

مطالعه تاثیر هم کشتی کندروسیت‌های بالغ بر تمایز به غضروف سلول‌های بنیادی

مزاننشیمی جدا شده از مغز استخوان موش NMRI

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

* پژوهشکده رویان، گروه سلول‌های بنیادی

وصول: تیرماه ۸۵، پذیرش: شهریورماه ۸۵

چکیده

هدف: بررسی اثر سلول‌های کندروسیت بالغ جدا شده از انتهای دنده رت بر تمایز به غضروف سلول‌های بنیادی مزاننشیمی جدا شده از مغز استخوان موش NMRI

مواد و روشها: موش‌های NMRI با سن تقریبی ۶-۷ هفته قربانی شدند و سلول‌های مزاننشیمی مغز استخوان آنها با روش کشت با تراکم پایین جدا شد و با انجام دو پاساژ متوالی تکثیر و خالص شد. کندروسیت‌های بالغ نیز از بافت غضروف انتهای دنده رت wistar تهیه و در داخل فلاسک‌های ۲۵ سانتی مترمربع کشت شد. برای انجام هم کشتی از سلول‌های مزاننشیمی پاساژ دوم و کندروسیت‌های کشت اولیه استفاده شد. بدین ترتیب که این دو سلول با نسبت‌های ۱/۱، ۲/۱ و ۱/۲ مخلوط شد و در یک سیستم کشت Micro-mass و در داخل محیط فاقد فاکتورهای رشد القای کننده تمایز به غضروف به مدت ۲۱ روز کشت شد. در پایان این مدت گروه‌های مختلف از لحاظ تمایز به غضروف، با روش‌های رنگ آمیزی اختصاصی تولوئیدن بلو و روش (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) RT-PCR مطالعه شد.

یافته‌ها: در کشت اولیه سلول‌های مغز استخوان موش، سلول‌هایی با مورفولوژی چند ضلعی، کشیده، پهن و دوکی مشاهده شد. جمعیت سلول‌های دوکی مزاننشیمی در پاساژ دو افزایش یافت و محیط کشت را پر کرد. کندروسیت‌های رتی در پایان هفته دوم کشت اولیه، با مورفولوژی چند وجهی ظرف کشت را پر کردند. نتایج بررسی هم کشتی نشان داد در گروه ۲/۱ (کندروسیت‌ها دو برابر مزاننشیمی) ماتریکس متاکروماتیک یکنواختی تولید شده و mRNA کلاژن II، X و aggrecan (شاخص‌های غضروف موش سوری) به مقدار زیادی تولید شده است. این در حالی بود که در گروه‌های دیگر ماتریکس متاکروماتیک به صورت پراکنده تولید شده بود و ژن‌های شاخص غضروفی با شدت کمتری بیان شده بودند.

نتیجه گیری: به نظر می‌رسد سیستم هم کشتی با کندروسیت یک استراتژی مناسب برای تمایز به غضروف سلول‌های مزاننشیمی است. در این سیستم نسبت سلول‌های مورد استفاده در هم کشتی از لحاظ القای تمایز غضروفی اهمیت دارد.

کلیدواژه‌ها: سلول‌های بنیادی مزاننشیمی موشی، کندروسیت رتی، هم کشتی، تمایز به غضروف

آدرس مکاتبه: تهران، زعفرانیه، خیابان آصف، کوچه سیمین، پلاک ۳۶
E-mail: bagesla@yahoo.com صندوق پستی: ۱۹۳۹۵-۴۶۴۴

مقدمه

پیشرفت در علم بیولوژی سلولی باعث شده که امروزه گرایش زیادی به استفاده از سلول درمانی در ترمیم ضایعات بافتی از جمله بافت غضروف وجود داشته باشد [۱]. بافت غضروف مفصلی به دلیل نداشتن رگ خونی، در مواقع آسیب، به سختی ترمیم می‌شود [۴-۲]. تا کنون روشهای جراحی مختلفی برای درمان ضایعات یا تحلیل رفتگیهای آن به کار گرفته شده است. از جمله روشهای به کار رفته، پیوند کندروسیت به تنهایی و یا به صورت ترکیب با داربست ویژه در محل آسیب دیده غضروفی است [۵ و ۶].

یکی از مشکلات بزرگ در ارتباط با پیوند کندروسیت، منبع سلولی است. معمولاً برای گرفتن سلول از غضروف مفصلی استفاده می‌شود که برای این منظور بایستی با انجام عمل جراحی تکه ای از بافت غضروف مفصلی برداشته شود. با توجه به محدودیت بافت اخذ شده، با این روش تعداد سلول به دست آمده کافی نیست. از طرفی، تحقیقات پیشین نشان داده است که تکثیر کندروسیتها در آزمایشگاه، سبب تمایززدایی آنها شده و در نتیجه سلولها از نظر مورفولوژی دچار تغییر شده و خصوصیات ترشحي خود را از دست می‌دهند [۷-۹].

