مقاله تحقیقی

طراحی بافت غضروف انسانی از تمایز سلولهای بنیادی مشتق از بافت چربی تحت تاثیر BMP-6 بر داربست آلژینات

بتول هاشمی بنی .Ph.D*، شهناز رضوی .Ph.D*✍، ابراهیم اسفندیاری .Ph.D*، سعید کرباسی.Ph.D * *، محمد مردانی .Ph.D*، فاطمه نادعلی.Ph.D *، فرزانه صادقی .M.Sc*، فرشته حقیقت .M.D* * *، . شقایق حق‌جو .Ph.D *****، وحید گوهریان .M.D* * * * ***

*گروه علوم تشریحی دانشکده پزشکی اصفهان، ایران
** گروه فیزیک و مهندسی پزشکی دانشکده پزشکی اصفهان، ایران
***گروه آسیب شناسی دانشکده پزشکی اصفهان، ایران
****گروه زنان و زایمان بیمارستان شهید بهشتی اصفهان، ایران
***** گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی اصفهان، ایران
******گروه جراحی دانشکده پزشکی شهرکرد، ایران

تاریخ وصول: اسفند ماه ۸۸، تاریخ پذیرش: شهریور ماه ۸۹

چکیده

هدف: بررسی تأثیر فاکتور رشد BMP-6 در روند کندروژنز سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در داربست آلژینات

مواد و روش‌ها: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی زیر جلدی برای القای کندروژنز در گروه آزمایشی در محیط کشت کندروژنیک تحت تأثیرفاکتور رشدBMP-6 و بر داربست آلژینات، به مدت سه هفته کشت داده شد. در گروه کنترل محیط کشت فاقد BMP-6 به‌کار برده شد. نمونه‌های حاصل با روش‌های ایمونوهیستوشیمی و RT-PCR از نظر ویژگی‌های غضروف بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج بررسی‌ها با روش ایمونوهیستوشیمی، وجود ترکیبات اختصاصی بافت غضروفی مانند کلاژن نوع II و آگریکان در ماتریکس ترشح شده در داربست آلژینات تحت تأثیرفاکتور رشدBMP-6 را مشخص کرد. به‌علاوه با بررسی نتایجRT-PCR بیان ژن‌های کلاژن نوع II و آگریکان در سلول‌های تمایز یافته تحت تأثیر فاکتور رشدBMP-6 تأیید شد.

نتیجه‌گیری: در تحقیق حاضر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی تحت تأثیر محیط کشت کندروژنیک حاوی فاکتور رشد BMP-6 در داربست آلژینات به سلول‌های غضروفی تمایز یافتند و مشخص شد که می‌توان ازسلول‌های بنیادی مشتق از چربی برای طراحی بافت غضروفی در داربست آلژینات استفاده نمود.

کلیدواژه‌ها: سلول‌های بنیادی مشتق از چربی، آلژینات، BMP-6، مهندسی بافت، کندروژنز

✍ آدرس مکاتبه: اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی،صندوق پستی ۱۷۶-۸۱۷۴۴ Email: esfandiari@ med.mui.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

بافت غضروفی فاقد عروق خونی واعصاب است و تغذیه سلول‌های این بافت تنها از طریق انتشار مواد غذایی به درون بافت انجام می‌شود. از آنجا که ترمیم طبیعی هر بافت با تقسیمات سلولی آن بافت و رسیدن فاکتورهای هومورال و سلول‌های بنیادی یا اجدادی به محل آسیب انجام می‌شود و این امر به‌دلیل فقدان خونرسانی، در غضروف ممکن نیست؛ بنابراین غضروف توانایی محدودی در ترمیم آسیب‌ها و دارد [۱و۲].

