

## بررسی ساختار استخوان حاصل از تمایز آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی مزانشیمی تهیه

### شده از مغز استخوان سگ

دکتر محمدرضا باغبان اسلامی نژاد<sup>۱</sup>، آق بی بی نیک محضر<sup>۲</sup>، عباس پیریایی<sup>۳</sup>

۱- PhD آناتومی، استادیار پژوهشکده رویان، گروه سلول‌های بنیادی (مؤلف مسول) bagesla@yahoo.com

۲- کارشناس ارشد زیست‌شناسی تکوینی، پژوهشکده رویان، گروه سلول‌های بنیادی

۳- دانشجوی PhD آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

### چکیده

**زمینه و هدف:** هدف مطالعه حاضر، جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان سگ، تمایز آنها به استخوان در محیط کشت و مطالعه ساختار استخوان حاصل از تمایز است.

**روش بررسی:** سلول‌های فیروبللاستی مزانشیمی از مغز استخوان سگ استخراج و به مدت ۳ هفته در معرض محیط استئوژنیک بر روی Cover slip کشت داده شد و در پایان این مدت، استخوان حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی، با بهره‌گیری از میکروسکوپ نوری و الکترونی، از لحاظ ساختار مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه حاضر، سلول‌های جدا شده به چربی نیز تمایز داده شدند.

**یافته‌ها:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت شده بر سطح Cover slip در حین تمایز، تعداد زیادی ندول سلولی تشکیل دادند. بر اساس تصاویر میکروسکوپ نوری، ندول‌ها از لحاظ ساختار هیستولوژیک از چند لایه سلول و ماتریکس فراوان تشکیل شده بودند. در تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره، سلول‌ها عمدتاً مرفولوژی دوکی شبه استئوسیتی داشتند و ماتریکس حاوی مقدار زیادی رشته کلاژن تیپ I با Striation کاملاً واضح بود که در لابلای سلول‌ها به صورت دستجات عمود بر هم واقع بودند.

**نتیجه‌گیری:** می‌توان گفت؛ استخوان حاصل از تمایز آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از لحاظ ساختار هیستولوژیک به ویژه نحوه آرایش رشته‌های کلاژن، شباهت به استخوان لامینار دارد.

**کلید واژه‌ها:** سلول بنیادی مزانشیمی سگی، تمایز به استخوان، فرا ساختار استخوان.

وصول مقاله: ۸۵/۱۲/۸ اصلاح نهایی: ۸۶/۵/۱ پذیرش مقاله: ۸۶/۶/۱۹

### مقدمه

در اثر ضایعات فیزیکی یا بیماری حاصل می‌شود، می‌تواند تعادل بدن و طبیعت زندگی را به مخاطره اندازد (۱،۲).

اغلب آسیب‌های استخوان، به طور خودبخودی و یا با درمان مختصری بهبود می‌یابند، با این حال آمار نشان می‌دهد که حدود ۵ تا ۱۰ درصد ضایعات استخوانی به دلایل مختلف از قبیل ایجاد بافت نرم، جوش خوردن نابجای استخوان، از بین رفتن کامل استخوان در اثر

استخوان بافتی پویا با شبکه عروقی وسیع بوده، نقش اصلی آن فراهم آوردن پشتیبانی ساختاری برای بدن و حفاظت اندام‌های داخلی آن است. همچنین بافت استخوان به عنوان تکیه‌گاه، از انقباضات ماهیچه‌ای که به حرکت فرد منجر می‌شود، حمایت می‌نماید. نکته دیگری که نشانگر اهمیت این بافت است این است که استخوان به عنوان منبع سرشار از مواد معدنی محسوب می‌شود، بنابراین تغییرات اساسی در ساختار استخوان که

به طور کلی دو روش اساسی برای ترمیم بافت آسیب دیده استخوان با استفاده از بیومتریالهای زیست تخریب پذیر وجود دارد: استفاده از بیومواد و داربست‌ها به تنهایی و روش دیگر استفاده از سلول و داربست با هم (۱۱). سلولهایی که در بازسازی بافت استخوان مورد استفاده قرار می‌گیرند به دو دسته تقسیم می‌شوند: سلولهای استئوبلاستی مشتق از استخوان خود فرد و سلولهای بنیادی مزانشیمی (۱۲). اما جدا نمودن استئوبلاستهای بالغ از استخوان فرد بیمار بسیار سخت بوده و رشد این سلولها در محیط کشت به کندی صورت می‌پذیرد، ولی سلولهای بنیادی مزانشیمی را می‌توان از یک نمونه کم مغز استخوان بیمار جداسازی نمود و به راحتی در محیط *in vitro* در شرایط آزمایشگاه کشت داد بعلاوه این سلولها از سرعت رشد نسبتاً بالایی نیز برخوردار می‌باشند (۱۳).

از آنجایی که سلولهای بنیادی مزانشیمی دارای توانایی خود تجدیدی بوده و قادرند در مدت زمان نسبتاً اندکی سلولهای مشابه در تعداد فراوان ایجاد نمایند (۱۴-۱۸)، محققین معتقدند که این سلولها می‌توانند به عنوان یک منبع مناسب در سلول درمانی ضایعات استخوانی در نظر گرفته شوند. همچنین این محققین اعتقاد دارند که بهتر است در استراتژیهای سلول درمانی از سلولهای مزانشیمی کاملاً تمایز یافته استفاده شود زیرا در صورتی که سلول فوق به فرم تمایز نیافته پیوند زده شود ممکن است پس از قرار گرفتن در شرایط طبیعی بدن به سلولهایی غیر از سلولهای استخوانی نیز تمایز یافته و خطرانی برای فرد بیمار به دنبال داشته باشند (۱۹،۲۰).

بنابراین اولین قدم در استفاده از سلولهای مزانشیمی به منظور بازسازی ضایعات استخوانی، تمایز آنها به استخوان در شرایط *in vitro* می‌باشد.

تومور و عفونت محل ضایعه، به طور خودبخودی التیام نمی‌یابند و در نتیجه نیاز به مداوای بیشتر دارند (۳).

در چنین مواردی ارتوپدها از روشهایی از قبیل پیوند استخوان به صورت اتوگراف، آلوگراف و زینوگراف استفاده می‌نمایند (۶-۳). اما هر کدام از این روشها با مشکلاتی برای فرد بیمار همراه است از جمله اینکه در صورت اتوگراف بودن پیوند، عمل برداشت استخوان از فرد بسیار دردناک بوده و پس از برداشت آن، ضایعه‌ای در محل ایجاد می‌شود که این خود نیاز به ترمیم دارد. از طرفی منابع اخذ استخوان اتولوگ محدود می‌باشد (۷). در دو روش آلوگراف و زینوگراف نیز احتمال تحریک سیستم ایمنی بدن و انتقال بیماریها به فرد گیرنده وجود دارد.

با توجه به معایب مذکور، بسیاری از محققین توجه خود را به سمت مواد جدید سوق داده‌اند تا از بروز این مشکلات جلوگیری به عمل آورند و نتیجه آن توسعه ایمپلنت‌های فلزی و بیومتریالهای زیست تخریب پذیر می‌باشد. از معایب ایمپلنت‌های فلزی این است که در دراز مدت تولید یونهای سمی فلزی می‌کنند در حالیکه بیومتریالهای زیست تخریب پذیر که با استفاده از مهندسی بافت توسعه یافته‌اند، با کاشت در بدن بیمار به تدریج تخریب شده، بافت جدید استخوانی فضای خالی آنها را پر می‌کند. محصولات ناشی از تخریب و تجزیه این داربست‌ها هیچگونه عارضه برای بدن ندارد. در واقع بسیاری از این محصولات موادی هستند که بدن انسان روزانه به مصرف می‌رساند یا آنها را دفع می‌کند (۸-۱۰). به همین دلایل امروزه استفاده از بیومتریالهای زیست تخریب پذیر در ترمیم بافت استخوان سریعاً در حال گسترش است.