منبع سلولی دیگر برای استفاده در پیوند به منظور ترمیم ضایعات غضروفی سلولهای بنیادی مزانشیمی است. امروزه این سلولها، به دلیل داشتن خصوصیات ارزنده از جمله پتانسیل رشد و تکثیر نامحدود در آزمایشگاه، توانایی تمایز به دودمانهای مزانشیمی (سلولهای استخوانی، غضروف و چربی) و راحتی دسترسی به آنها اهمیت زیادی پیدا کرده‌اند (۱۰ و ۱۱).

نکته‌ای که در به‌کارگیری سلولهای مزانشیمی با هدف بازسازی غضروف وجود دارد، این است که در یک استراتژی تپییک سلول درمانی سعی بر این است که از سلولهای کاملاً تمایز یافته استفاده شود. این رویکرد انتقال کندروسیتها را به محل مورد نظر تضمین کرده و از طرفی از تمایزهای ناخواسته در محل آسیب دیده غضروف مفصلی از جمله تمایز به

استخوان و چربی که از تواناییهای بالقوه سلولهای مزانشیمی است. در این زمینه، سلولهای مزانشیمی میتوانند در درمان ضایعات غضروفی موثر واقع شوند. اولین قدم این است که سلولهای فوق به غضروف تمایز یابند که این امر معمولاً در محیط کشت صورت می‌گیرد. یکی از راه‌های تمایز به غضروف سلولهای مزانشیمی، سیستم کشت Plit است. برای ایجاد این سیستم، ابتدا یک تراکمی از سلولهای مزانشیمی ایجاد می‌گردد و سپس محیط تمایز کندروژنیک بر روی آن اضافه می‌شود [۱۳-۱۹]. راه دیگر تمایز به غضروف استفاده از سیستمهای هم‌کشتی است. سیستمهای هم‌کشتی، با فراهم کردن تماس مستقیم سلول به سلول، Transduction سیگنالهای مولکولی را تقویت نموده، در نتیجه تمایز سلولی را تسهیل می‌نمایند [۱۲]. در این ارتباط، تحقیقات پیشین نشان داده است که کندروژنیز سلولهای مزانشیمی در زمان هم‌کشتی با ماکروفازهای پوشش سینویال و سلولهای کالواربای جنینی تقویت شده است [۲۰ و ۲۱]. نکته‌ای که وجود دارد این است که سلولهایی که در چنین سیستمهایی تمایز یافته‌اند، قابل پیوند در ضایعات غضروفی نیستند زیرا قابل جدا سازی از سلولهای هم‌کشتی نیست. به عبارتی در صورتی می‌توان از این سلولها استفاده کرد که بتوان آنها را از مخلوط سلولهای هم‌کشتی به‌طور خالص استخراج کرد. بنابراین طراحی سیستمی که چنین مشکلاتی را نداشته باشد ضروری به نظر می‌رسد.

سیستم هم‌کشتی سلولهای مزانشیمی و کندروسیتهای بالغ، از این نظر که سلولهای هم‌کشتی، کندروسیت هستند، این مشکل را ندارند. بنابراین چنانچه خواسته شود از این سلولها در پیوند استفاده شود مشکل جدا سازی آنها (و یا به عبارتی حذف سلولهای هم‌کشتی) وجود ندارد در این سیستم در واقع از دو کاندیدای بالقوه در سلول درمانی ضایعات غضروفی یعنی سلول مزانشیمی و کندروسیت استفاده شده است. این استراتژی (ترکیب سلول مزانشیمی و کندروسیت) از یک طرف سیگنال قوی کندروژنیز برای تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی فراهم می‌کند و از طرفی مشکل تعداد کم

در هر یک از خانه‌های ظروف کشت ۶ چاهکی کشت شد. سپس ظرف حاوی سلول به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ منتقل گردید. بعد از ۲ روز محیط رویی خارج و محیط DMEM تازه اضافه شد. 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 trypsin- EDTA ۰/۲ درصد (Gibco;Germany) 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 استفاده شدند. برای انجماد از ترکیب ۳۰ درصد DMSO (Dimethyl Sulfoxide: Sigma, USA) ۵، درصد FCS و ۶۵ درصد DMEM استفاده شد. هر فلاسک ۲۵ سانتی متری به ۵ ویال انجماد تقسیم شد.

کشت بافت غضروف

رت‌های نر Westar به وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم به روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شدند. قفسه سینه به کمک الکل ۷۰ درصد ضد عفونی شد و بافت نرم موجود در روی دنده‌ها به طور کامل جدا شد. بافت غضروف انتهای دنده جدا شد و در داخل محیط کشت DMEM به قطعات ۲-۳ میلی متری بریده شد. تکه‌های بافت غضروف دو بار با محلول PBS + شسته شد و به داخل یک میلی لیتر محلول ۲٪ درصد کلاژناز تیپ I (sigma, USA) منتقل شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد. در پایان این مدت، تکه‌های بافت به حالت ژله ای در آمد بود و اتصال سلولها با یکدیگر کاهش یافته بود. این قطعات به یک فلاسک کشت ۷۵ سانتی متری منتقل شد و ۱۵ میلی لیتر محیط DMEM به آن اضافه شد. پس از طی دو روز تکه‌های بافت به کف ظرف کشت چسبیدند و سلولهای کندروسیت از آن شروع به مهاجرت و تکثیر کردند. کشت اولیه کندروسیتها، سلولها در هم کشتی استفاده شد.

