکس ترشح می‌نمایند (۱۳،۱۴). یکی از داربست‌های مناسب برای این منظور، محلول آلژینت است که زیست تخریب پذیر بوده و در حضور یونهای کلسیم به ژل تبدیل می‌شود. این داربست ساختار پلی ساکاریدی دارد (۱۵-۱۹).

تا به حال در چندین تحقیق، کشت سلولهای کندروسیت در داخل ژل آلژینت مورد بررسی قرار گرفته است. Paige و همکاران در سال ۱۹۹۲ گزارش کردند که سلولهای کندروسیت جدا شده از غضروف مفصلی خرگوش در زمان کشت در داخل ژل آلژینت، خصوصیات ترشعی خود را حفظ کرده و دچار تمایززدایی نمی‌شود (۲۱). همچنین Lemar و همکاران در سال ۱۹۹۸ و Hauselmann و همکاران نیز در سال ۱۹۹۴ نتایج مشابهی را گزارش کردند (۲۲،۲۳). این در حالی است که مطالعه در ارتباط با کشت سلولهای مزانشیمی در داخل ژل آلژینت اندک است.

Yang و همکاران در سال ۲۰۰۴ با کشت سلولهای مزانشیمی انسانی در داخل ژل آلژینت و سیستم micromass (سیستمی که در آن ابتدا با انجام سانتریفوژ پلت سلولی تشکیل می‌شود و آنگاه محیط تمایز بر روی این توده سلولی اضافه می‌گردد) و بررسی مولکولی در یافتند که در سیستم ژل آلژینت مارکر های غضروفی با شدت بیشتری بیان می‌شوند و نتیجه گرفتند که سیستم آلژینت از نظر وقوع تمایز غضروف بر سیستم micromass برتری دارد (۲۴). همچنین Kavalkovich و همکاران نیز نتایج مشابهی را گزارش کرده‌اند (۲۵).

مطالعه حاضر نیز به بحث کشت سلول مزانشیمی در داخل ژل آلژینت پرداخته است. کار ما دو تفاوت عمده با مطالعات ذکر شده دارد. یکی اینکه در مطالعه حاضر، سلول مورد استفاده سلول مزانشیمی موش NMRI است که با روش نوینی از مغز استخوان آن جدا شده است. تحقیقات پیشین نشان داده است که جداسازی سلولهای مزانشیمی از مغز استخوان موش با مشکلاتی از قبیل رشد ناخواسته سلولهای خونی و عدم تکثیر آن همراه است (۲۶،۲۷). ما در تحقیق پیشین خود، سلولهای فوق را با روش جدیدی جدا کرده‌ایم (۲۸،۲۹) و در مطالعه حاضر با استفاده از این سلولها، کندروژنیز آنها را در داخل ژل آلژینت بررسی کردیم.

استفاده گردیدند. برای انجماد از ترکیب ۳۰٪ DMSO (Dimethyl Sulfoxide: Sigma, USA) و ۶۵٪ DMEM استفاده شد. هر فلاسک ۲۵ سانتی متری به ۵ ویال انجماد تقسیم شد.

کشت سلولهای MSCs در ژل آلژینت: آلژینت کشت (Fluka sigma, Germany) پلی ساکارییدیست خطی که از جلبک قهوه‌ای استخراج می‌شود. این پلی ساکارید از اتصال الفا ۴-۱ مونومرهای مانورونیک اسید و گلوکونیک اسید می‌شود و در حضور یونهای Ca^{++} و Mg^{++} به حالت ژل در آمده و بستری مناسبی را برای کشت سلولهای مزانشیمی ایجاد می‌کند (۲۵). در تحقیق حاضر ۱۰ میلیون سلول mMSCs بعد از شمارش، در ۱۰ میلی لیتر محلول آلژینت معلق شد و به حجم یک میلی لیتر در خانه‌های ظرف کشت ۱۲ خانه‌ای توزیع شد. در این مرحله محلول $CaCl_2$ به حجم ۱ میلی لیتر و به مدت ۱۵ دقیقه به هر یک از خانه‌های ظرف کشت اضافه شد تا مایع آلژینت به فرم ژل درآید. سپس ژلهای بدست آمده دو بار با محلول PBS شسته شد و در محیط تمایز کندروژنیک شامل DMEM حاوی ۱۰ نانو گرم فاکتور رشد TGF- β 3، ۱۰ نانوگرم BMP-6، ۵۰ میلی گرم ITS+premix، ۵/۳۵ میلی گرم Linoleic acid و ۱/۲۵ میلی گرم bovine serum albumin و ۱ درصد سرم گاوی، به مدت سه هفته کشت گردید.

