

بررسی میزان بیان ژن‌های غضروفی در کشت تک لایه و سه بعدی

کندروسیت‌های مفصلی موش صحرایی با روش Real time PCR

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

* گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، پژوهشکده رویان، تهران، ایران

تاریخ وصول: تیرماه ۸۹، تاریخ پذیرش: شهریور ماه ۸۹

چکیده

هدف: مقایسه میزان بیان برخی ژن‌های اختصاصی و غیر اختصاصی بافت غضروفی در کشت سه بعدی (داخل آلژینیت) و تک لایه کندروسیت‌های مفصلی

مواد و روش‌ها: غضروف مفصلی از زانوی ده سر موش صحرایی نر جدا شد و در محلول آنزیمی متشکل از کلاژناز تیپ I ۰/۲ درصد و پروناز ۰/۱ درصد قرار داده شد. کندروسیت‌های رها شده، در فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متری کشت و با انجام چندین پاساژ تکثیر شد. سپس ۱۰۶×۵ سلول پاساژ ۵، با یک میلی‌لیتر ژل آلژینیت ۱/۵٪ مخلوط شد و سوسپانسیون سلولی حاصل به صورت دانه‌های ریز، به مدت ۲ ماه کشت شد. در زمان‌های مختلف کشت، میزان بیان ژن‌های Sox 9، کلاژن I، II و آگریکان با روش Real time PCR اندازه‌گیری شد و با کشت کندروسیت‌ها در سطح ظروف پلاستیکی مقایسه شد. همچنین مورفولوژی سلول‌ها در دو حالت کشت با میکروسکوپ نوری معمولی یا معکوس مشاهده شد.

یافته‌ها: سلول‌ها در کشت تک لایه با مورفولوژی دوکی شکل مشاهده شدند، در حالی‌که در کشت سه بعدی مورفولوژی گرد و کروی داشتند. بررسی‌های مولکولی نشان داد که در کشت دو بعدی (تک لایه) بیان ژن رونویسی Sox9 و همچنین ژن‌های کلاژن I و آگریکان کاهش و بیان کلاژن I افزایش یافته است. در حالی‌که در کشت آلژینیت، ژن Sox9 به مقدار زیادی بیان شد که با افزایش در بیان ژن کلاژن I و آگریکان همراه بود. از طرفی بیان کلاژن I کاهش چشمگیری داشت. تفاوت بیان ژنی در دو حالت کشت، از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: تحت شرایط کشت دو بعدی، بیان ژن‌های اختصاصی غضروفی در کندروسیت‌های کشت یافته، به‌طور چشمگیری کاهش می‌یابد. با کشت مجدد سلول‌ها در داخل آلژینیت سطح بیان ژن‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد.

کلیدواژه‌ها: کندروسیت، آلژینیت، ژن رونویسی Sox9، آگریکان، کلاژن I و II

مقدمه

غضروف، چنین عارضه‌ای صعب‌العلاج است و به همین دلیل محققین همواره درصددند تا روش درمانی مناسبی برای آن بیابند. فناوری‌های مهندسی بافت امیدهای زیادی را برای بازسازی

یکی از اختلالات شایع در افراد سالمند، تحلیل رفتگی بافت غضروفی به دنبال افزایش سن یا تروما است که نتیجه آن بیماری استئوآرتریت است [۱]. به دلیل محدودیت پتانسیل ترمیم در

✍ آدرس مکاتبه: تهران، بزرگراه رسالت، خیابان بنی هاشم، میدان بنی هاشم، کوچه حافظ

شرقی، پژوهشکده رویان، کد پستی ۱۶۶۵۶۹۹۱۱

Email: eslami@royaninstitute.org

فیروبلاست در می‌آیند یا اینکه با کشت مجدد در داخل داربست سه بعدی خصوصیات تمایز یافتگی را دوباره کسب می‌کنند، در مطالعات پیشین بررسی شده است [۴-۹]. از آنجایی که فنوتیپ سلول وابسته به ژنوتیپ آن است، می‌توان به راحتی تصور کرد که این تغییرات فنوتیپی در دو حالت کشت دو بعدی و سه بعدی کندروسیت‌ها در اثر تغییرات ژنوتیپی آن‌ها اتفاق می‌افتد. به عبارتی دیگر؛ تحت شرایط کشت دو بعدی ژن‌های تمایز یافتگی خاموش می‌شود یا در حد بسیار پایینی بیان می‌شود و همین ژن‌ها در کشت سه بعدی افزایش بیان پیدا می‌کند. مطالعات در ارتباط با مقایسه الگوی بیان ژنی کندروسیت‌های مفصلی در کشت دو بعدی و سه بعدی محدود است [۱۸-۱۵]. مطالعه حاضر به این موضوع می‌پردازد.