مطالعات نشان داده است به‌کارگیری روش‌های معالجه آسیب‌های مفاصل از جمله درمان دارویی، دبریدمان بافت و لاواژ مفصل، آرتروسکوپی، جراحی ارتوپدی، آرتروپلاستی سایشی نه تنها به ترمیم بافت کمک نمی‌کند، بلکه ممکن است به تشکیل بافت فیبروز، آپوپتوز و تخریب بافت منجر شود [۳و٤].

طی دو دهه اخیر پیوند کندروسیت‌های اتولوگ برای درمان آسیب‌های مفاصل مورد توجه قرارگرفته است که برخلاف نتایج درخشان بالینی آن [٥]، به لحاظ محدودیت‌های کاربرد درمانی در حال حاضرفقط برای درمان استئوآرتریت روماتیک و استئوآرتریت دسیکان به‌کار می‌رود. به‌علاوه ترمیم ضایعات غضروفی با وسعت بیش از ۲ سانتی‌متر با استفاده از کشت و پیوند اتولوگ امکان‌پذیر نیست [٤]. در حالی‌که در استئوآرتریت‌های دژنراتیو که شایع‌ترین استئوآرتریت به‌ویژه در زانو و مفصل لگن در سنین متوسط به بالا را رقم می‌زند، با ضایعات غضروفی وسیعی روبرو هستیم که به مراتب ابعاد گسترده‌تری دارند. به‌علاوه تحقیقات در این زمینه نشان داده است که کندروسیت‌ها درکشت تک لایه‌ای، فنوتیپ تمایز یافته خود را از دست می‌دهند، مورفولوژی فیبروبلاستی کسب می‌کنند و تولید ترکیبات ویژه غضروف مانند آگریکان وکلاژن نوع II را متوقف کرده و کلاژن نوع I ترشح می‌نمایند [٥و٦]. همچنین با افزایش تعداد پاساژ سلولی ، **کندروسیت‌ها** مشی قهقرایی پیش گرفته و کیفیت **نمای ظاهری و عملکرد آنها کاهش می‌یابد** [۷]. بنابراین دستیابی به منابع سلولی دیگر برای طراحی بافت غضروفی و پیوند آن در درمان ضایعات این بافت ضروری است.

طی سال‌های اخیر با کشف سلول‌های بنیادی روش‌های نوین سلول درمانی و مهندسی بافت چشم انداز روشنی پیش روی درمان انواع آسیب‌ها و بیماری‌ها گشوده شده است. گرچه سلول‌های بنیادی رویانی، پتانسیل تمایز به انواع سلول‌های مشتق از سه لایه اکتودرم، اندودرم و مزودرم را دارند، اما احتمال بروز عارضه تراتوما در مدل‌های پیوندی و عدم سهولت در کسب مجوز برای تحیه اولیه این سلول‌ها از بلاستوسیست، به‌کارگیری سلول‌های بنیادی رویانی را برای ترمیم آسیب‌ها و معالجه بیماری‌ها محدود می‌کند [۸و ۹]. درحالی‌که سلول‌های بنیادی بالغ مانند سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان و به‌ویژه سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی زیرجلدی توانایی وسیعی برای تمایز به انواع سلول‌های استخوانی، غضروفی، چربی و عصبی در In vivo و In vitro دارند. کاربرد سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی زیرجلدی به‌دلیل دستیابی آسان‌تر و بدون آزار و اذیت بیمار، بسیار عملی‌تر و آسان‌تر از نمونه‌برداری از مغز استخوان است [۱۰و۱۱]. به‌علاوه سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی نیاز به نگهداری طولانی مدت در بانک‌های سلول همراه با صرف هزینه‌های بالا ندارد. لذا در تحقیق حاضر سلول‌های بنیادی از بافت چربی زیر جلدی ناحیه شکم جدا و کشت داده شد و برای القای کندروژنز مورد استفاده قرار گرفت. ذکر این نکته ضروری است که خوشبختانه، نه تنها پیوند اتوگرافت بلکه به‌دلیل نداشتن آنتی‌ژن HLA-DR، پیوند آلوگرافت سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی نیز، بدون خطر رد پیوند و انتقال بیماری‌های واگیردار، امکان پذیر است [۱۳].