رنگ آمیزی تولوئیدین بلو. برای مطالعه تمایز به غضروف سلولهای کشت شده درون ژل آلژینت به کمک میکروسکوپ نوری، ژلهای مورد نظر ابتدا دوبار با محلول PBS شستشو شده و سپس به مدت ۲ ساعت در پارافرمالدهید ۴٪ فیکس شد و پس از انجام مرحله آگیری و تهیه بلوک پارافینی، برشهای ۵ میکرومتری تهیه گردید و لام‌های بدست آمده با استفاده از رنگ تولوئیدین بلو رنگ آمیزی گردید.

انجام RT-PCR. به منظور بررسی بیان ژنهای کلاژن تیپ II، X و آگریکان ژلهای مورد نظر ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه در محلول سیترات سدیم قرار داده شد تا ژل آلژینت حل شده و سلولها رها گردد. سپس سلولها به کمک سانتریفوژ با دور ۱۲۰۰ g ته نشین شده و پس از تخلیه محیط رویی، به منظور استخراج mRNA

نکته دوم این است که در مطالعه حاضر، علاوه بر بررسی مولکولی تمایز به غضروف، فراساختار سلولهای مزانشیمی در داخل ژل آلژینت نیز مورد توجه قرار گرفته است.

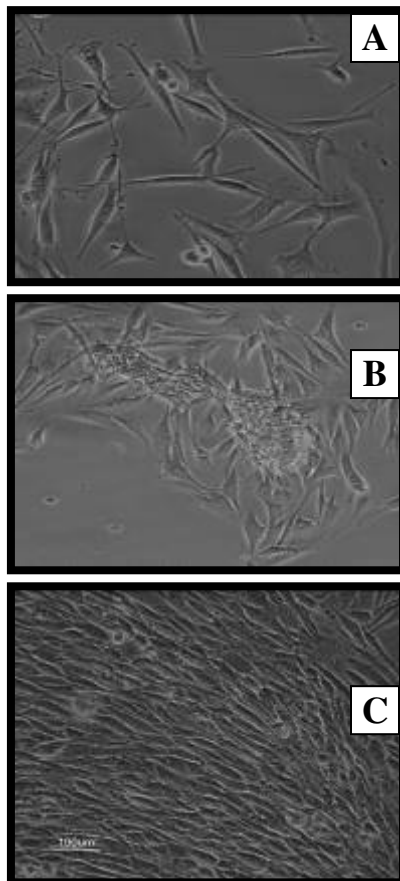
روش بررسی

موشهای نر، نژاد NMRI به سن تقریبی ۸-۶ هفته‌ای به روش جابجایی مهره‌های گردنی کشته شدند، سپس به وسیله الکل ۷۰٪ ضدعفونی شده و در شرایط کاملاً استریل، استخوانهای ران و ساق پای آن 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 سراسخوان قطع گردید. مغز استخوان به کمک یک سرنگ و سرسوزن شماره ۱۸ که با محیط DMEM (Dubleco's modified eagles medium) (Gibco; Germany) حاوی ۱۵٪ سرم FBS (Fetal Bovine Serum; Gibco, Germany) 100 واحد بین المللی آنتی بیوتیک پنی سلین و ۱۰۰ واحد بین المللی استروپتومایسین (Gibco; Germany) پر شده بود، به روش flushing در یک لوله ۱۵ میلی لیتر تخلیه گردید. در این مرحله مغز استخوان با دور ۱۲۰۰ سانتریفوژ شد تا پلت سلولی تشکیل گردد، سپس محیط رویی تخلیه شده و سلولها در ۱ میلی لیتر محیط DMEM تازه معلق شده و با استفاده از Filter Mesh ۰/۲ میکرومتری فیلتر شدند. در این مرحله سلولهای حاصل از هر استخوان دراز به کمک لام 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 سانتی گراد و ۵٪ CO_2 منتقل گردید. بعد از ۲ روز محیط رویی خارج گردید و محیط DMEM تازه اضافه گردید. محیط سلولها هر ۳-۴ روز یکبار به مدت دو هفته، تعویض شد و سپس پاساژ اول صورت گرفت به این ترتیب که سلولها با استفاده از EDTA-trypsin (Gibco; Germany) ۰/۲٪ از کف ظرف کنده شد و به نسبت ۱:۳ در فلاسکهای کشت ۲۵ سانتی متری 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