هدف مطالعه حاضر بررسی کمی بیان برخی ژن‌های مربوط به بافت‌های اسکلتی شامل Sox 9، کلاژن II، کلاژن I و آگریکان در کشت دو بعدی و سه بعدی کندروسیت‌های مفصلی موش صحرایی است. برخلاف مطالعات گذشته، در تحقیق حاضر بررسی بیان ژنی در کشت طولانی مدت دو ماهه انجام شده است و برای این منظور ژن‌های اختصاصی غضروف مورد توجه قرار گرفته است. برای تعیین میزان دقیق بیان ژنی از روش Real time PCR استفاده شد.

مواد و روش‌ها

کشت تک لایه کندروسیت‌های مفصلی رت

استفاده از موش صحرایی در مطالعه تجربی حاضر، توسط کمیته اخلاق پژوهشگاه رویان به تصویب رسید. ۸ سر موش Wistar به سن تقریبی ۶-۴ هفته و وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم به روش خفگی با CO₂ قربانی شدند. زانو به کمک الکل ۷۰ درصد ضد عفونی شده، موهای ناحیه مفصل باتیغ تراشیده شد و با کمک تیغ مفصل زانو باز شد. لایه غضروف موجود روی دو انتهای استخوان ران و

ضایعات وسیع غضروف به وجود آورده است [۲-۳]. استراتژی سلول درمانی یکی از روش‌های امید بخش به منظور ترمیم ضایعات بافت غضروفی است. برای انجام سلول درمانی از منابع سلولی متفاوتی استفاده می‌شود که از آن جمله می‌توان به کندروسیت‌های غضروف مفصلی اشاره کرد. ولی استفاده از کندروسیت‌ها محدودیت‌هایی دارد که می‌توان به کمی تعداد آن‌ها در نمونه‌های بافتی و تمایز زدایی‌شان در کشت دو بعدی (کشت در ظروف کشت) اشاره کرد [۴]. کندروسیت‌ها در کشت تک لایه در کمتر از یک هفته مورفولوژی خود را از دست می‌دهند [۵] و خصوصیات بیوشیمیایی آن‌ها تغییر می‌یابد. همچنین در کشت دو بعدی عملکرد سلول‌ها یعنی ترشح ماتریکس اختصاصی بافت غضروف هیالین متوقف می‌شود [۶].

آلژینت به عنوان یک داربست مهم زیست تخریب پذیر، مایع بوده و در حضور یون‌های کلسیم به ژل تبدیل می‌شود. چنانچه سلولی در داخل آلژینت کشت شود، ژل آلژینت قادر است سلول‌ها را احاطه (encapsulate) کرده، ماتریکس ترشح شده توسط آن‌ها را نگهداری نماید [۷-۹]. مزیت دیگر آلژینت، این است که ژل حاصل را می‌توان به اشکال مورد نظر درآورد. از این ویژگی می‌توان برای ایجاد سازه‌های غضروفی متناسب با شکل محل ضایعه بهره گرفت [۱۱-۱۰]. تا به حال در چندین تحقیق، تاثیرات مثبت ژل آلژینت بر کشت کندروسیت‌ها به اثبات رسیده است. از جمله پیازه (Paige) و همکاران گزارش کرده‌اند که سلول‌های کندروسیت جدا شده از غضروف مفصلی خرگوش در زمان کشت در داخل ژل آلژینت، خصوصیات ترشحي خود را حفظ کرده و دچار تمایززدایی نمی‌شوند [۱۲]. همچنین لمار (Lemar) و همکاران و هازلمن (Hauselmann) و همکاران نیز نتایج مشابهی را گزارش کردند [۱۴-۱۳].

اینکه کندروسیت‌ها در زمان کشت روی پلاستیک مورفولوژی تمایز یافتگی خود را از دست می‌دهند و به شکل

حضور یون‌های کلسیم به ژل تبدیل شد. سپس محلول کلرید کلسیم خارج و دانه‌ها یک‌بار با محلول PBS⁺ شسته شد. این دانه‌های حاوی کندروسیت به مدت ۶۰ روز در محیط DMEM حاوی ۱۵ درصد سرم گاوی در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO₂ درصد انکوبه شد و طی روزهای ۲۰، ۴۰ و ۶۰ بررسی‌های مورد نظر روی آن‌ها انجام شد.