کندروسیتها را در زمان پیوند به منظور بازسازی ضایعات غضروفی حل می‌نماید.

در ارتباط با این سیستم هم کشتی، تنها یک مطالعه وجود دارد. کوهی (Kohei) و همکاران در سال ۲۰۰۴ با مطالعه چنین سیستم هم کشتی، اذعان کردند که کندروسیتها، فاقد تاثیرات کندروژنیک روی سلولهای مزانشیمی هستند [۱]. این در حالی است که نتایج مطالعه حاضر، که به این موضوع (سیستم هم کشتی سلولهای مزانشیمی با کندروسیت‌های بالغ) پرداخته، حاکی از تاثیرات فراوان کندروژنیک کندروسیتها بر سلولهای مزانشیمی است.

مواد و روشها

کشت سلولهای مزانشیمی مغز استخوان

سلولهای مزانشیمی به روشی که در مقاله پیشین ما ذکر شده جدا سازی شد [۲۲-۲۳]. به‌طور خلاصه، موشهای نر، نژاد NMRI به سن تقریبی ۸-۶ هفته‌ای به روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شدند و در شرایط کاملاً استریل، استخوانهای ران و ساق پای آنها جدا شد. در زیر هود لامینار، بافت همبند اطراف استخوانها به طور کامل پاک شده و با استفاده از قیچی استریل دو سراسر استخوان 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 درصد سرم (Fetal Bovine Serum) (Gibco, Germany) 100، واحد بین المللی آنتی بیوتیک پنی سیلین و ۱۰۰ واحد بین المللی استروپتومایسین (Gibco; Germany) پر شده بود، به روش اسپیره کردن در یک لوله ۱۵ میلی لیتر تخلیه گردید و با دور ۱۲۰۰g سانتریفوژ شد. سپس سلولها در ۱ میلی لیتر محیط DMEM تازه معلق شدند و از فیلترش (mesh) ۷۰ میکرومتر عبور داده شدند. در این مرحله سلولهای حاصل از هر استخوان دراز به کمک لام نئوبار مورد شمارش سلولی قرار گرفت و تعداد ۵۰۰ سلول پس از گذشت دو هفته، ظرف کشت را پر کرد که از این

شد و پس از آن ۱ میکروگرم از RNA استخراج شده با استفاده از پرایمرهای 5'-Reverse primer Collagen type II: TGGACAGTAGACGGAGGA AAGTC -3', Forward primer 5'-GGCTTAGGGCAGAGA GAG AAG G-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', و Random Hexamer از کیت (K 1622 Fermentas) Revert AidTMH Minus First cDNA Synthesis Strand نسخه‌برداری معکوس شد. سپس از cDNA تولید شده به عنوان الگو برای PCR استفاده شد برای این منظور (۱۰۰ng/μl) cDNA ۲ μl, PCR Buffer (AMS), ۲ μl (۱۰mM) و ۰/۷۵ μl MgCl₂ (۵۰mM), ۲/۵ μl (۱۰×) Smar Taq (5unit/1μl), ۱ μl (۵μM), ۰/۵dNTPmix (۰/۵μl) (سینازن، TA8110C) در یک لوله PCR با یکدیگر مخلوط شدند و در نهایت با استفاده از آب دوبار تقطیر به حجم ۲۵ μl رسانده شد. پس از انجام PCR محصولات آن بر روی آگارز ۱/۷ درصد جدا شدند و سپس با اتیدیوم بروماید قابل مشاهده شدند.

یافته‌ها

کشت سلولهای MSCs¹

درکشت اولیه تعدادی از سلولها چسبیدند و منشا کشت شدند و برخی نیز به حالت شناور باقی ماندند که با تعویض محیط کشت دور ریخته شدند. سلولها در کشت اولیه به اشکال ستاره ای، دوکی، چند ضلعی پهن و گرد مشاهده شدند. با انجام پاساژ جمعیت سلولهای دوکی افزایش یافت به طوری که در پاساژ دوم جمعیت نسبتاً خالصی از این سلولها ظاهر شد.