آنزیم Taq DNA polymerase به حجم ۲/۵ میکرولیتر و ۱۰۰ پیکومول از پرایمرهای ژنهای اختصاصی بافت غضروف که در جدول زیر نشان داده شده است انجام شد.

سلولها به کمک RNAase X (Cinagen Inc) لیز شدند و سپس از روی RNA حاصل cDNA در حجم بالا ساخته شده و سپس PCR در حجم ۲۵ ماکرولیتر با dNTPs به حجم ۱۰ میکرو لیتر و

Collagen type II	Forward primer 5'-GGCTTAGGGCAGAGA GAG AAG G-3' Reverse primer 5'-TGGACAGTAGACGGAGGA AAGTC -3'
Collagen type X	Forward primer 5'-CAG CAG CAT TAC GAC CCA AG -3' Reverse primer 5'-CCTGAGAAGGACGAGTGGAC-3'
Aggrecan	Forward primer 5'-CAG CAG CAT TAC GAC CCA AG -3' Reverse primer 5'-CCTGAGAAGGACGAGTGGAC-3'

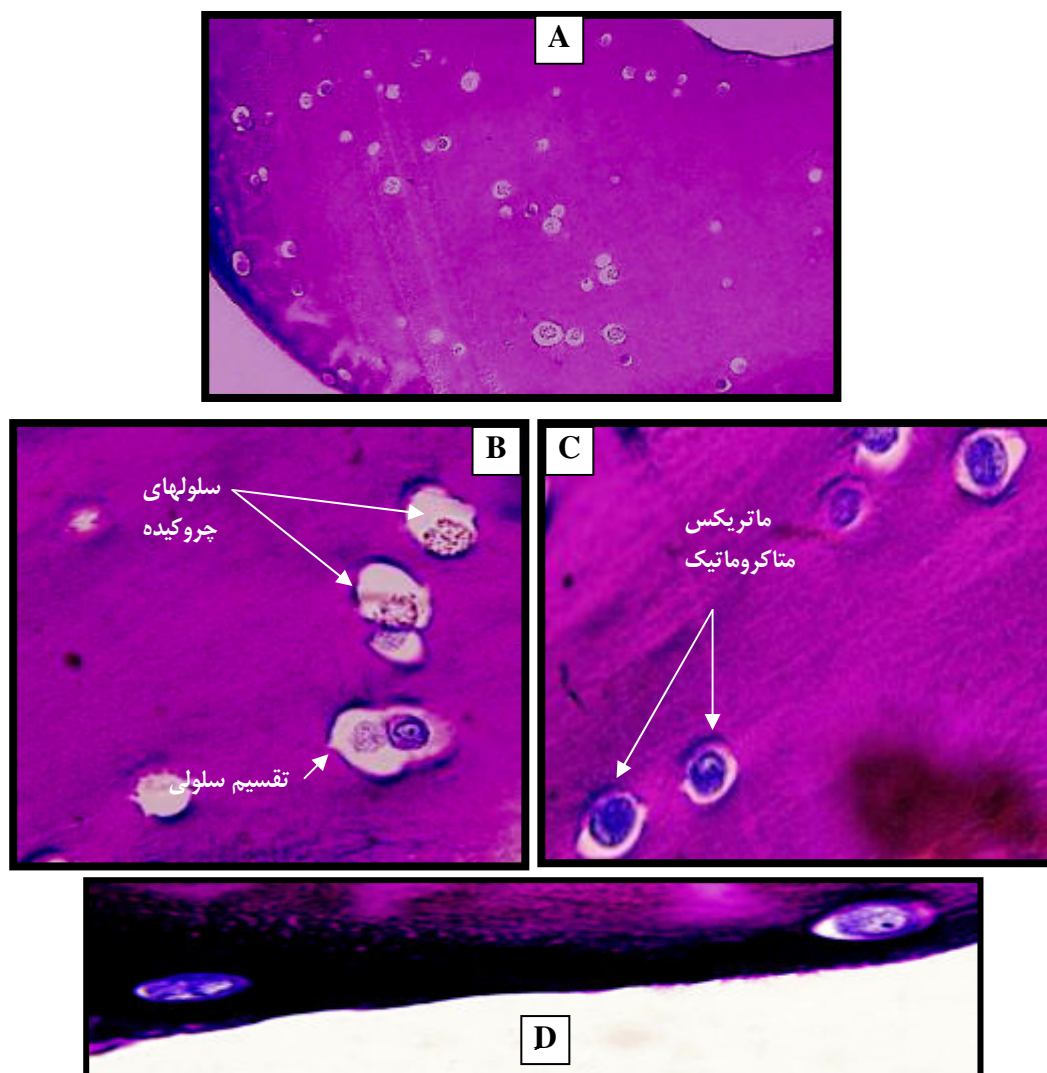


شکل ۱. در کشت اولیه سلولها با مورفولوژی گرد، چند ضلعی، پهن و دوکی شکل بودند (A: بزرگنمایی ۴۰×) در پاساژ یک سلولهای دوکی با ایجاد کلونی تکثیر شدند (B: بزرگنمایی ۴۰×). در پاساژ دوم جمعیت یکنواختی از سلولهای دوکی مشاهده شد. (C: بزرگنمایی ۴۰×).