Archive of SID
www.SID.ir

تحقیقات نشان داده است در طراحی بافت غضروف، داربست‌های سه‌بعدی می‌تواند تعامل بین سلولی مناسب برای القای کندروژنز را فراهم کند [۱۷-۱٤]. در این راستا داربست‌های متنوعی استفاده شده است که هر یک محاسن و معایبی دارد. پلیمرهای مصنوعی از زیست سازگاری مناسب برخوردار نیست و چسبندگی سلولی ایجاد نمی‌کند. به‌علاوه سطح آب گریز آن‌ها از رشد سلول‌ها در یک ساختار سه بعدی جلوگیری می‌کند و به علت کمبود گروه‌های فعال در دسترس، سطوح این پلیمرها به آسانی قادر به تغییر و اصلاح نیست و در شرایط ساده آزمایشگاهی تهیه آن‌ها به‌راحتی امکان پذیر نیست [۲۰-۱۸]. پلی‌ساکارید طبیعی آلژینات در شرایط آزمایشگاه بدون نیاز به وجود حلال‌های آلی به‌راحتی به حالت ژل در می‌آید و تهیه آن به‌عنوان داربست به تغییر Ph ، حرارت، و یا فعال کننده‌های سمی، نیازی ندارد و به‌علاوه در حالت ژل، دارای تخلخل بوده و انتشار ماکروملکول‌ها را تسهیل می‌نماید [۲۱و۲۲]. از آنجا که آلژینات به علت هیدروفیل بودن و داشتن مقادیر فراوان آب می‌تواند به‌عنوان ماده زمینه خارج سلولی بستری مناسب برای رشد سلول‌ها فراهم کند، بنابراین در تحقیق حاضر آلژینات به‌عنوان داربست انتخاب شد. لازم به ذکر است وجود فاکتورهای رشد مناسب برای القای غضروف‌سازی ضرورت دارد. در بین القا کننده‌های کندروژنیک، اعضای خانواده فاکتورهای رشد تغییر شکل‌دهنده- بتا (TGF-β) از اهمیت خاصی برخوردارند و بیش از فاکتورهای دیگر در این زمینه مورد بررسی و تحقیق قرار گرفته‌اند. زوک (Zuk) و همکارانش در سال ۲۰۰۱ در روند القای تمایز در سیستم کشت Pellet از فاکتور رشد TGF-β1 استفاده کردند [۱۲]. با وجود گزارش‌هایی مبنی بر تأثیر القاکنندگی برخی از اعضای خانواده TGF-ß در روند کندروژنز [۲۵-۲۳] گروهی از محققین این عوامل را برای القای غضروف‌سازی و به‌دست آوردن کندروسیت بالغ کافی نمی‌دانند [۲٦و۲۷].

برخی مطالعات نشان داده است BMP-6 با افزایش تولید گلوکوکورتیکوئیدها، استخوان‌سازی درون غضروفی را پیش می‌برد و نقش اساسی در تشکیل استخوان دارد [۲۸]. همچنین در گزارش دیگر نشان دادند که BMP-6 به تنهایی قادر به القای کندروژنز به‌طور کامل نیست [۲۹]. همچنین بررسی‌ها نشان داده است که طی تکامل رویان در مرحله پیش از هیپرتروفه شدن کندروسیت‌ها، BMP-6 بیان می‌شود. به‌علاوه BMP-6 میزان mRNA مربوط به کلاژن نوع X را در کشت تک‌لایه‌ای در کندروسیت‌های نابالغ افزایش می‌دهد [۳۰].