داده‌اند (۲۱-۲۲) در مطالعه حاضر ساختار استخوان حاصل از تمایز آزمایشگاهی سلولهای بنیادی مزانشیمی تهیه شده از مغز استخوان سگ مورد بررسی قرار گرفت.

### روش بررسی

#### کشت سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان سگ

در مطالعه حاضر از ۱۰ قلاده سگ با متوسط وزن ۲۰ کیلوگرم که در حیوانخانه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران نگهداری می‌شد استفاده گردید. برای تهیه مغز استخوان، سگ‌ها بی‌هوش شدند و حدود ۱۵ میلی لیتر مغز استخوان از استخوان لگن خاصره هر کدام آسپیره و به آزمایشگاه کشت سلول پژوهشکده رویان منتقل شد. برای جداسازی سلول مزانشیمی، به هر نمونه مغز استخوان ۴۵ میلی لیتر محیط DMEM اضافه شد و با استفاده از لیمفودکس و ایجاد گرادیان غلظت و سانتریفوژ ۱۲۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سلولهای تک هسته‌ای مغز استخوان جدا شد و با تراکم  $cell/cm^2$   $5 \times 10^4$  در محیط DMEM حاوی ۱۵ درصد FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco, USA) و ۱۰۰ واحد بین‌المللی پنی‌سیلین / استرپتومایسین (Sigma, USA) در داخل فلاسکهای  $150\text{ cm}^2$  کشت داده شدند. ۷ روز پس از شروع کشت، محیط رویی سلولها تخلیه شد و پس از دو بار شستشو با  $PBS^+$  محیط تازه بر روی آنها اضافه شد. پس از آن هر دو روز یکبار محیط کشت سلولها با محیط تازه تعویض گردید. سه هفته پس از آغاز کشت، زمانی که ۷۰ الی ۸۰ درصد ظرف کشت با سلول پر شد اولین پاساژ سلولی صورت گرفت، بدین ترتیب که با استفاده از Trypsine/1mM EDTA ۰/۲٪ سلولها از کف ظرف جدا شدند و پس از دو بار سانتریفوژ به سه

تا به حال، در مطالعات زیادی، سلولهای مزانشیمی به استخوان تمایز داده شده است. در اغلب این تحقیقات، تمایز به استخوان به عنوان بخشی از پتانسیل سلول مزانشیمی مورد توجه قرار گرفته است. در این مطالعات، محققین سلولهای مزانشیمی را کشت داده و با استفاده از محیط استئوژنیک، تمایز استخوانی را در آنها القاء کرده‌اند و برای ارزیابی وقوع تمایز از روش رنگ آمیزی اختصاصی برای معدنی شدن و بررسی بیان ژنی استفاده نموده‌اند (۲۱-۳۱). در مجموع نتایج این مطالعات نشان داده است که سلولهای بنیادی مزانشیمی با فراهم شدن شرایط مناسب استئوژنیک، mRNA پروتئینهای ویژه استخوانی را به مقدار زیادی تولید می‌کنند و ماتریکس معدنی شده در لابلای سلولها تجمع می‌یابد، اما با این وجود تا بحال هیچ گزارشی در ارتباط با ساختار استخوان تمایز یافته در محیط آزمایشگاه وجود ندارد.

مطالعه حاضر به موضوع ساختار استخوان حاصل از تمایز آزمایشگاهی سلول بنیادی مزانشیمی می‌پردازد، سلولهای مزانشیمی مورد استفاده در تحقیق حاضر از مغز استخوان سگ که سیستم بیومکانیکی آن شباهت زیادی به انسان دارد تهیه شده است (۲۳). سلولهای مزانشیمی از مغز استخوان سگ برای اولین بار توسط Kadiyala و همکاران در سال ۱۹۹۷ جداسازی شد و پتانسیل استئوژنیک آنها در حالت *in vivo* بررسی گردید. بدین ترتیب که این محققین ابتدا سلولهای جدا شده را در داخل منافذ سرامیک متشکل از هیدروکسی آپاتیت و تری کلسیم فسفات بارگیری کردند، سپس آنرا در زیر پوست و داخل عضله سگ پیوند زدند و استخوانسازی حاصل را مطالعه کردند (۲۳). پس از آن محققین دیگر در چندین مطالعه پتانسیل استئوژنیک این سلولها را نشان

سلولها ۳ بار در هفته تعویض شد و در پایان روز ۲۱، وقوع تمایز با رنگ آمیزی Oil red و روش RT-PCR ارزیابی شد.

### رنگ آمیزی Oil Red

سلولها به مدت یک ساعت در دمای اتاق با فرمالین ۴٪ فیکس شدند و سپس با الکل ۷۰٪ شسته شده و به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه با محلول Oil Red ۰/۵٪ در ۹۹٪ الکل ایزوپروپانول رنگ آمیزی گردیدند و در انتها محلول رنگی خارج گردید و با الکل ۷۰٪، سه بار شستشو انجام گرفت.

### RT-PCR

در ابتدا با استفاده از کیت Nucleospin RNA II (740955; Macherey-Nagel, Germany) موجودی RNA سلولی از سلولهای مزانشیمی تمایز یافته به استخوان و چربی استخراج گردید. نمونه‌های RNA استخراج شده تحت تیمار با Dnase I (104132, Roch) قرار گرفتند تا آلودگی‌های احتمالی مربوط به DNA ژنومیک از نمونه‌های RNA حذف گردد. سپس خلوص و غلظت RNA استخراج شده با روش اسپکتروفوتومتری تعیین گردید.

۱ میکروگرم از RNA استخراج شده با استفاده از پرایمر Random Hexamer و کیت (K 1622 Fermentas) Revert AidT<sup>MH</sup> Minus First Strand cDNA Synthesis نسخه برداری معکوس گردید. سپس از cDNA تولید شده به عنوان الگو برای PCR استفاده شد برای این منظور مواد زیر در یک لوله PCR با یکدیگر مخلوط شدند:

PCR Buffer (AMS)، ۲ μl cDNA (۱۰۰ ng/μl)  
 (۱۰ mM) و ۰/۷۵ μl MgCl<sub>2</sub> (۵۰ mM)، ۲/۵ μl (۱۰×)  
 ۰/۵ μl dNTPmix از هر پرایمر (۵ μM) ۱ μl  
 و ۰/۵ Smar Taq μl (5unit/1μl) (سیناژن، TA8110C)

قسمت مساوی تقسیم شدند و هر قسمت در یک فلاسک ۱۵۰ cm<sup>۲</sup> کشت داده شد. سلولهای مزانشیمی با انجام چند پاساژ متوالی تکثیر شدند و حاصل پاساژ چهارم برای تمایز به استخوان استفاده شد.