مطالعه فرا ساختار. به منظور مطالعه فراساختار، ابتدا نمونه‌ها به کمک گلو تار آلدهید ۲/۵٪ به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد ثبوت اولیه شدند و سپس در بافر فسفات سورنسون شسته شدند و ثبوت ثانویه به کمک محلول آبی ۱٪ تتراکسید اسمیوم انجام شد (به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد). آنگاه نمونه‌ها در آگار ۱٪ مذاب قرار داده شدند و در زیر استریومیکروسکوپ به قطعات یک میلی متری بریده شدند. به کمک درجات مختلف الکل اتیلیک و استون به ترتیب عمل آبدگیری و شفاف‌سازی انجام شد. پس از آن نمونه‌ها در رزین آرالدایت قالب‌گیری شدند. عمل پلی مریزاسیون در درجه حرارت ۶۰°C و به مدت ۲۴ ساعت انجام شد و در انتها مقاطع ظریف ۷۰-۹۰ نانومتری تهیه شد و پس از رنگ آمیزی با سیترات سرب و استات آمونیوم در زیر میکروسکوپ الکترونی مشاهده گردید.

یافته‌ها

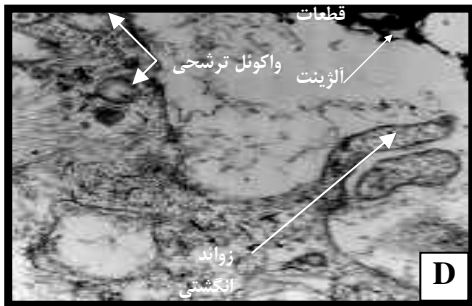
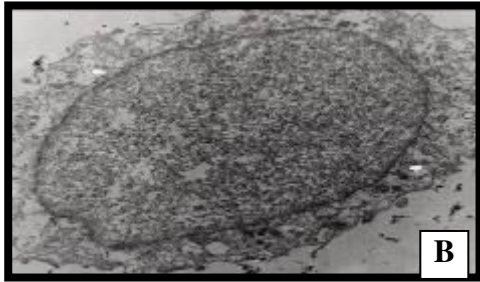
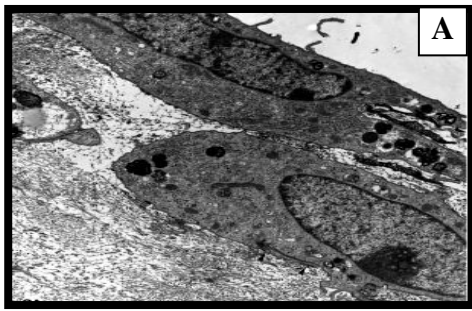
کشت سلولهای MSCs. در کشت اولیه، سلولهایی با مورفولوژی گرد، چند ضلعی، پهن و دوکی مشاهده شد (شکل ۱-۱). در پاساژ یک این سلولها با تشکیل کلنی شروع به ازدیاد کردند (شکل ۱-۲). در نهایت تعداد سلولهای دوکی با انجام پاساژ سلولی افزایش یافت، بطوریکه این سلولها در پاساژ دو بر کشت سلول غالب شدند (شکل ۱-۳).