1. Mesenchymal Stem Cells

هم‌کشتی سلولهای m-MSCs و کندروسیت‌های رت

برای انجام هم‌کشتی از سلولهای کشت اولیه کندروسیت و پاساژ دوم سلولهای بنیادی مزانشیمی استفاده شد. سلولها در یک سیستم Micro-mass هم‌کشتی شدند. بدین ترتیب که ۲×۱۰^۵ سلول متشکل از دو سلول مزانشیمی و کندروسیت شمارش شد و در داخل لوله ۱۵ سانتیمتری قرار گرفت و تحت ۱۲۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد تا پلت سلولی تشکیل شود. در مطالعه حاضر نسبت‌های مختلف ۱/۱ (یک قسمت سلول مزانشیمی/یک قسمت کندروسیت)، ۲/۱ (یک قسمت سلول مزانشیمی/دو قسمت کندروسیت)، ۱/۲ (دو قسمت سلول مزانشیمی/یک قسمت کندروسیت) بررسی شد. پلت‌های سلولی در داخل محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم و آنتی بیوتیک به مدت ۲۱ روز کشت شدند. محیط سلولها هر ۲-۳ روز یکبار تعویض شد.

رنگ آمیزی تولوئیدین بلو

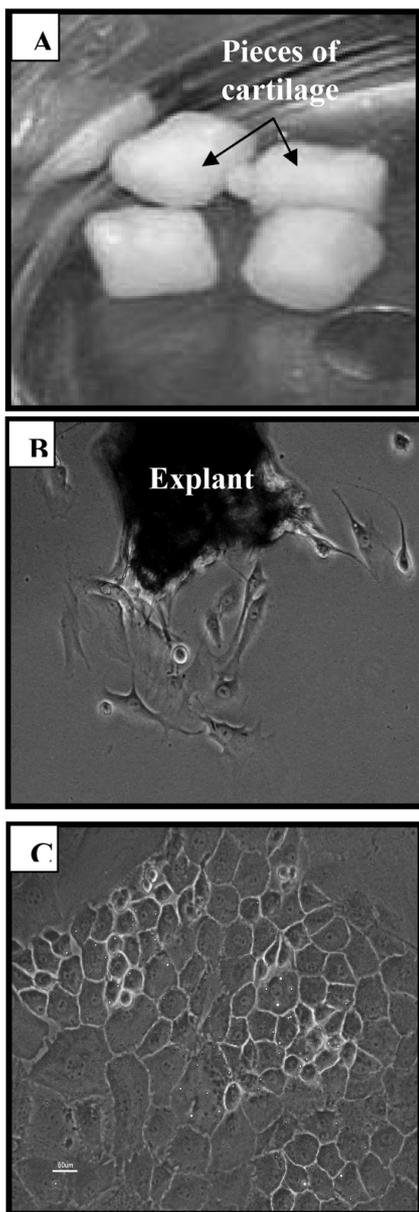
به منظور بررسی تولید ماتریکس متاکروماتیک در کشت از این رنگ آمیزی استفاده شد، بدین ترتیب که ابتدا توده‌های سلولی به مدت ۲ ساعت با پارافمالداید ۴ درصد تثبیت شد و پس از انجام مرحله آبگیری و تهیه بلوک پارافینی، برشهای ۵ میکرومتری تهیه شد و لامهای به‌دست آمده با استفاده از رنگ تولوئیدین بلو رنگ آمیزی شد.

RT-PCR

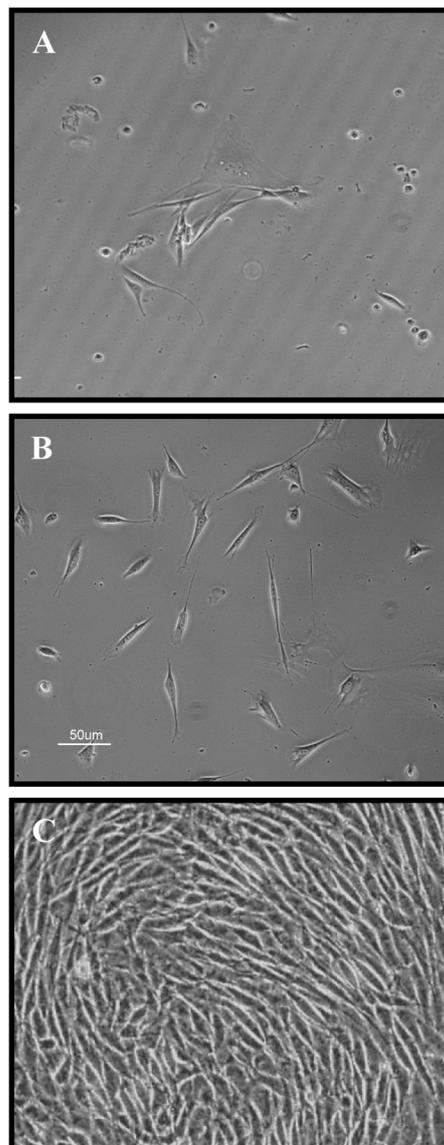
در ابتدا با استفاده از کیت (740955; Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel, Germany) کل موجودی RNA سلولی از سلولهای مزانشیمی تمایز یافته به غضروف استخراج شد. نمونه‌های RNA استخراج شده تحت تیمار با (104132, Roch) Dnase I قرار گرفتند تا آلودگیهای احتمالی مربوط به DNA ژنومیک از نمونه‌های RNA حذف شود. سپس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

داشتند با گذشت زمان سلولهای فوق تکثیر شدند و ظرف دو هفته پس از آغاز کشت ظرف کشت را کاملا پر کردند. در این زمان سلولها چند وجهی بودند. از کشت اولیه کندروسیتها برای هم کشتی استفاده شد.