میکروسکوپ نوری

برای مشاهده مورفولوژی کندروسیت‌ها در داخل آلژینیت، قطرات آلژینیتی حاوی سلول با فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شد و پس از آگیری با الکل و شفاف‌سازی با گزلیل در قالب‌های پارافینی قالب‌گیری شد. سپس برش‌های ۵ میکرومتری تهیه و با تولوئیدن بلو رنگ‌آمیزی شد.

خارج کردن کندروسیت‌ها از ژل آلژینیت برای

بررسی‌های مولکولی

برای انجام بررسی‌های مولکولی، کندروسیت‌ها به روش زیر از ژل خارج شدند. ابتدا دانه‌های آلژینیت دوبار با محلول شستشوی بافر فسفات (PBS: Phosphate buffer solution) شستشو شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در محلول سیترات سدیم در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا ژل حل شود. آنگاه سلول‌ها به کمک سانتریفوژ با دور ۱۳۰۰g ته‌نشین و برای بررسی‌های مولکولی استفاده شد.

بررسی‌های مولکولی Real time PCR

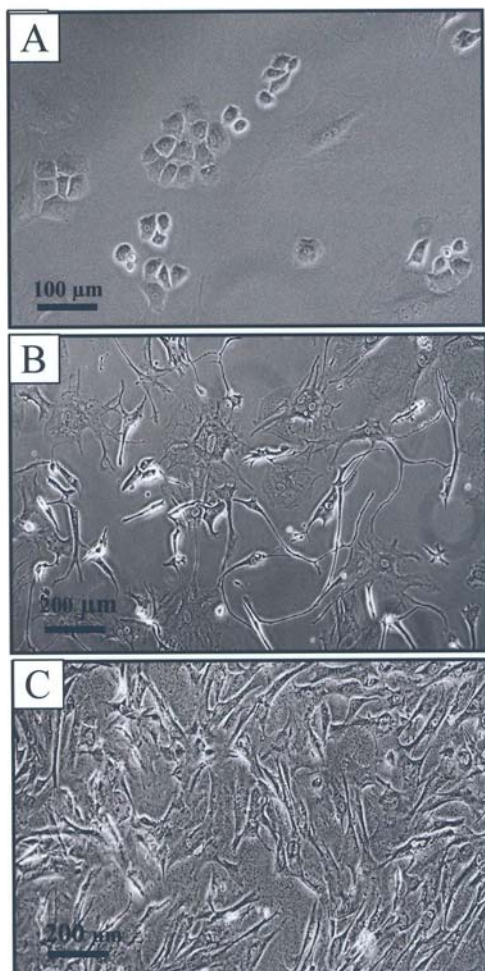
ابتدا کل RNA ی موجود در کندروسیت‌ها در کشت سه بعدی و دو بعدی در روزهای ۲۰، ۴۰ و ۶۰، با استفاده از کیت Cinnagen (RNX-plus) (Iran, روش Nxtm-Plus) استخراج شد. غلظت RNA با استفاده از اسپکتوفوتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر سنجیده شد. قبل از RT reaction، توده RNA با استفاده از آنزیم DNAase، DNA زدایی شد.

ساق در محل اتصال به یکدیگر جدا شد و در محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified eagles medium (Fetal Bovine Serum ۱۵ درصد Gibco; Germany) FBS ۱ (Serum; Gibco, Germany) ۱۰۰ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر پنی سلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استروپتومایسین (Gibco; Germany) قرار گرفت و به زیر هود استریل منتقل شد. تکه‌های ۲-۳ میلی‌متری بافت غضروف دوبار با محلول PBS⁺ شسته شد و سپس یک میلی‌لیتر محلول ۲٪ در صد کلاژناز تیپ I و ۰/۱ درصد پروناز (حل شده در محیط بدون سرم، sigma) به آن اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. کندروسیت‌های رها شده از غضروف به کمک فیلتر مش ۷۰ میکرومتری جدا شده و با تراکم ۱۰^۵ سلول در میلی‌لیتر در ظروف کشت ۷۵ سانتی‌متری کشت شد و ۱۵ میلی‌لیتر محیط DMEM به آن اضافه شد. کندروسیت‌ها پس از ۲۴ ساعت به کف ظرف چسبیده و شروع به تکثیر نمودند. کندروسیت‌ها در زمانی که حدود ۷۰ تا ۸۰ درصد ظرف کشت را پر کردند به کمک ۰/۲ trypsin-EDTA درصد (Gibco; Germany) از کف ظرف جدا شدند (پاساژ یک) و به ظرف جدید انتقال یافتند. با انجام چندین پاساژ تعداد سلول‌ها افزایش یافت.