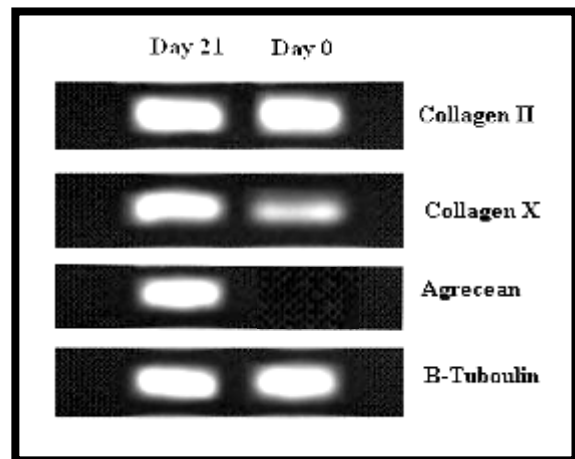
شکل ۲. سلولهای مرکزی مورفولوژی تقریباً گرد داشتند و در حفرات شبه لاکونائی قرار گرفته بودند (A، بزرگنمایی $\times 20$). برخی از سلولها احتمالاً در اثر آماده‌سازی دچار چروکیدگی شده بودند (B بزرگنمایی $\times 40$). در برخی مناطق تقسیم سلولی مشاهده شد (B بزرگنمایی $\times 40$). در اطراف سلولها ماتریکس متاکروماتیک وجود داشت (شکل C بزرگنمایی $\times 40$). سلولهای محیطی قدری کشیده بنظر می‌رسیدند (شکل D بزرگنمایی $\times 40$).

که حاکی از خاصیت متاکروماتیک آنها بود (شکل ۲-C). سلولها در نواحی حاشیه‌ها مورفولوژی کشیده داشتند (شکل ۲-D).
RT-PCR. آنالیز مولکولی نشان داد که mRNA ژن کلاژن تیپ II در نمونه آزمایش به مقدار زیادی تولید شده است البته این ژن تا حدودی در گروه کنترل نیز بیان شده بود که منطقی به نظر می‌رسد. زیرا سلولهای مزانشیمی نیز به مقدار کمی این ژن را بیان می‌کنند. همچنین mRNA کلاژن تیپ X نیز به مقدار فراوانی

رنگ آمیزی تولوئیدن بلو. سلولهای مرکزی تا حدودی مورفولوژی گرد داشتند این سلولها در حفرات شبه لاکونائی قرار گرفته بودند (شکل ۲-A). در مواردی سلولهای در حال تقسیم مشاهده شد که احتمالاً شروع تشکیل گروه‌های ایزوژنیک بود و در برخی لاکونا، سلولهای چروکیده دیده شد که احتمالاً پیامد آماده‌سازی بافتی بود (شکل ۲-B). در مجموع در اثر رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو ماتریکس اطراف سلولها در داخل لاکونا بنفش شد



ساخته شده بود، هرچند که این ژن به مقدار بسیار اندکی در سلولهای روز صفر نیز تولید شده بود. نکته حائز اهمیت تولید mRNA اگریکان در نمونه آزمایش بود. این ژن در نمونه کنترل اصلا بیان نشده بود. زیرا این پروتئین به عنوان مارکر اختصاصی بافت غضروف محسوب می شود و تنها در این بافت تولید می گردد (شکل ۳).



شکل ۳. نتایج حاصل از RT-PCR نشان داد که بیان ژن کلاژن II در نمونه آزمایش و نمونه کنترل تفاوت چندانی نداشت و ژن کلاژن X در نمونه آزمایش نسبت به نمونه کنترل به مقدار زیادتری بیان شد و ژن اگریکان در نمونه کنترل اصلا بیان نشد و در نمونه آزمایش به مقدار زیادی بیان شد.