از این سلولها برای هم کشتی استفاده شد.



شکل ۲. کشت بافت غضروف. بافت غضروف در محلول کلاژناز I (A); بزرگنمایی: $\times 10$). کندروسیتها در حال مهاجرت از بافت غضروف مشاهده شد (B; بزرگنمایی: $\times 20$). تک لایه ای از سلولهای کندروسیت در کشت اولیه ایجاد شد (C; بزرگنمایی: $\times 40$).



شکل ۱. کشت سلولهای مزانشیمی. کشت اولیه حاوی سلولهایی با مورفولوژی گرد، چند ضلعی، کشیده و دوکی بود (A; بزرگنمایی: $\times 10$). در پاساژ اول سلولهای غیز دوکی حذف شد و تعداد سلولهای دوکی افزایش یافت (B; بزرگنمایی: $\times 10$). در پاساژ دوم جمعیت خالصی از سلولهای دوکی ظاهر شد (C; بزرگنمایی: $\times 20$).

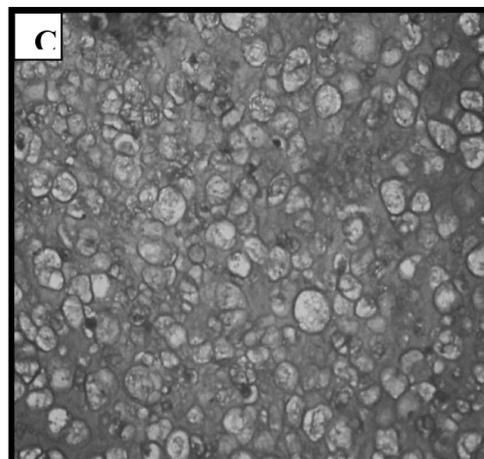
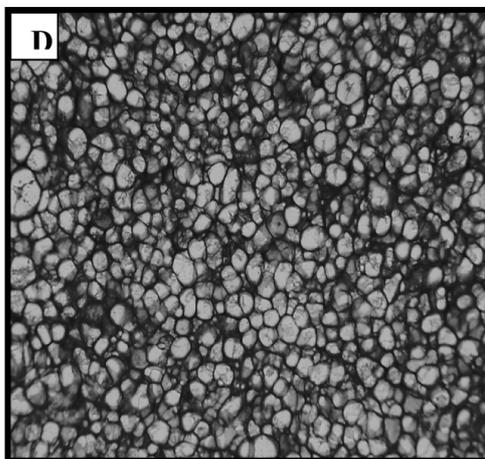
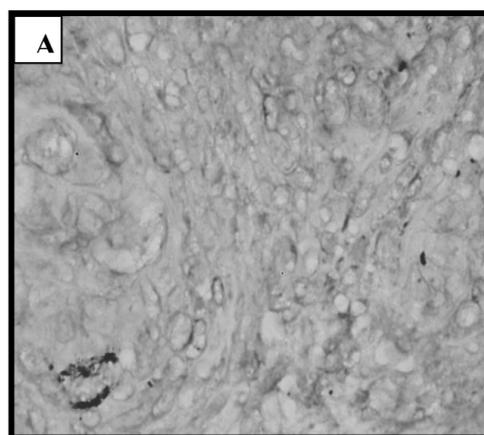
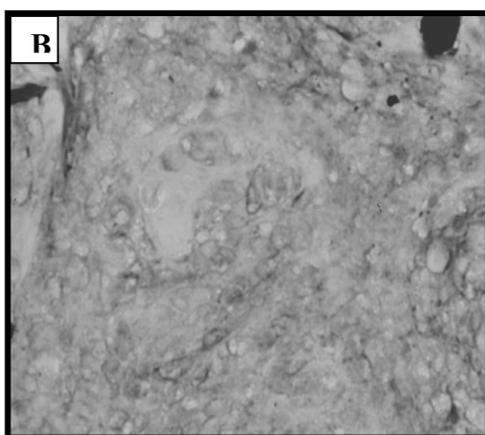
کشت بافت غضروف

چند روز پس از آغاز کشت، کندروسیتها از حاشیه های قطعات غضروفی مهاجرت کردند و در اطراف قطعه غضروفی به سطح ظرف کشت چسبیدند این سلولها ظاهری کشیده

رنگ آمیزی تلوئیدن بلو

نتایج حاصل از رنگ آمیزی تلوئیدن بلو نشان دهنده آن بود که در گروهی که تعداد کندروسیتها دو برابر سلولهای مزانشیمی بود، ماتریکس متاکروماتیک به مقدار زیاد و به صورت یکنواخت تولید شده است. در گروههای ۱/۱ (یک قسمت سلول مزانشیمی / یک قسمت کندروسیت)، ۱/۲ (دو قسمت سلول مزانشیمی / یک قسمت کندروسیت) ماتریکس

متاکروماتیک که نشانه تمایز به غضروف است به مقدار کم و به صورت پراکنده تولید شده بود. همچنین بر اساس این تصاویر در گروه کنترل (سلول مزانشیمی در محیط کندروژنیک حاوی TGF (Transforming Growth Factor r-B3) و BMP6 (Bone Morphogenic Protein-6) نیز ماتریکس متاکروماتیک تشکیل شده بود ولی میزان آن کمتر از گروه ۲/۱ به نظر رسید.