کشت سه بعدی کندروسیت‌ها در ژل آلژینیت

کندروسیت‌های حاصل از پاساژ ۵ با تراکم ۵×۱۰^۶ سلول در ۱ میلی‌لیتر محلول آلژینیت (Sigma, Germany) ۱/۵ درصد شناور کرده و سپس به کمک سرنگ و سر سوزن شماره ۲۲ در دیش‌های باکتریال ۶ سانتی‌متری در محلول ۱۰^۹ میلی‌مولار کلرید کلسیم قطره‌گذاری شد. دانه‌ها (beads) یا قطرات ژل حاوی سلول به مدت ۲۰ دقیقه در این محلول نگهداری شد تا محلول آلژینیت در

مورفولوژی کندروسیت‌ها از فرم گرد به سلول‌های کشیده و دوکی شکل تغییر کرد (شکل B,C).



شکل ۱. تصاویر میکروسکوپ معکوس از کشت کندروسیت‌های غضروف مفصل زانوی موش صحرائی. (A) کشت اولیه: کندروسیت‌ها به صورت تجمعات چند سلولی با مورفولوژی گرد و چند وجهی دیده می‌شوند. (B) پاساژ اول کندروسیت‌ها: مورفولوژی‌های متنوعی در کشت دیده می‌شود. (C) پاساژ ۵: کندروسیت‌ها مورفولوژی فیبروبلاستی دارند.

کشت سه بعدی کندروسیت‌ها در آلژینت

کندروسیت‌ها پس از انتقال به ژل آلژینت دوباره مورفولوژی گرد به خود گرفتند و در حفرات لاکونا مانند مستقر شدند. (شکل B۲-A).

واکنش RT برای ۲ میلی گرم RNA با استفاده از پرایمر راندوم هگزامر و کیت RevertAidTM (Fermentas life science, Lithuania) برای سنتز cDNA ی تک رشته‌ای انجام شد. برای هر نمونه یک واکنش RT- ساخته شد. استفاده از SYBR Green PCR Master Mix و واکنش Real-time PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر تهیه شد. برای به دست آوردن Efficiency واکنش با پرایمرهای اختصاصی ژن‌های کلاژن I,II,III و Sox9 و اگر یکان به کار برده شد. برای تمام ژن‌های serial dilution در ۶ غلظت با ضریب رقت ۵/۱ انجام شد. Ct‌های به دست آمده از دستگاه Applied Biosystem با استفاده از متود $\Delta\Delta CT$ و با فرض $efficiency = 1.00$ آنالیز شد. داده‌های حاصل با استفاده از SPSS و تست LSD و tukey بررسی شد و نمودار داده‌های مربوط به بیان ژن که به صورت میانگین \pm انحراف معیار محاسبه شده بود، در Excel رسم شد.

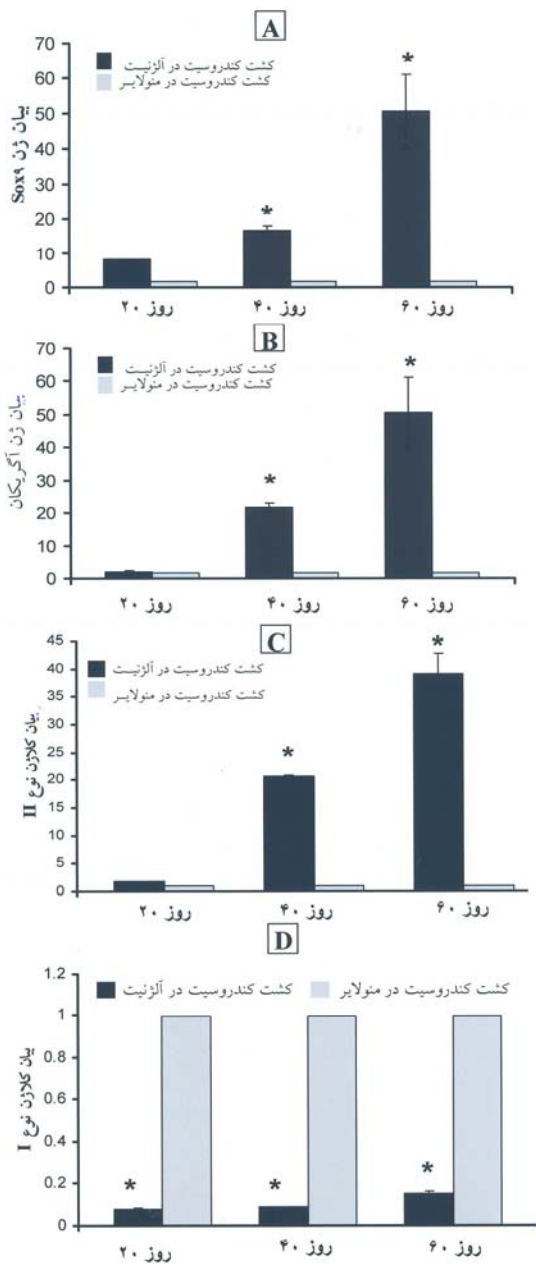
جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در Real time PCR