### تمایز به استخوان

برای تمایز استئوژنیک، سلولها بر روی cover slip واقع در پلیتهای ۶ ول کشت داده شدند، زمانی که سلولها سطح cover slip را پر کردند، محیط القاکننده تمایز استخوان که حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو، 0.1 μM dexamethasone، 10mM β- ascorbate و 0.05mM glycerophosphate بود، به محیط سلولها اضافه شد (۲۳). محیط کشت ۳ بار در هفته تعویض شد و سلولها به مدت ۳ هفته در معرض این محیط قرار گرفتند و پس از این مدت برای ارزیابی تمایز به استخوان با دو تکنیک رنگ آمیزی Alizarin red و RT-PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

### رنگ آمیزی آلزارین رد (Alizarin Red Staining)

پس از تخلیه محیط رویی، سلولها با PBS<sup>-</sup> به مدت ۱۰ دقیقه شستشو شدند و آنگاه در اتانول ۷۰ درصد فیکس گردیدند. برای رنگ آمیزی، ۲ میلی لیتر آلزارین رد (۲۵/۰ درصد در آب مقطر) به مدت ۲ دقیقه بر روی سلولها اضافه شد. پس از این مدت محلول رنگ خارج گردید و سلولها چندین بار با آب مقطر شسته شدند و پس از خشک شدن در زیر میکروسکوپ معکوس مشاهده گردیدند.

### تمایز به چربی

برای تمایز به چربی، سلولها در پلیتهای ۶ ول و در معرض محیط القاکننده چربی حاوی 1 μM 0.05mM ascorbate، dexamethasone و 0.0mM indomethacine کشت داده شدند (۲۳). محیط کشت

که قالبهای پلاستیکی با رزین آرالدایت پر شده و Cover Slip حاوی سلول بر سطح رزین داخل قالب قرار گرفت به نحوی که تک لایه سلولی در رزین غوطه‌ور شد. پس از انجام پلی مریزاسیون در  $60^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۴ ساعت، cover slip جدا گردید و سلولها در داخل رزین باقی ماندند.

قالبها با دستگاه اولترامیکروتوم (Richert) به ضخامت ۲ میکرونی و ۷۰-۹۰ نانومتری برش‌گیری شدند و با تولوئیدن بلو (۲ میکرومتری) و استات اورانیل و سترات سرب (۷۰-۹۰ نانومتری) رنگ‌آمیزی گردیدند و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی زایس ۱۰۰ کیلو ولت بررسی شدند.

### یافته‌ها

#### کشت سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان سگ

با فواصل زمانی، در طول مدت کشت، سلولها با میکروسکوپ معکوس بررسی شدند. بر اساس این مشاهدات، سه روز پس از آغاز کشت اولیه، کلونهای کوچکی از سلولهای فیروبلاستی دوکی در محیط کشت رویت گردید، علاوه بر این سلولها، تعدادی سلول ریز کروی نیز در محیط کشت حضور داشت (شکل ۱A). این کلونهای کوچک سلولی شروع به رشد نموده و پس از ۳ هفته ظرف کشت را پر نمودند (شکل ۱B). با انجام پاساژ اول سلولهای ریز کروی، تقریباً به طور کامل از محیط کشت حذف شدند و جمعیت خالصی از سلولهای دوکی باقی ماندند (شکل ۱C)، سرعت تکثیر سلولها در این پاساژ افزایش یافت به طوری که در ظرف ۵ روز فلاسک کشت از سلول پر شد. با انجام پاساژهای بعدی و توزیع سلولهای حاصل از هر پاساژ در سه ظرف

در نهایت با استفاده از آب دو بار تقطیر به حجم ۲۵  $\mu\text{l}$  رسانده شد. برای پی بردن به بیان ژنهای مورد مطالعه در این تحقیق از پرایمرهای جدول ۱ استفاده گردید.

شرایط PCR به صورت: (۱) واسرشتگی اولیه: ۵ دقیقه ( $93^{\circ}\text{C}$ )، (۲) واسرشتگی هر سیکل: ۴۵ ثانیه، ( $93^{\circ}\text{C}$ )، (۳) Annealing: ۴۵ ثانیه، (۴) Extension هر سیکل: ۴۵ ثانیه ( $72^{\circ}\text{C}$ )، (۵) Extension زمانی: ۱۰ دقیقه ( $72^{\circ}\text{C}$ ) انجام شد. محصولات PCR روی آگارز ۱/۷ درصد جدا شدند و با اتیدیوم بروماید قابل رؤیت گردیدند.

#### آماده سازی نمونه‌ها جهت بررسی با میکروسکوپ الکترونی

به منظور مطالعه فراساختار، سلولهای تمایز یافته بر روی Cover slip، برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی آماده سازی شدند. لازم به ذکر است که ابتدا سلولها به همراه Cover Slip مراحل ثبوت، آبگیری و شفاف سازی را گذراندند و سپس به روش Flat Embedding قالب گیری گردیدند.

ثبوت اولیه نمونه به کمک گلو تار آلدهید ۲/۵٪، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد انجام شد. پس از آن نمونه‌ها با استفاده از محلول بافر فسفات شسته شدند و به منظور ثبوت ثانویه به محلول آبی ۱٪ تتراکسید اسمیوم، به مدت ۳۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتیگراد منتقل شدند. آبگیری به کمک درجات مختلف الکل اتیلیک انجام شد و سپس به مدت ۲ ساعت از پروپیلن اکسید به عنوان ترکیبی که جایگزین الکل شده و به آهستگی جای خود را به رزین می‌دهد، استفاده شد. عمل آغشتگی با مخلوط رزین و پروپیلن اکساید و به مدت یک شب انجام شد. در انتها سلولها به روش Flat Embedding قالب گیری شدند. بدین ترتیب

تعداد آنها به تدریج افزایش یافت در پایان تمایز، کشت از لحاظ تمایز به سلول چربی مورد ارزیابی قرار گرفت.

**رنگ آمیزی oil red:** در اثر این رنگ آمیزی

قطرات چربی (شکل ۲D) در داخل سیتوپلاسم سلولها به رنگ قرمز ظاهر شدند (شکل ۲E).

#### RT-PCR

بررسی کشت استئوژنیک نشان داد که ژن کلاژن تیپ I و استئوپوننتین در انتهای دوره، به مقدار زیادی بیان شده است (شکل ۲C). همچنین نتایج RT-PCR کشت آدیپوژنیک حاکی از آن بود که ژنهای شاخص سلولهای چربی شامل لیپوپروتئین لیپاز و PPAR $\gamma$  2 نیز در پایان دوره تمایز بیان شده است (شکل ۲F).

#### میکروسکوپ الکترونی

**مقاطع نیمه نازک:** بر اساس تصاویر، ندولهای استئوژنیز حاصل از تمایز، در مقاطع میکروسکوپی دوکی شکل ظاهر شدند (شکل ۳، بالا و راست هر تصویر). این ندولها در سطح و عمق توسط چند لایه سلول کشیده پوشیده شده بودند و در بین این دو لایه از تعدادی سلول با مرفولوژیهای متنوع و ماتریکس فراوان تشکیل یافته بودند (شکل ۳).

**مقاطع نازک:** سلولهای تشکیل دهنده لایه سطحی (شکل ۴A) و عمقی (شکل ۴B) ندولها عمدتاً کشیده بودند. سلولها در این بخش در چند لایه واقع شده بودند و تعداد لایه‌های بخش سطحی بیشتر از بخش عمقی به نظر رسید. در لابلای سلولهای بخش سطحی و عمقی ندولها ماتریکس بسیار کمی تجمع یافته بود. سلولهای کشیده این دو بخش هسته کشیده یوکروماتین داشتند و مشخصه سیتوپلاسم آنها وجود تعداد زیادی میتوکنندری در آن بود. بین سلولها اتصالاتی مشاهده نشد.