شکل ۳. رنگ آمیزی تلوئیدن بلو. نسبت سلولی ۱/۱ (سلولهای مزانشیمی به ۱ کندروسیت) خاصیت متاکروماتی مشاهده نشد (A: بزرگنمایی $\times 20$)، نسبت سلولی ۱/۲ (۱ سلولهای کندروسیت به ۲ مزانشیمی) خاصیت متاکروماتی رنگ در این گروه نیز مشاهده نشد (B: بزرگنمایی $\times 20$)، نسبت سلولی ۲/۱ (۲ کندروسیت به ۱ مزانشیمی) خاصیت متاکروماتی مشاهده شد (C: بزرگنمایی $\times 20$)، نمونه کنترل (تمایز به غضروف سلولهای مزانشیمی به روش کشت پلت) در این گروه نیز خاصیت متاکروماتی مشاهده شد (D: بزرگنمایی $\times 20$)

بلو بود. در گروه ۲/۱ که بیشترین متاکروماتی را داشت، mRNA اگرکان به مقدار زیادی تولید شده بود در نمونه

RT-PCR

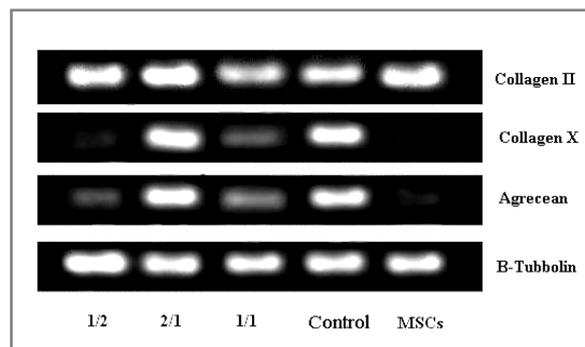
نتایج حاصل از RT-PCR موافق نتایج رنگ آمیزی تلوئیدن -

البته ترشح ماتریکس متاکروماتیک در لابه‌لای سلولها، نشانه حضور سلولهای غضروفی در محل است. در مطالعه حاضر، ترشح این ماتریکس می‌تواند از جانب هر دو نوع سلول مزانشیمی_موشی تمایز یافته به کندروسیت و کندروسیت‌های جدا شده از غضروف دنده ای صورت گرفته باشد. با توجه به اینکه هدف مطالعه حاضر بررسی تمایز به غضروف سلولهای مزانشیمی در زمان هم‌کشتی با کندروسیت‌های بالغ بود، بنابراین به منظور تفکیک بیشتر، وقوع این تمایز با بررسی ژنهای ویژه غضروفی با استفاده از پرابرهای طراحی شده برای غضروف موشی آنالیز شد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که ژنهای غضروف موشی در گروه‌های هم‌کشتی بیان شده است که این مطلب نشانگر این است که حداقل بخشی از ماتریکس ترشحی از جانب سلولهای مزانشیمی تمایز یافته موشی صورت گرفته است.

کوهی (Kohei) و همکاران در سال ۲۰۰۴، سلولهای مزانشیمی انسانی را با کندروسیت‌های گاوی در یک سیستم Micromass هم‌کشتی دادند و نتایج آنها نشان‌دهنده این بود که سلولهای مزانشیمی در چنین سیستمی به غضروف تمایز نمی‌یابند. در حالی که نتایج مطالعه حاضر خلاف آنرا نشان داد [۱]. شاید این اختلاف در نتایج به دلیل تفاوت‌های کار حاضر و مطالعه محققین فوق باشد. در تحقیق حاضر برای هم‌کشتی از سلولهای موش سوری و رت استفاده شده است در حالی که کوهی (Kohei) و همکاران از سلولهای انسانی و گاوی برای ایجاد هم‌کشتی استفاده کردند. نکته دیگر این است که در مطالعه حاضر محیط مورد استفاده در سیستم هم‌کشتی، محیط معمولی تکثیر بود ولی محققین فوق جهت هم‌کشتی از محیط کندروژنیک حاوی فاکتورهای رشد BMP6 و TGF B3 استفاده کردند.

در مطالعه حاضر برای ایجاد سیستم هم‌کشتی از سلولهای بنیادی مزانشیمی استخراج شده از مغز استخوان موش نژاد NMRI استفاده شد. این سلولها با روش نوین جدا شدند. محققان حاضر در مطالعه پیشین روش جدا سازی و پتانسیل

کنترل (سلولهای مزانشیمی به تنهایی) نیز مقدار بیان آگریکان زیاد بود در حالیکه در دو گروه دیگر باند تشکیل شده کم رنگ تر بود. در مورد کلاژن X نیز، باند مربوط به گروه ۲/۱ مشابه گروه کنترل، پر رنگ تر از دو گروه دیگر بود. ژن کلاژن II تقریباً به یک اندازه در گروههای مختلف بیان شده بود.