گرچه طی مطالعات مختلف در سیستم کشت Pellet یا داربست‌های متنوع، تأثیر فاکتورهای رشد در روند طراحی غضروف از سلول‌های بنیادی گزارش شده است، اما هنوز بهترین و مناسب‌ترین فاکتور شناسایی نشده است. از این رو در این مطالعه سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی بر داربست آلژینات تحت تأثیر فاکتور رشد BMP-6 برای طراحی بافت غضروفی به‌کار گرفته شد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه چربی زیر جلدی: بافت چربی زیر جلدی از ناحیه شکم و در جریان عمل جراحی سزارین در بیمارستان‌های الزهرا و شهید بهشتی و با اخذ اجازه کتبی از بیماران نمونه‌برداری شد و درداخل لوله آزمایش حاوی PBS به آزمایشگاه ارسال گردید.

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی از بافت چربی: بافت چربی ارسالی پس از توزین، تحت شرایط استریل همراه باحذف بافت همبند و عروق خونی به قطعات چند میلی‌متری تقسیم شد. برای تجزیه بافت، آنزیم کلاژناز نوع IA (Sigma) به میزان ۱/۵ میلی‌گرم به ازای هر گرم بافت چربی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ٦۰ دقیقه به‌کار گرفته شد. سپس سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱٤۰۰rpm سانتریفوژ شده و برای تجزیه گلبول‌های قرمز موجود در رسوب سلولی،

Archive of SID
www.SID.ir

محلول بافر لیزکننده دارای کلرید آمونیم (Merck) استفاده شد. سلول‌ها در محیط کشتDMEM دارای یک درصد پنی سیلین- استرپتومایسین و ده درصد FBS در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، CO_2 ۵ درصد و رطوبت نسبی کشت داده شد. با تعویض محیط کشت بعد از ۲٤ ساعت سلول‌های شناور در محیط حذف گردید.

تمایز کندروژنیک روی داربست آلژینات: برای القای تمایز کندروژنیک ۲×۱۰^{۵} سلول بر میلی‌لیتر سانتریفوژ شده و حدود ۰/٤ میلی‌لیتر محلول آلژینات به رسوب سلولی افزوده شد. سپس محلول آلژینات- سلول به صورت قطره قطره به محلول کلریدکلسیم ۱۰۵ میلی‌مولار اضافه شد. سپس شستشو با کلرید سدیم ۰/۹ درصد و محیط کشت DMEM – high glucose انجام گرفت . در مرحله بعدی، محیط کشت کندروژنیک حاوی DMEM و مواد زیر به حباب‌های آلژینات (Beads) حاوی سلول، اضافه گردید:

پنی سیلین- استرپتومایسین ۱درصد ، ترانسفرین – سلنیوس –انسولین ۱درصد ، دگزامتازون $۱۰^{۷}$ مولار، آلبومین سرم گاوی۱ درصد ، آسکوربات ۲- فسفات µg/ml ۵۰، لینولئیک اسیدµg/ml ۵، پروتئین مورفوژنتیک استخوانی- ٦ ng/ml.۵۰۰

حباب‌هاب آلژینات در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 نگهداری و هر ۳-۲ روز محیط کشت تعویض شد. پس از ۲۱ روز القای کندروژنیک قطرات آلژینات-سلول با روش‌های گوناگون بررسی شد. در محیط کشت گروه کنترل فاکتور رشد BMP-6 اضافه نشد.