کشت جدید، سلول به تعداد کافی برای انجام مرحله بعدی تحقیق فراهم شد. جهت بررسی تمایز به استخوان از سلولهای پاساژ سوم استفاده گردید.

#### تمایز به استخوان

در ۶ روز اول تمایز، محیط کشت سلولها هر روز زرد رنگ می‌شد که نشان دهنده متابولیسم بالای سلولها بود به همین دلیل در طی این مدت، محیط کشت بطور روزانه تعویض شد. در طی دوره تمایز، سلولها هر روز با میکروسکوپ نوری معکوس مشاهده شدند. بر اساس این بررسی‌ها، در پایان مدت تمایز، کشت دو بعدی تک لایه سلولی دستخوش یکسری تغییرات تدریجی شدند و نتیجه آن تشکیل ندولهای سلولی در سراسر کشت و تبدیل کشت دو بعدی به کشت سه بعدی بود (شکل ۲A). در حالیکه در گروه کنترل (تک لایه سلولی فاقد محیط استئوژنیک) ندول سلولی تشکیل نشد. در پایان دوره تمایز، وقوع استئوژنیز با روش رنگ آمیزی آلزارین رد و همچنین RT-PCR بررسی شد.

**رنگ آمیزی آلزارین رد:** بر اساس این رنگ آمیزی، کشت سلول پس از خاتمه دوره تمایز، به رنگ قرمز در آمد که نشان دهنده ترشح ماتریکس معدنی شده بود. در مناطقی که ندول سلولی واقع بود شدت رنگ آمیزی و در نتیجه میزان معدنی شدن بالا بود (شکل ۲B). سلولهای گروه کنترل که در معرض محیط DMEM فاقد فاکتورهای استئوژنیک قرار داشتند با رنگ آلزارین رد رنگ نشدند.

#### تمایز به چربی

مشابه با کشت استئوژنیک، در برخی مناطق توده‌های سلولی تشکیل شد و تمایز آدیپوژنیک در داخل این توده و تک لایه سلولی اتفاق افتاد. ۱۰ روز پس از آغاز کشت، اولین قطرات چربی مشاهده شد و

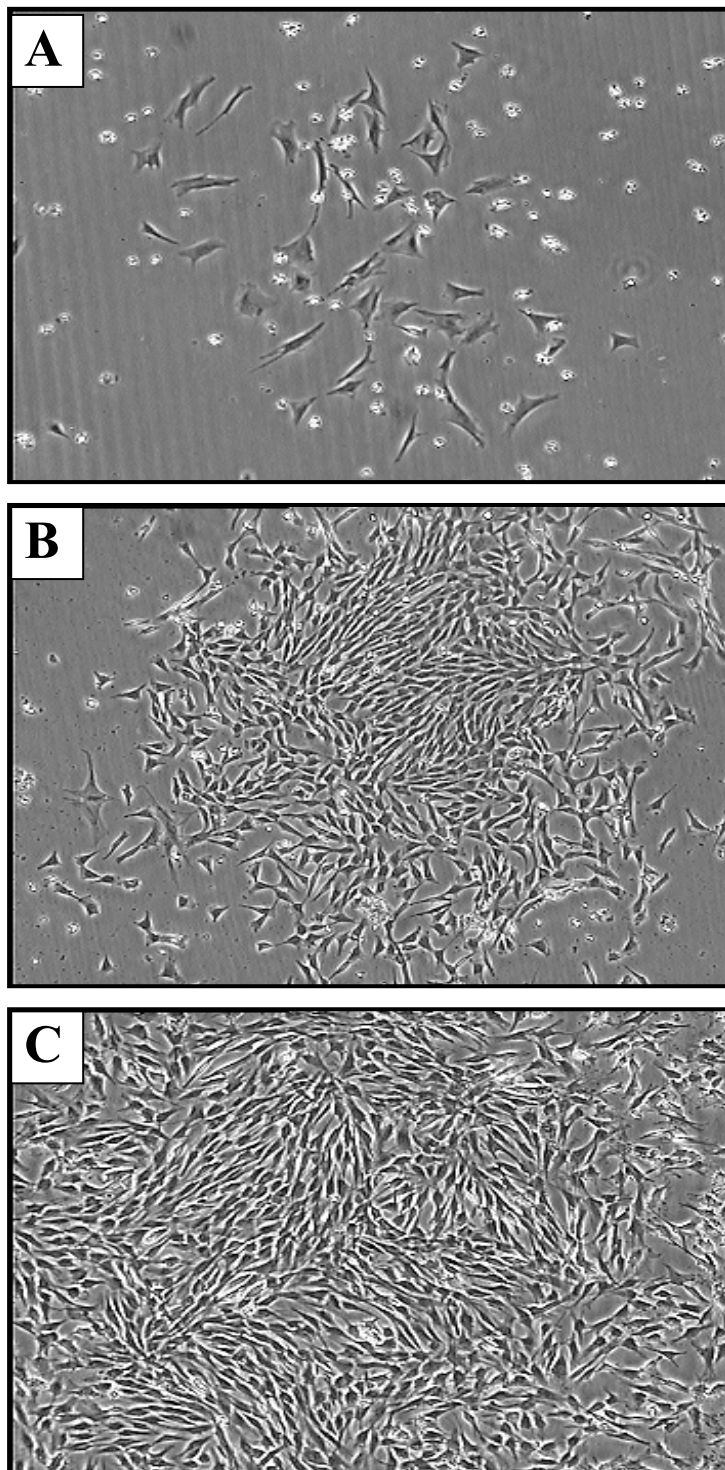
تعدادی زائده انگشتی شکل بود، مشاهده شد (شکل ۴F).

ماتریکس بینابین سلولها فراوان بود و عمدتاً از رشته‌های کلاژن تایپ یک تشکیل یافته بود. در درشت‌نمایی‌های بالاتر مخطط بودن این رشته‌ها به وضوح آشکار بود (شکل ۴G). آرایش این رشته‌ها به گونه‌ای بود که دستجات مجاور عمود بر هم قرار گرفته بودند. نکته جالب توجه این بود که دستجات کلاژن مجاور سلول، همواره عمود بر سطح کشت بود بطوریکه در مقاطع تهیه شده تنها مقطع عرضی این دسته از رشته‌های کلاژن قابل مشاهده بود (شکل ۴F، ۴H).

در بخش بینابینی ندولها، سلولها مرفولوژی دوکی و چند وجهی داشتند (شکل ۴C، ۴D). سلولهای چند وجهی عمدتاً مثلثی شکل بودند. این سلولها دارای هسته‌ای کروی یوکروماتین بودند و سیتوپلاسمشان حاوی میتوکندری فراوان و چند قطره چربی بود، در حالیکه سلول دوکی و کشیده که عمده سلولهای بخش بینابینی را تشکیل می‌داد هسته یوکروماتین کشیده با هستکی مشخص داشت. سیتوپلاسم در این سلولها حاوی مخازن شبکه آندوپلاسمی خشن و میتوکندری فراوان بود این سلولها فاقد قطرات چربی بودند. در برخی مناطق، برخی سلول دوکی به حالت خمیده وجود داشت (شکل ۴E) و در مواردی نیز، سلولهای دوکی که دارای