Gene name	Sequence	Annealing Temperature
Collagen II	F: 5' ACTTTGACCCGAGCCCAGCGG3' R: 5' CAATGTCAACAATGGGAAGG 3'	60
Aggrecan	F: 5' GCCGAGGGCAACAGCAGGTT 3' R: 5' CCTTCCCATTGTTGACATTG 3'	60
Collagen I	F: 5' ACTGGAGAGGTGGGCACCC 3' R: 5'GTCTTGGAGGAAACTT TGCT 3'	60
SOX9	F: 5' GACGTGGACATCGGTGAGCTG 3' R: 5' CTCCAGCGACCCGCGGGCCACG 3'	60
GAPDH	F: 5' TGAAGATTGTCAGCAATGCC 3' R: 5' AACATCATCTGCTTCTACTG 3'	60

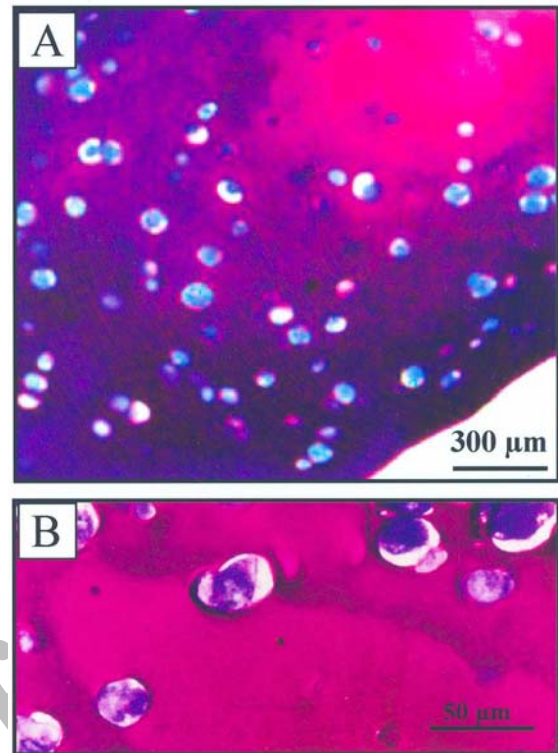
یافته‌ها

کشت تک لایه کندروسیت‌ها

کندروسیت‌ها در کشت اولیه مورفولوژی گرد و چند ضلعی داشتند (شکل A۱). به مرور طی پاساژهای بعدی



شکل ۳. بیان ژن‌ها در کشت تک لایه و آلژینیت کندروسیت‌ها. (A) بیان ژن Sox9: این ژن در نمونه کنترل (تمایزدایی پاساژ ۷) در حد بسیار پایینی بیان شد و در کشت سه بعدی در روزهای ۲۰، ۴۰ و ۶۰ مقدار بیان آن به ترتیب افزایش یافت. (B) بیان ژن آگریکان: این ژن در کشت تک لایه بیان بسیار کمی داشت در حالی که در کشت آلژینیت در روز ۲۰ بیان ژن پایین بود و از این نظر با کشت تک لایه تفاوتی نداشت ولی با ادامه کشت بیان ژن در مقایسه با کشت تک لایه افزایش یافت و تفاوت‌ها در روزهای ۴۰ و ۶۰ معنی‌دار شد ($p < 0.05$). (C) بیان ژن کلاژن II الگوی بیان این ژن در دو کشت تک لایه و آلژینیت مشابه (شکل B-C). برخلاف سه ژن قبلی، ژن کلاژن I بیشترین بیان را در کشت تک لایه داشت و در کشت آلژینیت بیان آن بسیار کم بود. تفاوت‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($p < 0.05$).