ارزیابی ساختارهای حاصل پس از القای کندروژنیک

بررسی ایمونو هیستوشیمی: پس از تثبیت کردن و آماده‌سازی بافت قالب‌گیری با پارافین انجام شد.سپس تهیه مقاطع، شفاف کردن و آب‌دهی، تثبیت مقاطع در سطح لام با استن انجام گرفت. برای خنثی شدن فعالیت پراکسیداز هیدروژن درون بافت، نمونه‌ها در پراکسید هیدروژن (Merck) ۳ درصد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. برای هویدا شدن آنتی‌ژن‌ها (epitope retrieval) از آنزیم پپسین (Sigma) به میزان ۱ میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر اسید استیک ۰/۵ مولار به مدت ٤۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. سپس نمونه ها در آنتی‌بادی‌های اولیه علیه ملکول‌های کلاژن نوع II (Serotec) و آگریکان (Abcame) انسانی به مدت ۲٤ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید . در مرحله بعد آنتی‌بادی ثانویه متصل به پلی‌مر دارای (DAKO cytomation) Horse Radish Proxidase به نمونه‌ها اضافه شد و پس از شستشو با بافرPBS، کروموژن دی آمینو بنزیدین (DAKO cytomation) به نمونه‌ها افزوده شد. برای رنگ‌آمیزی زمینه از هماتوکسین (Merck) استفاده شد. پس از شستشوی نمونه‌ها با بافر مطالعه با میکروسکوپ نیکون انجام گرفت.

روش نسخه‌برداری معکوس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز RT – PCR

از روش RT – PCR برای ارزیابی بیان ژن‌های مربوط به ملکول‌های ماتریکس ویژه غضروف استفاده شد.

برای استخراج RNA از سلول‌های تمایز یافته ازکیت جداسازی RNX plus RNA isolation (CinnaGen) استفاده شد. ساخت cDNA با استفاده از پرایمرهای الیگو و کیت RevertAid ™ First strand cDNA synthesis kit (Fermentage) انجام شد بدین ترتیب که ۱۰ میکرولیتر RNA استخراج شده، ۱ میکرولیتر (oligo(dT و Ribonuclease inhibitor و dNTP و آنزیم Reverse Transcriptase (RT) به‌کار رفت. تکثیر cDNAها با استفاده از 10x buffer، d NTP، Taq polymerase، DNA و پرایمرهای آگریکان، کلاژن نوع II وگلیسرآلدهید ۳- فسفات دهیدروژناز (جدول ۱)، تحت شرایط یک سیکل مقدماتی به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای دناتوره کردن سپس ۳۰ سیکل هر سیکل شامل ۳۰ ثانیه با دمای ۹۵

Archive of SID
www.SID.ir

درجه سانتی‌گراد برای denaturation۳۰ ثانیه با دمای ٥٦ درجه سانتی‌گراد برای annealing٤٥ ثانیه با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای extention و در پایان یک سیکل به مدت ۵ دقیقه با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای extention نهایی انجام شد.

الکتروفورزمحصول PCR در ژل آگارز۱ درصد درشدت جریان ۹۰ میلی آمپر و ولتاژ ٤٥ میلی‌ولت به انجام رسید.

جدول۱. توالی پرایمرهای به‌کار رفته

نام ژن	توالی پرایمرها	اندازه محصول
Aggrecan	F- AGGAGGGCTGGAACAAGTACC R- GGAGGTGGTAATTCCAGGGAACA	350 bp
Collagen II	F- CAGGTCAAGATGGTC R- TTCAGCACCTGTCTCACCA	370 bp
GAPDH	F- GGGCTGCTTTTAACTCTGGT R- GCAGGTTTTTCTAGACGG	680 bp

یافته‌ها

مورفولوژی سلول‌های بنیادی جداشده از بافت چربی: در بررسی سلول‌های زنده و رنگ آمیزی نشده با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست، سلول‌های کشت اولیه به اشکال مختلف دوکی و چندوجهی مشخص شد. در مواردی که تعداد بسیار کمی از سلول‌ها در فلاسک کشت داده شد، هر سلول با انجام تقسیمات متوالی، تعدادی سلول مشابه در اطراف خود پدید آورد و بدین ترتیب کلونی تشکیل شد. با ادامه روند تکثیر سلولی فواصل کلونی‌ها کاهش یافته و سرانجام کف فلاسک به‌طور یکنواخت توسط سلول‌های دوکی اشغال شد. پس از آن سلول‌ها تریپسینه شده و به ظروف کشت جدید انتقال یافتند و پس از رسیدن به پاساژ سوم، هموژن و یکنواختی در کشت سلول‌ها کاملاً مشخص شد (شکل ۱).