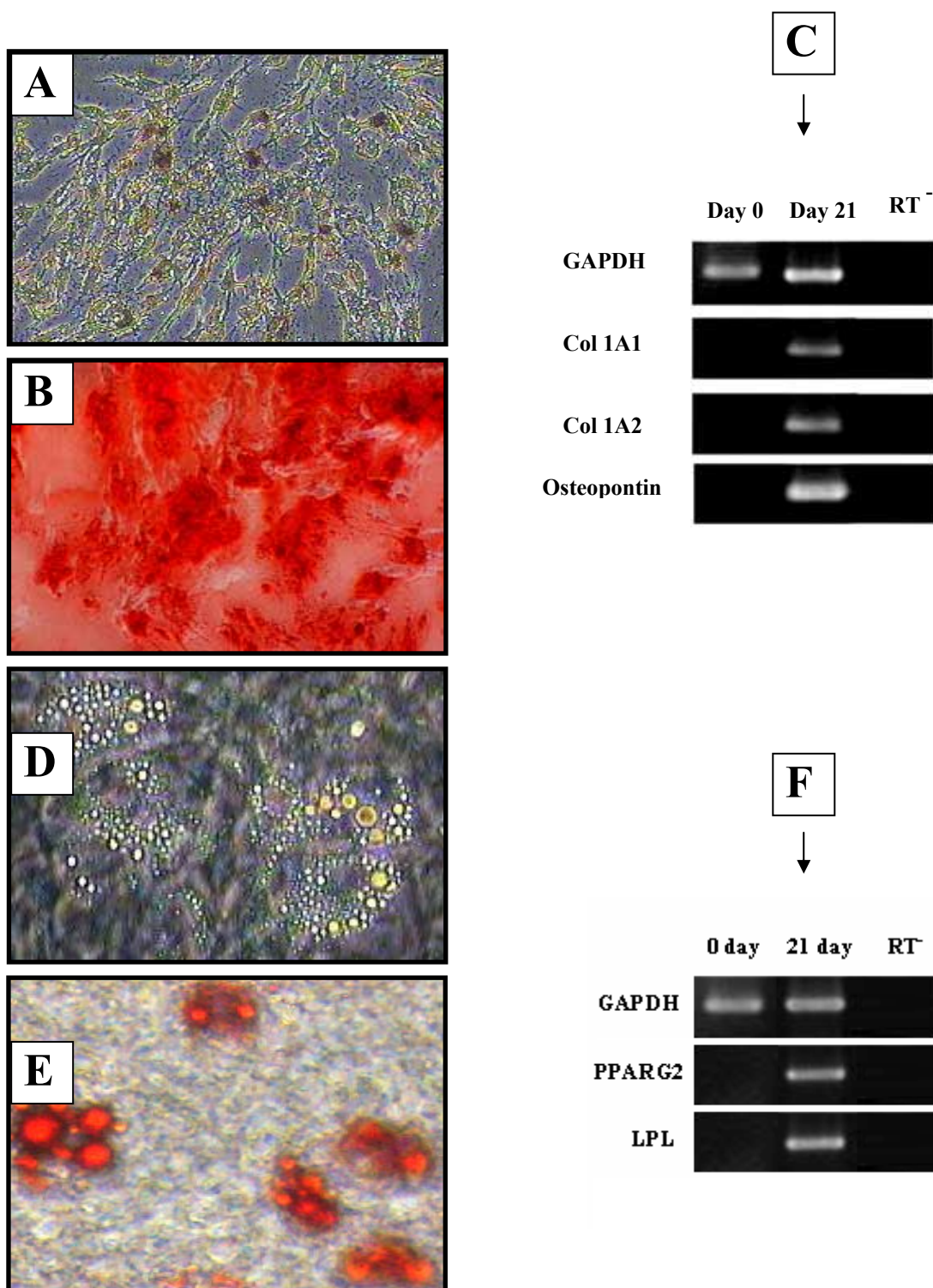
جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در RT-PCR

Genes	Primer sequences(5'-3')	Length bp	Gene bank code
<b>C.Col 1A1</b>	F: 5' tca cct acc act gca aga ac 3' R: 5' agt tta cag gaa gca gac agg 3'	302	NM_001003090
<b>C.COL1A2</b>	F : 5' tca cct acc act gca aga ac 3' R2 : 5' tga aac aga ctg ggc caa cg 3'	294	<a href="#">NM_001003187</a>
C.Osteopontin	F: 5'acg atg tag atg aag atg atg g 3' R: 5'gct ttg act taa ttg gct gac 3'	548	XM_535649
<b>C.LPL</b>	F : 5' gtg aac atg tgt ggg tat ctg R : 5' cta ggg cct tta ctg act gga	370	<a href="#">XM_534584.2</a>
<b>C.PPARG 2</b>	F : 5' atc cct ctt cca tgc tgt tat g 3' R : 5' ata gtg tgg agt gga aat gct g 3'	253	<a href="#">AJ972913</a>
<b>C. GAPDH</b>	F : 5' cca cgg caa att cca cgg cac ag 3' R : 5' ggg gtc cct ccg atg cct gct tc 3'	652	<a href="#">NM_001003142</a>

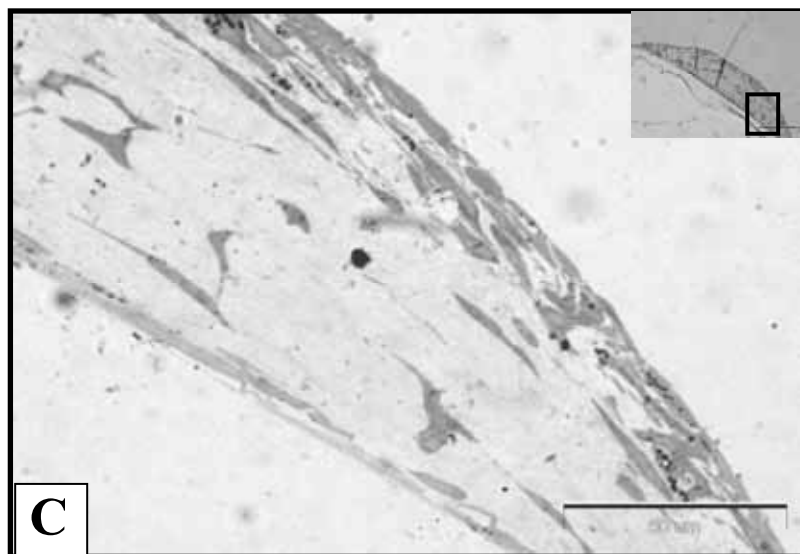
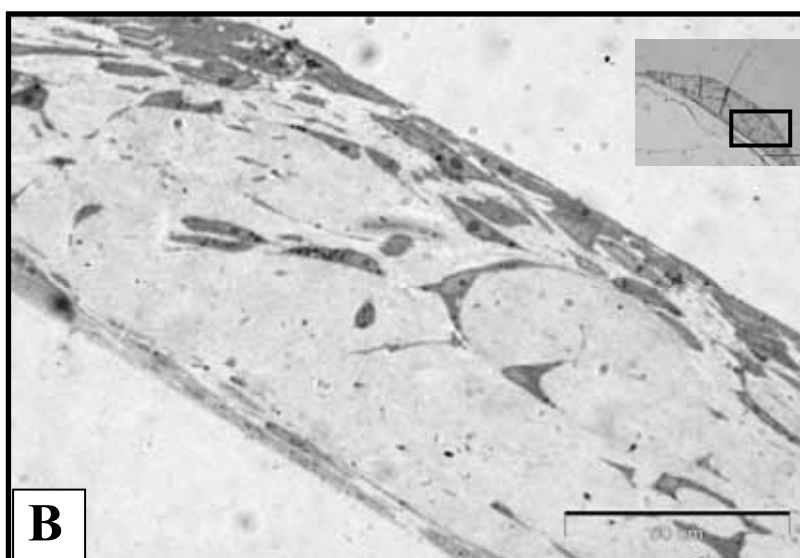
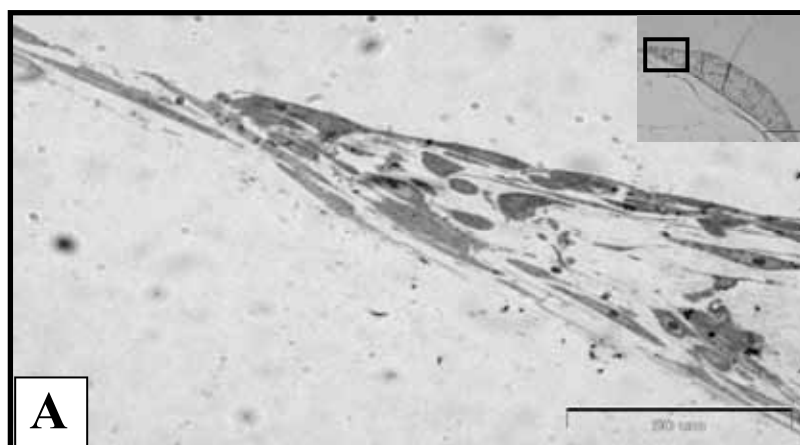