شکل ۲. تصاویر میکروسکوپ معمولی از مقاطع تهیه شده از کشت آلژینیت کندروسیت‌های غضروف مفصل زانوی موش صحرائی، رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو. (A) کندروسیت‌ها در داخل آلژینیت در حفرات لاکونا مانند مستقر شده‌اند (انتهای دوره کشت ۶۰ روزه). (B) کندروسیت‌ها در داخل حفرات لاکونا مانند با درشت‌نمایی بیشتر مشاهده می‌شوند.

Real time PCR

بر اساس آنالیز Real time PCR، کندروسیت‌ها در تمام طول کشت تک لایه، برخلاف کشت آلژینیت، ژن Sox9 را به مقدار بسیار کم بیان کردند (شکل A۳). بیان این ژن در طول دوره کشت ۶۰ روزه در داخل آلژینیت به تدریج افزایش یافت و از این نظر تفاوت آن با کشت تک لایه در روزهای ۴۰ و ۶۰ از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($p < 0.05$). الگوی بیان ژن‌های آگریکان و کلاژن II در دو کشت تک لایه و آلژینیت مشابه ژن Sox9 بود (شکل B-C). برخلاف سه ژن قبلی، ژن کلاژن I بیشترین بیان را در کشت تک لایه داشت و در کشت آلژینیت بیان آن بسیار کم بود (شکل D۳). تفاوت‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($p < 0.05$).

بمٹ

در تحقیق حاضر میزان بیان ژن‌های اختصاصی کندروسیت‌های بالغ مفصلی، شامل ژن کلاژن II، I، آگریکان و Sox9 در دو کشت طولانی مدت (۶۰ روزه) دو بعدی و سه بعدی با روش real time PCR مورد بررسی قرار گرفت تا تغییرات بیان آنها در دو حالت کشت مشخص گردد. با تعیین بیان ژنی در دو حالت کشت دو بعدی و سه بعدی می‌توان تغییرات مورفولوژیک سلول‌ها در دو حالت کشت را با بیان ژن‌های اختصاصی غضروفی ارتباط داد. کندروسیت‌های مفصلی به‌عنوان کاندید مناسب برای مقاصد سلول درمانی ضایعات وسیع بافتی در غضروف‌های مفصلی محسوب می‌شوند. در استراتژی‌های سلول درمانی به تعداد زیادی سلول برای پیوند نیاز است. این در حالی است که نمونه‌های بافتی غضروف حاوی تعداد کمی سلول کندروسیت است و به همین دلیل تکثیر سلول در محیط کشت غیر قابل اجتناب است. در شرایط تکثیر سلول‌ها، مورفولوژی تمایز یافتگی خود را از دست می‌دهند و دچار تمایز زدایی می‌شوند. کشت مجدد سلول در داخل داربست مناسب مورفولوژی تمایز یافتگی آنها را برمی‌گرداند. در تحقیق حاضر برای درک بهتر این تغییرات مورفولوژیک، الگوی بیان ژنی سلول‌ها بررسی شد.

در تحقیق حاضر ماهیت کندروسیتی سلول‌ها در کشت اولیه با روش‌های مولکولی بررسی نشد ولی به دلایلی سلول‌های جدا شده از قطعات غضروف مفصلی در مطالعه حاضر ماهیت کندروسیتی داشتند: ۱- بافت غضروف مفصلی تنها حاوی یک نوع سلول (یعنی کندروسیت) است بنابراین حضور سایر سلول‌ها در کشت موضوعیت ندارد. معمولاً اثبات ماهیت سلولی در کشت‌هایی انجام می‌شود که بافت مورد استفاده چندین نوع سلول را در خود جای داده باشد مثلاً استخراج سلول بنیادی مزانشیمی از بافت مغز استخوان که حاوی سلول‌های متنوع از جمله سلول خونساز، ماکروفاژ، اندوتلیال و غیره است. ۲- مورفولوژی تپیک سلول‌ها در

کشت اولیه (شکل A۱) نشان دهنده کندروسیت بودن سلول‌هاست (فیروبلاست‌ها دوکی و کشیده است). این مورفولوژی با مطالعات پیشین مطابقت دارد. ۳- اگرچه در کشت اولیه بیان شاخص‌های غضروفی انجام نشد ولی بررسی‌های حاضر نشان داد که این سلول‌ها در کشت آلژنیت، تمام ژن‌های اختصاصی غضروف شامل آگریکان و کلاژن II و Sox9 را بیان می‌کنند.