شکل ۴. RT-PCR ژن کلاژن تیپ II در تمام نسبت‌های سلولی بیان مشابه داشت. ژنهای کلاژن X و آگریکان در نسبت سلولی ۲/۱ مشابه نمونه کنترل (سلولهای مزانشیمی کشت شده در محیط کندروژنیک) بیان بالایی داشت در حالی که در سایر گروه‌ها بیان کمتری نشان داد.

بحث

در مطالعه حاضر سلولهای مزانشیمی موشی با نسبت‌های مختلف با سلولهای کندروسیت غضروفی رت مخلوط شد و در یک سیستم Micro-mass بدون استفاده از محیط کندروژنیک به مدت ۲۱ روز کشت شد و در پایان وقوع کندروژنیز با روشهای مولکولی و هیستوشیمی بررسی شد. بر اساس نتایج در گروهی که تعداد سلولهای کندروسیت دو برابر سلولهای مزانشیمی بود ماتریکس متاکروماتیک بیشتری ترشح شد و شاخصهای ژنی غضروف موشی با شدت بیشتری بیان شد. همچنین در این گروه در مقایسه با گروه کنترل (سیستم کشت Micro-mass سلولهای مزانشیمی در حضور محیط کندروژنیک) ماتریکس بیشتری ترشح شده بود.

به عنوان سلول هم کشتی در این مطالعه استفاده شده بود. بررسی نشد تا تاثیر متقابل سلولهای مزانشیمی را بر کشت کندروسیتها بررسی کنیم ولی شواهد حاکی از این بود که سلولهای فوق در سیستم هم کشتی تا حدودی دچار تمایز زدایی شده‌اند البته تمایز زدایی کندروسیتها در محیط کشت، در مطالعات پیشین نیز گزارش شده است [۹-۷].

یکی دیگر از نکات مطالعه حاضر این بود که به نظر می‌رسید که در گروه هم کشتی ۱ به ۲ در مقایسه با گروه کنترل (مزانشیمی تنها در محیط کندروژنیک) کندوزنزیس با شدت بیشتری اتفاق افتاده است (ماتریکس بیشتری ترشح شده بود) که این مطلب در شکل ۳ بخش C و D به‌وضوح مشخص است (ماتریکس متاکروماتیک بنفش رنگ در گروه هم کشتی با بیش از گروه کنترل است). به نظر می‌رسد هم کشتی با سلولهای غضروفی سیگنالهای کندروژنیک قوی تری در مقایسه با محیط کندروژنیک حاوی فاکتورهای رشد ایجاد می‌کند البته این نکته که سیستم هم کشتی با فراهم کردن تماس مستقیم سلول به سلول، Transduction سیگنالهای مولکولی را کارا تر می‌کند و در نتیجه تمایز سلولی را تسهیل می‌نماید در مطالعات پیشین نیز ذکر شده است [۱۲]. ولی تا بحال سیستم هم کشتی با سیستم کشت روتین تمایز به غضروف (سیستم کشت Micro-mass) مقایسه نشده است.

به‌طور کلی می‌توان گفت سیستم هم کشتی سلول مزانشیمی با کندروسیت روش مناسبی برای تمایز کندروژنیک این سلولها محسوب می‌شود در این سیستم نسبت سلولهای هم کشتی در میزان ترشح ماتریکس غضروفی و بیان ژنهای نشانگر غضروفی موثر است.

تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر با حمایت‌های مالی سازمان گسترش و نو سازی صنایع انجام گرفته است.

تمایزی آنها را به تفضیل نشان داده‌ایم [۲۳-۲۲] و در مطالعه حاضر پتانسیل تمایز به غضروف آنها را در هم کشتی با کندروسیتهای رتی بررسی شد. سلولهای مزانشیمی موشی مدل تحقیقاتی مناسبی برای انسان محسوب می‌شود؛ با این وجود از نظر جداسازی و کشت با سلولهای مزانشیمی انسانی تفاوتی دارد از این نظر که جداسازی آنها با مشکلاتی از قبیل رشد بیش از حد سلولهای غیر مزانشیمی در محیط کشت و عدم تکثیر آنها همراه است [۲۴ و ۲۵]. به همین دلیل تا کنون روشهای گوناگونی برای جدا سازی و تکثیر آنها پیشنهاد شده است. در مطالعه حاضر سلولهای فوق با روش کشت با تراکم پایین از مغز استخوان جدا و تکثیر شد و در سیستم هم کشتی با کندروسیتهای رتی، آنها را به سمت غضروف تمایز داده شد.