بررسی نتایج حاصل ازتمایز کندروژنیک بر روی داربست آلژینات

حباب‌های آلژینات محتوی سلول، پس از ۲۱روز القای کندروژنیک به‌صورت قطرات کروی شکل مشخص شد (شکل ۲). سلول‌ها در داربست آلژینات مورفولوژی کروی داشتند.

بررسی نتایج روش ایمونوهیستوشیمی: نمونه‌هایی که در داربست آلژینات تحت تأثیر فاکتور رشدBMP-6 قرارگرفته بود، برای ارزیابی وجود ماتریکس ویژه غضروف با روش ایمینوهیستوشیمی بررسی شد. نتایج حاصل، وجود ترکیبات آگریکان و کلاژن نوع II را به‌صورت تشکیل رسوب قهوه‌ای رنگ دی آمینوبنزیدین مشخص نمود. (شکل ۳) همچنین در گروه کنترل که محیط کشت بدون فاکتور رشدBMP-6 به‌کار رفت، نتایج ایمونوهیستوشیمی عدم وجود آگریکان و کلاژن نوع]] به‌صورت عدم تشکیل رسوب قهوه‌ای رنگ دی آمینوبنزیدین مشخص شد (شکل ٤). به‌علاوه با این روش وجود آگریکان در مقاطع غضروف طبیعی به‌عنوان گروه کنترل مثبت به خوبی آشکار شد (شکل ٤).

بررسی نتایج RT-PCR

برای تأیید نتایج بررسی‌های هیستولوژیکی و ایمونوهیستوشیمی، بیان ژن‌های ملکول‌های اختصاصی غضروف از طریق RT-PCR ارزیابی شد و مشخص شد که تحت تأثیر فاکتور رشد BMP-6 بر داربست آلژینات سلول‌های بنیادی مشتق از چربی طی روند تمایز ترکیبات ویژه غضروف مانند آگریکان و کلاژن نوع II را بیان می‌کنند (شکل ٦). لازم به ذکر است بیان ژن‌های آگریکان و کلاژن نوع II در سلول‌های بنیادی پیش از القای کندروژنز و سلول‌هایی که در داربست آلژینات بدون افزودن فاکتور رشدBMP-6 کشت داده شدند نیزاز طریق RT-PCR بررسی شد وتنها بیان ژن GAPDH در آنها مشخص شد (شکل ۵).

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

از مهمترین ویژگی‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی، توانایی چسبندگی به سطوح پلاستیکی است. از این ویژگی، برای جداسازی سلول‌های بنیادی از سایر سلول‌ها، مانند سلول‌های خونی که فاقد این خاصیت هستند، استفاده شد. بررسی مورفولوژیکی سلول‌های چسبیده به کف فلاسک، اشکال چند وجهی و دوکی را نشان داد که از دیگر خصوصیات سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌شمار می‌رود [۲۸،۱۲و۲۹]. لازم به ذکر است با تکثیر و افزایش تعداد سلول‌ها، به‌تدریج سلول‌های شبه فیبروبلاستی دوکی شکل نسبت به دیگراشکال افزایش چشمگیری پیدا کرده بودند و این یافته نیز منطبق بریافته‌های دیگران است [۳۰و۳۱۰]. در مطالعه حاضر مشخص شد که جمعیت سلولی جدا شده از بافت چربی در کشت اولیه به‌صورت یک جمعیت ناهمگون و هتروژن خود را نشان می‌دهند، لیکن با پاساژهای متوالی در محیط کشت حاوی ۱۰ درصد سرم، جمعیت سلولی هموژن و یکدست و همگونی به‌دست می‌آید.