در ارتباط با بیان ژنی کندروسیت‌ها، در دو حالت کشت دو بعدی و سه بعدی تا به حال مطالعات متفاوتی انجام شده است و ژن‌های متفاوتی بررسی شده است. Tallheden و همکاران در سال ۲۰۰۴ با کشت pellet کندروسیت‌های مفصلی انسان که به صورت تک لایه تکثیر شده بودند به مطالعه بیان ژنی آنها پرداختند. طول کشت آنها ۱۴ روز بود. نتایج نشان داد که در روز هفتم کشت، پروتئین‌هایی نظیر کلاژن XI و C، Tenascin، dermatopontin، فیرونکتین بیان می‌شود و در روزهای آخر ژن Sox9 افزایش بیان پیدا می‌کند [۱۵]. در مطالعه‌ای Haudenschild و همکاران کندروسیت‌های مفصلی انسان را به صورت تک لایه کشت دادند و سپس سلول‌ها را به کشت سوسپانسیون منتقل کردند و با تراکم ۱۰^۴ و ۱۰^۶ سلول در میلی‌لیتر کشت دادند و بیان برخی ژن‌ها را پس از انتقال به کشت سوسپانسیون مطالعه کردند. این محققین بیان متفاوتی از ژن‌ها را مشاهده کردند. در کشت با تراکم زیاد ژن‌های IL-6، Mn superoxide dismutase افزایش بیان داشت؛ در حالی که در کشت با تراکم کم، ژن‌های کندروسیت بالغ نظیر کلاژن II و آگریکان افزایش بیان داشت [۱۶]. در مطالعه‌ای دیگر استوکز (Stokes) و همکاران کندروسیت‌ها را از غضروف اپی‌فیزیال جنین انسان جدا کردند و روی دیش‌های coat شده با poly-(2-hydroxyethyl methacrylate) به صورت تمایز یافته و روی دیش‌های پلاستیکی به صورت تمایز نیافته به مدت ۱۱ روز کشت دادند و با Microarray حدود ۵۰۰۰ ژن انسانی

II و آگریکان نیز کاهش یافته و بیان ژن‌های فیبروبلاستی یعنی کلاژن I در آنها افزایش یافته است. کشت سلول‌ها به فرم سه بعدی در آلزینت در واقع تقلیدی از شرایط رشد سلول‌های مزانشیمی در شروع کندروژنز در دوره جنینی و ایجاد یک محیط مناسب برای برقراری الگوی سیگنالینگ سلولی است که در بدن فراهم می‌شود [۲۱ و ۲۲]. با کشت کندروسیت‌های تمایززدایی شده در آلزینت، این سلول‌ها مورفولوژی از دست رفته خود را دوباره به دست آوردند. این تغییرات با افزایش بیان Sox9، کلاژن II و آگریکان همراه بود.

هدف اصلی تحقیق حاضر بررسی و مقایسه بیان ژنی کندروسیت‌ها در دو حالت کشت دو بعدی روی سطح پلاستیک و سه بعدی در داخل آلزینت بود. موضوع دیگر تأثیر این دو روش کشت بر میزان مرگ و آپوپتوزیس کندروسیت‌هاست. این نکته در مطالعه حاضر بررسی نشد. توجه به این مسئله از این نظر که در کشت آلزینت (سه بعدی) سلول‌ها از اطراف در معرض سیگنال‌های ماتریکسی هستند و می‌توانند survival آن‌ها را بیشتر کنند و از طرف دیگر؛ سلول‌های عمقی در توده آلزینتی ممکن است به دلیل عدم کفایت انتشار نوترینت‌ها به سمت مرگ پیش روند، جالب توجه است و نیاز به بررسی بیشتر دارد.

روی هم رفته می‌توان گفت که ماتریکسی که کندروسیت در مجاورت آن کشت می‌شود، تعیین کننده ژنوتیپ و متعاقب آن فنوتیپ سلول است. با کشت کندروسیت بر سطح پلاستیک بیان ژن‌های اختصاصی غضروفی کاهش می‌یابد و سلول مورفولوژی فیبروبلاست را کسب می‌کند. با کشت کندروسیت در داخل آلزینت ژن‌های اختصاصی غضروف افزایش بیان پیدا می‌کند و مورفولوژی تیپیک کندروسیت کسب می‌شود.