نتایج تحقیق حاضر نشان دهنده این بود که سلولهای مزانشیمی در زمان هم کشتی با کندروسیتهای رتی در نسبتهای متفاوت درجات مختلفی از ترشح ماتریکس غضروفی و بیان ژنهای شاخص غضروف (کلاژن II، X و Aggrecan) را نشان دادند. تنها در زمانی که تعداد سلولهای کندروسیت رتی دو برابر سلولهای مزانشیمی بود بیشترین ماتریکس و mRNA نشانگر غضروف موشی تولید شد. این مطلب نشان دهنده این است که در تعامل سلول مزانشیمی با کندروسیت، تعداد سلول هم کشتی مهم است به نظر می‌رسد این تعامل تنها زمانی که یک سلول مزانشیمی با دو سلول کندروسیت در ارتباط است حداکثر تمایز به غضروف را در سلول مزانشیمی ایجاد می‌کند.

با توجه به اینکه در نسبتهای ۱ به ۱ و ۲ به ۱ ماتریکس متاکروماتیک زیادی ترشح نشد می‌توان چنین استنتاج کرد که ضمن اینکه سلولهای مزانشیمی به‌طور کامل در این نسبتها به غضروف تمایز نیافته‌اند بلکه سلولهای کندروسیت نیز تا حدودی دچار تمایز زدایی شده‌اند و حتی هم کشتی با سلول مزانشیمی نیز توانسته از تمایز زدایی آنها جلوگیری نماید. البته ما بیان ژنهای ویژه غضروف را در کندروسیتهای رتی که

References

1. **Kohei T, Gouping C, Ushida T, Matsuno T, Tateishi T.** The effect of co culture of chondrocytes with mesenchymal stem cells on their cartilaginous phenotype in vitro. *Materials science and Engineering* 2004, 24, 391-96
2. **Williams CG, Kim TK, Taboas A, Malik A, Manson P, Elisseeff J.** In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a photo polymerizing Tissue. *Eng.* 2003Aug; 9(4): 679-88
3. **Freed, L. and Vunjak-Novakovic G.** Tissue engineering of cartilage. *The Biomedical Engineering Handbook* .CRCpress 1995, pp.1778-96
4. **Yang WD, Chen SJ, Mao.TQ, Chen FL, lei DL, ET AL.** A study of injectable tissue-engineering autologous cartilage. *Chin. J. Dent. Res* 3,10, 2000
5. **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 Oct 6; 331(14): 889-95.
6. **Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A, Owen M.** Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop Relat Res.* 1980 (151): 294-307.
7. **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): 889-95.
8. **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.
9. **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
10. **Salaszyk RM, Williams WA, Boskey A, Batorsky A, plopper GE.** Adhesion to vitronectin and collagene I promote osteogenic differentiation of human Mesenchymal stem cells. *J Biomed Biotech*, 1: 24-34
11. **Friedenstein AJ, Deriglasora UF, Kulagina NN.** Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as deteted by the in vitro colony assay methods. *Exp Hematol* 1974; 2: 83-92.
12. **Heng BC, Cao T, Lee EH.** Directing stem cell differentiation into the chondrogenic lineage in vitro. *Stem Cells*, 2004: 22: 1152-67.
13. **Manning WK, Bonner WMJR.** Isolation and culture of chondrocytes from human adult articular cartilage. *Arthritis Rheum* 1967; 10:

- 235-9.
14. **Johnstone B.** Mesenchymal stem cells and chondrogenesis. *Europ Cell Mat* 2002; 11: 502-9
 15. **Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF.** Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 1998; 4:415-428
 16. **Carlberg AL, Pucci B, Rallapalli R, Tuan RS, Hall DJ.** Efficient chondrogenesis of mesenchymal cells in micromass culture by retroviral gene transfer of BMP-2. *Differentiation* 2001; 67:128-38
 17. **Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, Ishiguro T, Okumura M, Iwanaga T, et al.** Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells in pellet culture system. *Exp Hematol* 2004; 32: 502-9
 18. **Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, Takagi S, Okumura M, Fujinaga T.** Gene expression profile of bovine bone marrow mesenchymal stem cell during spontaneous chondrogenic differentiation in pellet culture system. *JPN J Vet Res* 2006; 53: 127-39.
 19. **Indrawattana N, Chen G, Tadokoro M, Shann LH, Ohgushi H, Tateishi T.** Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320: 914-9
 20. **Van Lent PL, Blom AB.** Van der Kraan. Crucial role of the synovial lining macrophage in the promotion of transforming growth factor beta-mediated osteophyte formation. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 103-11.
 21. **Wong M, Tuan RS.** Interactive cellular modulation of chondrogenic differentiation in vitro by subpopulation of chick embryonic calvarial cells. *Dev Biol* 1995; 167:130-137.
 22. **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.
۲۳. باغبان اسلامی نژاد، م. نیک محضر، آ. ندری. ص، تقی یار ل. جداسازی و تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان موش. *NMRI*. مجله پزشکی کوثر ۱۳۸۵، دوره ۱۱، (شماره ۱): ۳۹-۲۹.
24. **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
 25. **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 15; 268(2): 189-200.