شکل ۱: کشت سلولهای تک هسته‌ای مغز استخوان سگ. (A) سلولها در کشت اولیه، سه روز پس از آغاز کشت، بزرگنمایی  $\times 100$ . (B) کلون سلولی، ۱۲ روز پس از آغاز کشت، بزرگنمایی  $\times 100$ . (C) تک لایه سلولهای فیروبلاستی مزانشیمی، پاساژ اول، بزرگنمایی  $\times 100$ .

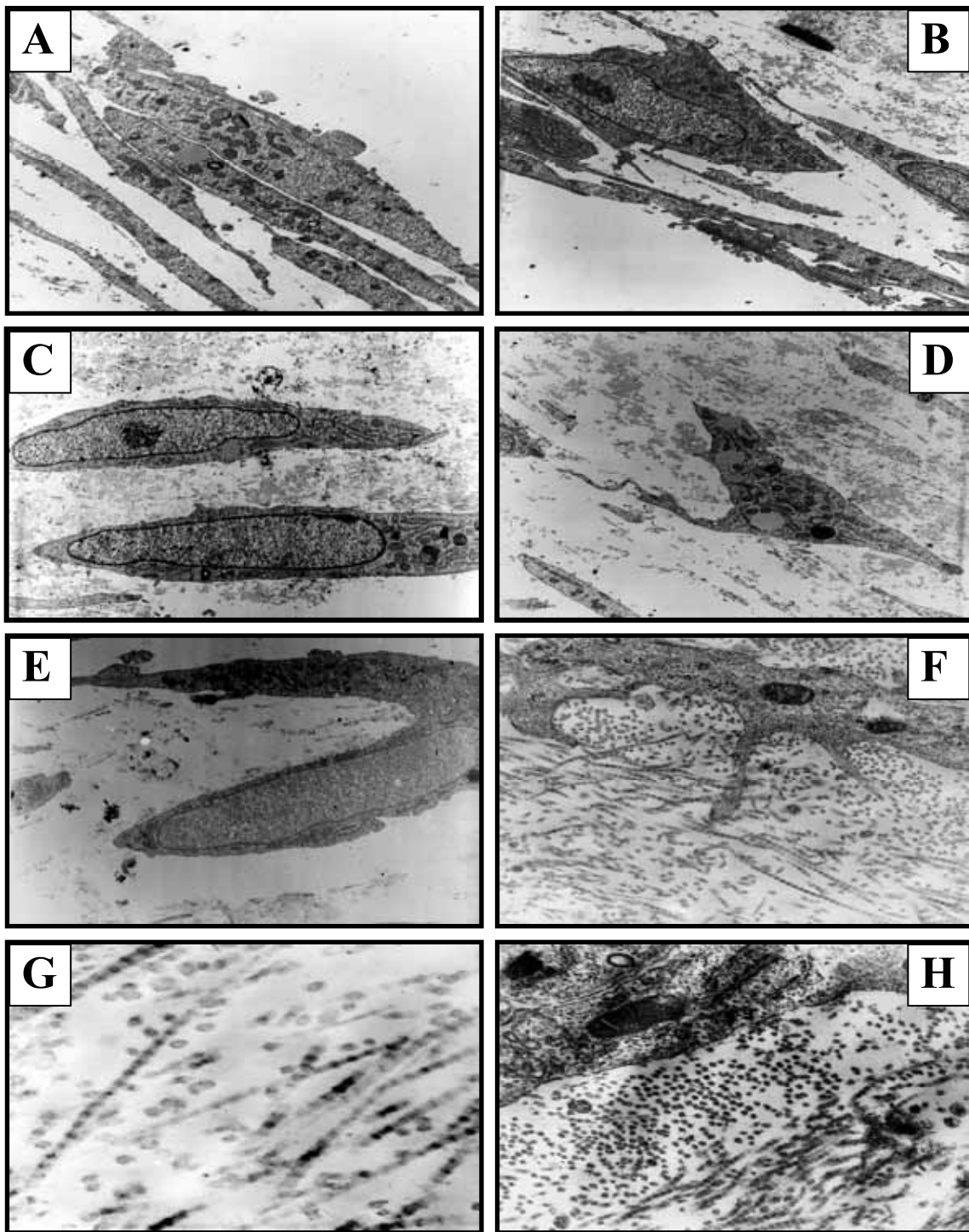




شکل ۲: ارزیابی تمایز به استخوان و چربی سلولهای استخراج شده از مغز استخوان سگ. (A) سلولهایی که به مدت ۲۱ روز در معرض محیط تمایز به استخوان بودند، بدون رنگ آمیزی. (B) همان سلولها با رنگ آمیزی آلیزارین رد، میکروسکووپ معکوس فاز کنتراست، بزرگنمایی ۱۰۰× (C). آنالیز RT-PCR برای برخی ژنهای سلولهای استخوانی. (D) سلولهایی که به مدت ۲۱ روز در معرض محیط تمایز به چربی بودند، بدون رنگ آمیزی. (E) همان سلولها با رنگ آمیزی اوئل رد، میکروسکووپ معکوس فاز کنتراست، بزرگنمایی ۱۰۰×. (C) آنالیز RT-PCR برای برخی ژنهای سلولهای چربی.



شکل ۳: تصاویر میکروسکوپ نوری ندولهای استخوانی حاصل از تمایز. (A، B و C) این تصاویر آن بخش از ندول را که در بالا و راست با کادر مستطیلی مشخص شده است، نشان می‌دهد. رنگ آمیزی تولوئیدن بلو.



شکل ۴: تصاویر میکروسکوپ الکترونی از مناطق مختلف ندول استخوانی. (A) سلولهای سطحی ندول، بزرگنمایی ۳۰۰۰× (B) سلولهای عمقی ندول، بخشی که بر روی سطح ظرف کشت واقع بود، بزرگنمایی ۳۰۰۰× (C) سلولهای دوکی واقع در بخش بینابینی ندول، بزرگنمایی ۳۰۰۰× (D) سلول مثلثی شکل بزرگنمایی ۳۰۰۰× (E) یک سلول دوکی خمیده بزرگنمایی ۳۰۰۰× (F) سلول دوکی با زوائد انگشتی شکل در سطح، بزرگنمایی ۳۰۰۰× (G) رشته‌های کلاژن مخطط، بزرگنمایی ۱۵۰۰۰× (H) باندهای عمود بر هم کلاژن، بزرگنمایی ۷۰۰۰×.