مطالعه فراساختار. سلولهای نسبتا کشیده محیطی، دارای هسته های نسبتا بزرگ یوکروماتین بودند. در زیر پوشش هسته آنها مناطق هتروکروماتینی به چشم می خورد. این سلولها نسبتا کم ارگانل بودند (شکل ۴- A). در حالیکه سلولهای مرکزی بیضی شکل بوده، هسته کاملا یوکروماتین داشتند (شکل ۴- B). در این سلولها، شبکه رتیкулوم آندوپلاسمی خشن و دستگاه گلژی، هر دو متسع و رشد کرده بود، در حالیکه تعداد میتوکندریها اندک بود (شکل ۴- C). تعدادی قطره چربی نیز در سیتوپلاسم سلول حضور داشت (شکل ۴- C). سطح سلول ناهموار بود و در مواردی زوائد انگشتی شکل داشت (شکل ۴- D). در برخی نواحی وزیکول ترشچی در نزدیک غشاء سلولها قابل مشاهده بود (شکل ۴- D).

شکل ۴. سلولهای محیطی نسبتا کشیده بودند و هسته های نسبتا بزرگ یوکروماتین داشتند (A بزرگنمایی $\times 70000$) سلولهای مرکزی بیضی شکل بوده و هسته کاملا یوکروماتین داشتند (B بزرگنمایی $\times 100000$). در این سلولها، شبکه رتیкулوم آندوپلاسمی خشن و دستگاه گلژی، هر دو متسع و رشد کرده بود، در حالیکه تعداد میتوکندریها اندک بود و تعدادی قطره چربی نیز در سیتوپلاسم سلول حضور داشت (C بزرگنمایی $\times 200000$). سطح سلول ناهموار بود و در مواردی زوائد انگشتی شکل داشت و در برخی نواحی وزیکول ترشچی در نزدیک غشاء سلولها قابل مشاهده بود و قطعاتی از ژل الژنیت نیز که قسمت اعظم آن در اثر آماده سازی بافتی حل شده بود، در اطراف سطح سلول وجود داشت (D بزرگنمایی $\times 240000$).

است و آگارز که به شکل مایع است، مزیت دارد. در ضایعات غضروفی بایستی از پلی مری استفاده کرد که به شکل محل ضایعه دیده غضروفی باشد و پلی مرهای پلی لاکتیک اسید و آگارز براحتی شکل پذیر نیستند (۱۹). به همین دلیل بررسی کشت سلولهای مزانشیمی در ژل آلژینیت که براحتی می‌توان به هر شکلی درآورد، اهمیت فراوانی دارد (۳۰). نتایج ما نشان داد که سلولهای مزانشیمی کشت شده در ژل آلژینیت پس از گذشت ۲۱ تمایز، از لحاظ مولکولی و مورفولوژی به کندروسیت تبدیل شده‌اند. بطوریکه ژن کلاژن II و مارکو مولکول اگریکان بعنوان مارکرهای بافت غضروف به مقدار زیادی بیان شده بود و سلولها مورفولوژی بیضوی داشته در داخل لاکونا قرار گرفته بودند. نکته جالب توجه بیان ژن کلاژن X در بافت تمایز یافته به غضروف بود. این ژن مارکر غضروف هایپرتروفی شده بوده و در پروسه استخوان‌سازی داخل غضروفی بیان می‌شود. با توجه به بیان این ژن به نظر می‌رسد سیستم کشت سلول مزانشیمی در ژل آلژینیت علاوه بر استفاده آن در پیوند سلول مزانشیمی در ضایعات غضروفی، مدل مناسبی برای مطالعه فرایند استخوان‌سازی داخل غضروفی نیز می‌باشد.

مطالعات پیشین نشان داده است که یکی از شرایط مهم برای کندروژنیز ایجاد تراکم سلولی در سلولهای پیش‌ساز غضروفی است. بطوریکه در تکامل جوانه اندامی، سلولهای مزانشیمی در آغاز غضروف‌زایی در محور مرکزی اندام تجمع یافته و فواصل بین آنها حذف می‌شود و متراکم می‌شوند (۳۲). همچنین در محیط آزمایشگاهی نیز بدون تراکم سلولی، غضروف تشکیل نمی‌شود و به همین دلیل محققین با انجام سانتریفوژ، این تراکم را بطور مصنوعی ایجاد می‌کنند (۱۱). در مطالعه حاضر سلولهای فیبروبلاستی مزانشیمی بدون فراهم شدن تراکم سلولی و تنها در تماس با ژل آلژینیت به غضروف تمایز یافتند. به نظر می‌رسد که بر هم‌کنش سلول و ماکرومولکول‌های آلژینیت نیاز به تراکم سلولی را بر طرف می‌کند.