پروتوکل‌های متنوعی که در زمینه جداسازی، چگونگی کشت و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی عنوان شده است و همچنین نوع عمل جراحی، ناحیه برداشت نمونه، دانسیته کشت اولیه، شرایط کشت، فرمولاسیون محیط کشت نیز بر ویژگی‌های رشد، تکثیر و تمایز سلول‌ها تأثیر دارد [۳۲ و۳۳].

تحقیقات نشان داده است که برای طراحی بافت غضروف، دانسیته سلولی بالا و تعامل بین سلولی مورد نیاز است که به ترتیب از طریق سیستم کشت میکروماس یا Pellet culture و استفاده از داربست‌های سه بعدی تعامل بین سلولی مناسب برای القای کندروژنز فراهم می شود [۳٤و۲٤و۲۳و۱۲]. به‌علاوه وجود فاکتورهای رشد و سیتوکین‌های مناسب در محیط کشت کندروژنیک و عدم وجود سرم از ضروریات روند القای غضروف سازی محسوب می‌شود [۱۲، ۲۳، ۲٤، ۳۳ و۳۵].

لازم به ذکر است برای تمایز کندروژنیک در تحقیقات گسترده از داربست‌های متنوعی استفاده شده است که هر یک محاسن ومعایبی دارد. پلیمرهای مصنوعی گرچه ویژگی‌های مکانیکی مناسبی برای طراحی بافت دارند، اما برخی از آن‌ها دارای معایبی است از جمله:

– از زیست سازگاری مناسب برخوردار نیست و چسبندگی سلولی ایجاد نمی‌کند. به‌علاوه سطح آب گریز آن‌ها از رشد سلول‌ها در یک ساختار سه بعدی جلوگیری می‌کند[۱۸و ۱۹].

– به علت کمبود گروه‌های فعال در دسترس، سطوح این پلیمرها به آسانی قادر به تغییر و اصلاح نیست و در شرایط ساده آزمایشگاهی تهیه آنها به‌راحتی امکان پذیر نیست [۲۰].

در مورد انواع داربست‌های طبیعی مهم نیز معایبی وجود دارد. ژل‌های کلاژن از پایداری کمی برخوردار است و فاقد ویژگی‌های مکانیکی مناسب است، همچنین سرعت تخریب بالایی دارد. به‌علاوه داربست‌های کلاژن موجب جمع شدگی و چروک بافت شده و بر رشد و مهاجرت سلول‌ها تأثیر منفی می‌گذارد [۳٦] .تحقیقات نشان می‌دهد که پلیمر طبیعی کیتوسان به‌دلیل فقدان اجزای ماتریکس خارج سلولی فعال، برای طراحی بافت غضروفی کافی نیست و باید همراه با دیگر ترکیبات به‌کار رود [۳۷].

از آنجا که آلژینات به علت هیدروفیل بودن و داشتن مقادیر فراوان آب می‌تواند به‌عنوان ماده زمینه خارج سلولی بستری مناسب برای رشد سلول‌ها فراهم کند، بنابراین در تحقیق حاضر آلژینات به‌عنوان داربست انتخاب شد.

در بین القا کننده‌های کندروژنیک، اعضای خانواده فاکتورهای رشد تغییر شکل دهنده - بتا (TGF-β) از اهمیت خاصی برخوردار است. این فاکتورها در تنظیم رشد و تمایز رویان به ویژه در روند تکامل غضروف و استخوان تأثیر مهمی دارد [۳۸].

برخی مطالعات نشان داده‌اند که ایزوفرم‌های TGF-β به تنهایی

Archive of SID
www.SID.ir

برای تمایز سلول‌های مزانشیمی بنیادی کافی نیست و افزودن دیگر فاکتورها از جمله BMP-6 نه تنها وزن Pelletها بلکه میزان پروتئوگلیکان‌های تولید شده را نیز افزایش می‌دهد [۳۹].