برخی از محققین معتقدند که در استراتژیهای سلول درمانی بهتر است که سلولها به صورت تمایز نیافته پیوند شود زیرا محیط بدن microenvironment لازم برای تمایز را فراهم می کند و از طرفی با انجام این عمل نیازی به نگهداری طولانی مدت سلول در محیط کشت نیست. رویکرد دوم این است که پیش از سلول درمانی بهتر است سلولهای مزانشیمی به بافت کاملاً تمایز یافته تبدیل شود، برای مثال اگر قرار است از سلول برای بازسازی بافت استخوانی استفاده شود بهتر است سلول فوق در محیط کشت به سلولهای ترمینال استخوانی تبدیل شود و سپس در محل ضایعه پیوند شود این رویکرد پیوند سلولهای تمایز یافته را تضمین می کند و از تمایزهای ناخواسته سلول مزانشیمی (مثلاً تمایز به سلول چربی) جلوگیری می کند (۱۹،۲۰). بنابراین اگر رویکرد دوم را بپذیریم اهمیت تمایز آزمایشگاهی سلول مزانشیمی به استخوان آشکار می شود. البته این کار مکرراً انجام شده ولی تمایز ساختاری سلولها که موضوع مطالعه حاضر است گزارش نشده است.

ما در مطالعه حاضر سلولهای مزانشیمی سگ را برای انجام تحقیق انتخاب کردیم. ضایعات بافتی نرم مانند آسیبهای عصبی و کبدی در حیوانات کوچکتر نظیر رت قابل مطالعه است ولی برای ضایعات استخوانی، حیوانات کوچکتر مدل مناسبی نیستند. مطالعات پیشین نشان داده است که برای این منظور سگ مدل بسیار مناسبی است زیرا این حیوان از لحاظ بیومکانیکی نیز شباهتهای زیادی به انسان دارد (۲۳). بنابراین در تحقیق حاضر سلولهای مزانشیمی مورد استفاده از مغز استخوان سگ استخراج شد.

یکی از محدودیتهای کار با سلول مزانشیمی این است که این سلولها بر خلاف سایر سلولها (نظیر

## بحث

با وجودیکه در تعدادی تحقیق، پتانسیل تمایز به استخوان سلولهای بنیادی مزانشیمی مورد مطالعه قرار گرفته است و این پتانسیل به عنوان یک ویژگی شاخص برای این سلولها مطرح شده است (۲۱-۳۱)، گزارشی در مورد ساختار بافت استخوان تشکیل شده در محیط آزمایشگاه وجود ندارد. مطالعات پیشین نشان داده است که در اثر تمایز سلول مزانشیمی به استخوان، mRNA کلاژن تایپ I که ساختار اصلی استخوان می باشد، به مقدار زیادی تولید می شود ولی اینکه این رشته ها پس از ترشح در بینابین سلولها چه آرایشی دارند، گزارشی وجود ندارد. همچنین آرایش و ساختار سلولهای بافت استخوان حاصل از تمایز مشخص نیست. مطالعه حاضر اولین توصیف ساختار استخوان حاصل از تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی است.

باید خاطر نشان کرد که مطالعه ما اولین گزارش تمایز به استخوان و چربی سلولهای مزانشیمی سگ نیست و پیش از این در طی چندین تحقیق، Kadyala و همکاران، Tang و همکاران و همچنین Volk و همکاران وجود پتانسیل تمایز به استخوان و چربی این سلولها گزارش کرده اند (۲۱-۲۳) و گزارش ما چه از نظر روش القای تمایز و چه از نظر ارزیابی و نتایج تمایز تفاوتی با آنها ندارد. آنچه که تفاوت مطالعه ما با مطالعات محققین پیشین محسوب می شود بررسی ساختار و فراساختار استخوان حاصل از تمایز است که در پژوهش های گذشته مورد توجه نبوده است.

موضوع تمایز به استخوان سلولهای مزانشیمی، از لحاظ سلول درمانی و پیوند آنها در ضایعات استخوانی اهمیت فراوانی دارد. در مجموع، دو رویکرد برای استفاده از این سلولها در بازسازی استخوان وجود دارد.

اساسی و کلی بافت استخوانی را کسب کرده بود، بطوریکه در خارج، لایه سلولی شبه پریوست تشکیل شده بود و در داخل این لایه توده متشکل از ماتریکس فراوان و تعدادی سلول عمدتاً کشیده شبه استئوسیتی به چشم می‌خورد. نکته مهم در ارتباط با ماتریکس ترشحی این بود که آرایش رشته‌های کلاژن آن منظم بود بطوریکه دستجات مجاور عمود بر هم قرار گرفته بودند. با توجه به این ویژگی می‌توان چنین استدلال کرد که استخوان حاصل از تمایز آزمایشگاهی سلولهای مزانشیمی تا حدودی ساختاری مشابه با ساختار استخوان لامینار را کسب می‌کند. البته ما در تصاویر تهیه شده از برشها، سیستم هاورس موجود در استخوان لامینار را مشاهده نکردیم که با توجه به اینکه این سیستم در اطراف و در پاسخ به باندل عروقی-عصبی تشکیل می‌شود و محیط کشت ما فاقد این عوامل بود، دور از ذهن نمی‌باشد.

### نتیجه‌گیری

روی هم رفته می‌توان گفت که استخوان حاصل از تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی سگی، از لحاظ آرایش رشته‌های کلاژن شباهت زیادی به استخوان لامینار دارد تا استخوان woven که در آن رشته‌های کلاژن بطور اتفاقی و بدون هیچگونه آرایش خاصی واقع شده‌اند. همچنین با توجه به ساختار بافت حاصل به ویژه ساختار سلولها که مرفولوژی کاملاً تمایز یافته‌ای داشتند چنین به نظر می‌رسد که سیستم تمایز *in vitro*، پتانسیل لازم برای تولید بافت استخوانی مناسب جهت بازسازی استخوان را دارد.

استئوژنریس با دو روش داخل غشایی و داخل غضروفی اتفاق می‌افتد در مطالعه حاضر ما با توجه به

سلولهای هماتوپویتیکی) مارکر ویژه‌ای را بیان نمی‌کنند، بنابراین شناسایی این سلولها با بهره‌گیری از یک شاخص منحصر به فرد امکان پذیر نیست (۳۴-۳۲). اعتقاد بر این است که تنها راه حصول اطمینان از ماهیت مزانشیمی سلول جدا شده، بررسی پتانسیل آن در تمایز به دو یا چند رده سلولی می‌باشد (۳۶, ۳۵). ما در مطالعه حاضر سلولها را بر اساس روش Kadiyala و همکاران جدا کردیم و علاوه بر مطالعه پتانسیل تمایز به استخوان، توان آنها را در تمایز به سلولهای چربی نیز مورد آزمایش قرار دادیم. وجود پتانسیل تمایز به دو رده استخوانی و چربی ما را متقاعد کرد که سلولهای جدا شده از مغز استخوان سگ، همان سلولهای توصیف شده توسط Kadiyala و دیگران بوده است.