در مطالعه حاضر فراساختار سلول‌های تمایز یافته با روش میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس تصاویر الکترونی، سلولهای محیطی کشیده و غیرفعال به نظر رسیدند در

قطعاتی از ژل آلژینیت نیز که قسمت اعظم آن در اثر آماده‌سازی بافتی حل شده بود، در اطراف سطح سلول وجود داشت (شکل ۴-D).

بحث

صعب‌العلاج بودن ضایعات بافت غضروف، به دلیل محدود بودن توان ترمیمی آن، محققین را برآن داشته که با بهره‌گیری از فنآوری مهندسی بافت راه حل مناسبی را برای آن بجوبند (۷). آلژینیت به عنوان یک ماتریکس مناسب در زمینه کشت غضروف همواره مورد توجه بوده است (۳۰). در این ارتباط اغلب مطالعات به کشت سه بعدی کندروسیت در داخل آلژینیت اختصاص داده شده و کشت سلولهای مزانشیمی کمتر مورد توجه بوده است. در مطالعه حاضر سلولهای مزانشیمی موش در داخل ژل آلژینیت کشت شد و نتایج حاکی از این بود که سلولها از لحاظ مولکولی و فراساختاری، فنوتیپ سلولهای غضروف هیالین را کسب کرده‌اند. این نتایج، موافق یافته‌های محققین پیشین است (۲۴، ۲۵).

در مطالعه حاضر کندروژنیز سلولهای بنیادی مزانشیمی استخراج شده از مغز استخوان موش نژاد NMRI در داخل ژل آلژینیت مورد بررسی قرار گرفت با وجودیکه مطالعه سلولهای مزانشیمی در موش به عنوان یک مدل تحقیقاتی اهمیت فراوانی دارد، جداسازی سلولهای مزانشیمی آن با مشکلاتی همراه است مطالعات پیشین نشان داده است که در محیط کشت این سلولها اغلب، سلولهایی با مورفولوژی ستاره‌ای و چند وجهی (احتمالا ماکروفاز، اندوتلیال و خونساز) رشد نموده و پس از مدت کوتاهی بر جمعیت سلولهای فیبروبلاستی (مزانشیمی) غالب شده و سطح کشت را فرا می‌گیرد (۳۱). برای حل این مشکل محققین روشهای متفاوتی را بکار برده‌اند. در مطالعه حاضر سلولهای مورد استفاده در کشت سه بعدی با روش نوین جدا شده است. ما در مطالعات پیشین پتانسیل تمایز به غضروف آنها را در سیستم Micro mass مورد ارزیابی قرار دادیم (۲۸، ۲۹) و مطالعه حاضر نشان داد که این سلول در داخل ژل آلژینیت نیز براحتی به غضروف تمایز می‌یابند.

ژل آلژینیت به شکل نیمه جامد بوده و از این نظر نسبت به داربست‌های دیگر، نظیر پلی لاکتیک اسید که کاملاً جامد و سفت

defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331(14): 889-95.

5. Rodriguez AM, Vacanti CA, Tissue engineering of cartilage. In: Patrick Jr CW, Mikos AG, McIntire LV, editors. *Frontiers in tissue engineering*. New York: Elsevier Science 1998; 400-41.

6. Marijnissen WJ, van Osch GJ, Aigner J, Verwoerd-Verhoef HL, Verhaar JA. *Biomaterials* 2000; 21(6): 571-80. Tissue-engineered cartilage using serially passaged articular chondrocytes. Chondrocytes in alginate, combined in vivo with a synthetic (E210) or biologic biodegradable carrier (DBM).

7. Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood* 2004; 103(5): 1662-8.

8. 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.

9. 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 USA* 1999; 96(19): 10711-6.

10. 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): 527-535.