را در دو حالت کشت بررسی کردند [۱۷]. بر اساس نتایج آن‌ها دو ژن transcription factor شامل TWIST و HIF-1alpha و یک ژن cellular adhesion به نام cadherin 11 در دو کشت تغییرات وسیعی نشان دادند. مطالعه حاضر دو تفاوت اساسی با تحقیقات مذکور داشت. اول اینکه کشت در بررسی حاضر طولانی مدت بود (۶۰ روزه) و دوم اینکه در بررسی حاضر ژن‌های اختصاصی کندروسیت‌های بالغ مطالعه شد. کشت طولانی مدت این حسن را دارد که می‌توان تداوم بیان ژن را در شرایط مورد مطالعه بررسی کرد. بر اساس نتایج تحقیق حاضر، این اطمینان حاصل شد که ژن‌های اختصاصی غضروف حداقل تا روز ۶۰ کشت، تداوم بیان دارند.

یکی از ژن‌های مورد مطالعه در تحقیق حاضر ژن Sox9 بود. مطالعات نشان داده است که طی کندروژنیز، همزمان با بیان ژن کلاژن II، ژن Sox9 نیز بیان می‌شود. در واقع ژن کد کننده کلاژن II هدف پروتئین Sox9 است [۱۹ و ۲۰]. مطالعه *in vitro* حاضر نیز نشان داد که در کشت سه بعدی بر خلاف کشت دو بعدی افزایش بیان ژن کلاژن II با افزایش بیان ژن Sox9 همزمان است. این یافته منطبق بر یافته‌های مطالعات *in vivo* پیشین است.

با توجه به یافته‌های تحقیق حاضر، تغییرات مورفولوژیک کندروسیت‌های مفصلی در دو حالت کشت قابل تفسیر است. کندروسیت‌ها در کشت تک لایه در کشت اولیه مورفولوژی کندروسیت‌های بالغ را داشتند یعنی گرد و چندضلعی بوده و به صورت اجتماعات کوچک چند سلولی رشد کردند. با انجام پاساژهای بعدی این سلول‌ها به مرور دچار تغییر شده و از فرم گرد به سلول‌های کشیده با مورفولوژی دوکی تبدیل شدند. در این مرحله بررسی‌های مولکولی نشان داد که بیان ژن رونویسی Sox9 کاهش یافته که همزمان بیان ژن‌های کلاژن

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: 203-15.
4. **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: 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. P: 400-41.
6. **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: 571-80.
7. **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: 135-41.
8. **Atala A, Kim W, Paige KT, Vacanti CA, Retik AB.** Endoscopic treatment of vesicoureteral reflux with a chondrocyte-alginate suspension. *J Urol* 1994; 152:641-3.
9. **Chang SC, Rowley JA, Tobias G, Genes NG, Roy AK, Mooney DJ, et al.** Injection molding of chondrocyte/alginate constructs in the shape of facial implants. *J Biomed Mater Res* 2001; 55: 503-11.
10. **Chang PL.** Encapsulation for somatic gene therapy. *Ann NY Acad Sci* 1999; 875: 146-58.
11. **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: 774-81.
12. **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: 168-78.
13. **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: 303-13.
14. **Hauselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB, et al.** Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J Cell Sci* 1994; 107: 7-27.
15. **Tallheden T, Karlsson C, Brunner A, Van Der Lee J, Hagg R, Tommasini R, et al.** Gene expression during redifferentiation of human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2004 ;12: 525-35.
16. **Haudenschild DR, McPherson JM, Tubo R, Binette F.** Differential expression of multiple genes during articular chondrocyte redifferentiation. *Anat Rec* 2001; 263: 91-8.
17. **Stokes DG, Liu G, Coimbra IB, Piera-Velazquez S, Crowl RM, Jiménez SA.** Assessment of the gene expression profile of differentiated and dedifferentiated human fetal chondrocytes by microarray analysis. *Arthritis Rheum* 2002 ;46: 404-19.
18. **Eslaminejad MB, Taghiyar L, Falahi F.** costal versus articular chondrocytes in alginate three-dimensional cultures. *Iranian J Biotech* 2009; 3: 129-36.
19. **Bell DM, Leung KK, Wheatley SC, Ng LJ, Zhou S, Ling KW, et al.** SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat Genet* 1997;16: 174-8.

20. **Lefebvre V, Li P, de Crombrughe B.** A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J* 1998;17: 5718-33.
21. **Crowe R, Zikherman J, Niswander L.** Delta-1 negatively regulates the transition from prehypertrophic to hypertrophic chondrocytes during cartilage formation. *Development* 1999 126:987-998.
22. **Kojima M, Itoh S, Ikeda M, Satake H, Koyama S, Aoyama T, et al.** Usefulness of a method for changing tube current during helical scanning in multislice CT. *Radiat Med* 2003; 21: 193-204.

Archive of SID