در مطالعه حاضر سلولهای جدا شده از مغز استخوان سگ، ۲۱ روز در محیط استئوژنیک قرار گرفت و در پایان این مدت ساختار استخوان حاصل با میکروسکوپ الکترونی بررسی شد. البته مرفولوژی سلول تا حدودی نشانگر نوع سلول است ولی بطور قطع با استفاده از آن نوع سلول مورد مطالعه قابل تعیین نیست لذا برای تعیین نوع سلول و حصول اطمینان از استئوبلاست بودن آن، ما در تحقیق حاضر از بررسی برخی مارکر استخوان در سطح mRNA استفاده کردیم. بدین ترتیب که سلولها در پایان دوره تمایز از لحاظ بیان کلاژن I و استئوپوتین بررسی شدند و تولید mRNA این مارکرها تأیید شد. لذا ما متقاعد شدیم که سلولهای مورد مطالعه ما سلولهای استخوانی هستند. البته مثبت بودن رنگ آمیزی آلیزارین رد نیز دلیل دیگری بر تمایز به استخوان سلولهای مزانشیمی جدا شده بود.

بر اساس نتایج ما، هر کدام از ندولهای تشکیل شده در پایان دوره تمایز، از لحاظ هیستولوژیک ساختار

فواصل زمانی معین از لحاظ تمایز استخوان و غضروف بررسی شوند تا چنانچه در طی تشکیل استخوان، غضروفی تشکیل می‌شود مشخص گردد. با این طراحی همچنین می‌توان تشکیل و یا عدم تشکیل Woven bone را در طی تمایز سلول مزانشیمی بررسی کرد.

هدفی که داشتیم تمایز نهایی-ساختاری سلولهای مزانشیمی را پس از ۲۱ روز دوره تمایز بررسی کردیم. اینکه استخوان حاصل با کدام روش (داخل غشایی یا داخل غضروفی) تشکیل شده، خارج از توانایی متد ما بود و به مطالعه بیشتری نیاز دارد. طراحی این مطالعه بایستی به گونه‌ای باشد که سلولهای در حال تمایز در

## References

1. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering, state of the art and future trends. *Macromol Biosci* 2004; 9:743-765.
2. Hing KA. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? *Philos Transact a Math Phys Eng Sci* 2004; 362:2821-2850.
3. Logeart-Avramoglou D, Anagnostou F, Bizios R, Petite H. Engineering bone: challenges and obstacles. *J Cell Mol Med* 2005; 9:72-84.
4. Rah Dk. Art of replacing craniofacial bone defects. *Yonsei Med J* 2000; 41:756-65.
5. Hannouche D, Raould A, Nizard RS, Sedel L, Petite H. Embedding of bone samples in methylmethacrylate: A suitable method for tracking lacz mesenchymal stem cells in skeletal tissues. *J Histochem Cytochem* 2006; 55:255-265.
6. Damien CJ, Parsons R. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater* 1991; 2: 187-208.
7. Rose FR, Oreffo RO. Bone tissue engineering: hope vs hype. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 292:1-7.
8. Shors EC. Coralline bone graft substitutes. *Orthop Clin North Am* 1999; 30:599-613.
9. Agrawal CM, Ray Rb. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 2001; 55:141-150.
10. Leong KF, Cheah CM, Chua CK. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials* 2003; 24:2363-2378.
11. Khademhosseini A, Langer R, Borenstein J, Vacanti JP. Microscale technologies for tissue engineering and biology. *PNAS* 2005; 103:2480-2487.
12. Bruder SP, Fox BS. Tissue engineering of bone: Cell based strategies. *Clin Orthop* 1999; 367: 68-83.
13. Heng BC, Cao T, Stanton LW, Robson P, Olsen B. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage in vitro. *J of Bone and Min Res* 2004; 19: 1379-1394.
14. Zur Nieden NI, Kempka G, Ahr HJ. In vitro differentiation of embryonic stem cells in to mineralized osteoblasts. *Differentiation* 2003; 71:18-27.
15. Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG. Expression of bone sialo protein (BSP) in developing human tissues. *Calcify Tissue Int* 1991; 49: 421-426.
16. Helder MN, Bronckers AL, Woltgens SH. Dissimilar expression patterns for the extracellular matrix proteins osteopontin (OPN) and collagen type I in dental tissues and alveolar bone of neonatal rat. *Matrix* 1993; 13:415-425.
17. Bronckers AL, Gay S, Finkelman RD, Butler WT. Developmental appearance of Gla proteins (osteocalcin) and alkaline phosphatase in tooth germs and bones of the rat. *Bone Miner* 1987; 2: 361-373.
18. Thomas G, Moffatt P, Salois P, Gaumond MH, Gingras R, Godin E, and et al. A novel bone secreted protein that modulates the osteoblast phenotype. *J Biol Chem* 2003; 278:50563-50571.

19. Pioletti D, Montjovent MC, Zambelli PY, Applegate L. Bone tissue engineering using fetal cell therapy. *Swed Med Wkly* 2002; 136: 557-560.
20. Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barrier and opportunities. *Science* 2000; 287: 1442-1446.
21. Tang Y, Li Y, Chen H, Wu Q, Yin G, Zhou D. Growth and osteogenic characteristics of cultured canine mesenchymal stem cells under osteogenic induction. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 2006; 23: 142-146.
22. Volk SW, Diefenderfer DL, Christopher SA, Haskins ME, Leboy PS. Effects of osteogenic inducers on cultures of canine mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res* 2005; 66:1729-1737.
23. Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant* 1997; 6: 125-134.
24. Kim H, Lee JH, Suh H. Interaction of mesenchymal stem cells and osteoblasts for in vitro osteogenesis. *Yonsei Med J* 2003; 30 (44): 187-197.
25. Huang JW, Chen WJ, Liao SK, Yang CY, Lin SS, Wu CC. Osteoblastic differentiation of rabbit mesenchymal stem cells loaded in a carrier system of Pluronic F127 and Interpore. *Chang Gung Med J* 2006; 29: 363-372.
26. Scutt A, Bertram P. Basic fibroblast growth factor in the presence of dexamethasone stimulates colony formation, expansion, and osteoblastic differentiation by rat bone marrow stromal cells. *Calcif Tissue Int* 1999; 64: 69-77.
27. Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol* 2006; 10: 7-14.
28. 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(1): 395-406.
29. Vidal MA, Kilroy GE, Johnson JR, Lopez MJ, Moore RM, Gimble JM. Cell growth characteristics and differentiation frequency of adherent equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity. *Vet Surg* 2006; 35:601-610.
30. Park KS, Lee YS, Kang KS. In vitro neuronal and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood. *J Vet Sci* 2006; 7: 343-348.
31. Hong L, Colpan A, Peptan IA. Modulations of 17-beta estradiol on osteogenic and adipogenic differentiations of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 2006; 12: 2747-2753.
32. Seshi B, Kumar S, Sellers D. Human bone marrow stromal cells: co-expression of markers specific for multiple mesenchymal cell lineages. *Blood Cells Mol Dis* 2000; 26: 234-246.
33. Majumdar MK, Thiede MA, Hynesworth SE, Bruder SP, Gerson SL. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *J Hemathother Stem Cell Res* 2000; 9: 841-848.
34. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, and et al. Marrow-derived stromal cells express gene encoding a broad spectrum of arteiogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteiogenesis through paracrine mechanism. *Circ Res* 2004; 94: 678-685.
35. Alhadlaq A, Mao JJ. Tissue-engineered neogenesis of human-shaped mandibular condyle from rat mesenchymal stem cells. *J Dent Res* 2003; 82: 951-956.
36. Alhadlaq A, Elisseeff J, Hong A, Williams C, Caplan AI, Sharma Band et al. Adult stem cell driven genesis of human-shaped articular chondyle. *Ann Biomed Eng* 2004; 32: 911-923.