حالی که سلولهای مرکزی که قسمت عمده سلولها را تشکیل می‌دادند بیضی شکل و فعال بودند. این قضیه در فراساختار سلولها کاملاً مشخص بود سلولهای مرکزی از لحاظ فراساختار، ارگانل‌های یک سلول فعال را داشتند بطوریکه شبکه آندوپلاسمی خشن و دستگاه گلژی متسع بود و وزیکولهای ترشحی براحتی قابل مشاهده بود. این سلولها شباهت زیادی به کندروبلاست (سلول فعال) داشتند تا به یک سلول بالغ کندروسیت.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج تحقیق حاضر می‌توان گفت که سلولهای مزانشیمی موشی کشت شده در ژل آلژینیت بدون نیاز به تراکم سلولی که پیش شرط غضروف‌زایی در دوران تکامل است براحتی به سلولهای غضروفی تمایز می‌یابد در کشت فوق سلولهای محیطی به کندروسیت شبیه بوده و سلولهای مرکزی شبیه سلولهای فعال کندروبلاست هستند.

تقدیر و تشکر. مطالعه حاضر با حمایت‌های مالی سازمان گسترش و نوسازی صنایع انجام گرفته است.

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. Cohen NP, Foster RJ, Mow VC. Composition and dynamics of articular cartilage: structure, function, and maintaining healthy state. *J Orthop Sports Phys Ther* 1998; 28(4): 203-15.
4. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage

11. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 1998; 238(1): 265-72.
12. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM. Mesenchymal cell-based repair of large full thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joing Surg* 1994; 76: 579-592.
13. Thomson RC, Yaszemski MJ, Powers JM, Mikos AG. Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone. *J Biomater Sci Polym Ed* 1995; 7(1): 23-38.
14. Guo JF, Jourdain GW, MacCallum DK. Culture and growth characteristics of chondrocytes encapsulated in alginate beads. *Connect Tissue Res* 1989; 19(2-4): 277-97.
15. Beekman B, Verzijl N, Bank RA, von der Mark K, TeKoppele JM. Synthesis of collagen by bovine chondrocytes cultured in alginate; posttranslational modifications and cell-matrix interaction. *Exp Cell Res* 1997; 237(1): 135-41.
16. Atala A, Kim W, Paige KT, Vacanti CA, Retik AB. Endoscopic treatment of vesicoureteral reflux with a chondrocyte-alginate suspension. *J Urol* 1994; 152(2 Pt 2): 641-643.
17. Chang SC, Rowley JA, Tobias G, Genes NG, Roy AK, Mooney DJ, Vacanti CA, Bonassar LJ. Injection molding of chondrocyte/alginate constructs in the shape of facial implants. *J Biomed Mater Res* 2001; 55(4): 503-11.
18. Chang PL. Related Articles. Encapsulation for somatic gene therapy. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 875: 146-58.
19. 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.
- 20- Hasse C, Bohrer T, Barth P, Stinner B, Cohen R, Cramer H, Zimmermann U, Rothmund M. Parathyroid xenotransplantation without immunosuppression in experimental hypoparathyroidism: long-term in vivo function following microencapsulation with a clinically suitable alginate. *World J Surg* 2000; 24(11): 1361-6.
21. 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.
22. Lemare F, Steimberg N, Le Griel C, Demignot S, Adolphe M. Dedifferentiated chondrocytes cultured in alginate beads: restoration of the differentiated phenotype and of the metabolic responses to interleukin-1beta. *J Cell Physiol* 1998; 176(2): 303-13.
23. Hauselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB, Kuettner KE, Thonar EJ. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J Cell Sci* 1994; 107(Pt 1): 17-27.
24. Yang IH, Kim SH, Kim YH, Sun HJ, Kim SJ, Lee JW. Comparison of phenotypic characterization between "alginate bead" and "pellet" culture systems

as hondrogenic differentiation models for human mesenchymal stem cells. *Yonsei Med J* 2004; 45(5): 891-900.

25. Kavalkovich KW, Boynton RE, Murphy JM, Barry F. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells within an alginate layer culture system. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2002; 38(8): 457-66.

26. Tropel P, Noel D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Berger F. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res* 2004; 295(2): 395-406.

27. 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.

28. 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.

۲۹. باغبان اسلامی نژاد م، نیک محضر آ، ندیری ص، تقی یار ل. جداسازی و تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان موش NMRI. بهار ۱۳۸۵ مجله پزشکی کوثر، دوره ۱۱، شماره ۱ صفحه ۳۹-۲۹.

30. 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.