از طرف دیگر در بررسی ایندراواتانا (Indrawattana) گزارش شده است که BMP-6 به تنهایی قادر به القای کندروژنز نیست [۳٤] به‌علاوه در تحقیقات دیگر وجود BMP-6 را برای استخوان‌سازی داخل غضروفی لازم می‌دانند و نقش اساسی این فاکتور را در تشکیل استخوان گزارش کرده‌اند [٤۰].

همچنین بررسی‌ها نشان داده است که طی تکامل رویان در مرحله پیش از هیپرتروفه شدن کندروسیت ها، BMP-6 بیان می‌شود. به‌علاوه BMP-6 میزان mRNA مربوط به کلاژن نوع X را در کشت تک لایه‌ای در کندروسیت‌های نابالغ و رده سلولی کندروژنیک ATDC5 افزایش می‌دهد [٤۱].

با توجه به گزارش‌های مختلف که تأثیر عوامل رشد گوناگون را در روند کندورژنز بسته به نوع سلول بنیادی مزانشیمی، روش کشت به‌کار رفته، گونه حیوانی، شرایط کشت، دانسیته سلولی به‌طور متفاوت بیان کرده‌اند، تناقضات مختلف در این زمینه همچنان وجود دارد. از این رو در تحقیق حاضر سلول‌های بنیادی از بافت چربی جداسازی، تکثیر و شناسایی شد و تمایز کندروژنیک روی داربست آلژینات مطالعه شد. در این روند برای القای کندروژنیک فاکتور رشد BMP-6 به‌کار گرفته شد.

برای اثبات وجود بافت غضروفی در ساختارهای حاصل از القای تمایز، روش‌های مختلف به‌کار می‌رود. همان‌گونه که در تحقیقات دیگر بیان شده است، وجود کلاژن نوع II و پروتئوگلیکان آگریکان نشان دهنده بافت غضروفی است [۱۲، ۲۳ و٤۲]، بنابراین با روش‌های ایمونوهیستوشیمی با استفاده از آنتی‌بادی‌های مربوط به ترکیبات فوق و نیز روش RT-PCR وجود بافت غضروف پس از ۲۱ روز القای کندروژنیک بررسی شد. بررسی‌ها نشان داد که پروتئین کلاژن نوع II و نیز آگریکان در بافت حاصل از کندروژنز وجود دارد، به‌علاوه بیان ژن‌های این ترکیبات نیز با روش RT-PCR مشخص شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که فاکتور رشد BMP-6 قادر به القای سلول‌های بنیادی مشتق از چربی به غضروف است. همان‌گونه که در گزارش سکیا (Sekiya) مشخص شده است که با افزودن BMP-6 به مدیوم کندروژنیک تولید پروتئوگلیکان‌ها در سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان افزایش می‌یابد [۳۹].

در نهایت تحقیق حاضر مشخص نمود که سلول‌های بنیادی به‌دست آمده از بافت چربی تحت تأثیرفاکتور رشدBMP-6 در داربست آلژینات به سلول‌های غضروفی تمایز می‌یابند و می‌توان ازسلول‌های بنیادی مشتق از چربی در داربست آلژینات تحت تأثیرفاکتور رشد BMP-6 برای طراحی بافت غضروفی استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

این مطالعه بخشی از طرح تحقیقاتی ۱۸۵۱۵۹ مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است و محل اجرای آن در آزمایشگاه کشت سلول گروه علوم تشریحی دانشکده پزشکی بوده است. نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از مساعدت‌های صمیمانه جناب آقای دکتر پیمان ادیبی، معاونت محترم پژوهشی، جناب آقای دکترعلی معینی، سرکار خانم آرتی و سرکار خانم شفیعی ابراز می‌دارند.

Refrences

1. **Hardingham T, Tew S, Murdoch A.** Tissue engineering : Chondrocytes and cartilage. Arthritis Res 2002; 4: 63-8.

2. **Mitchell N, Shepard N.** The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone. J Bone Joint Surg

Archive of SID

www.SID.ir

Am1976; 58: 230-3.

3. **Tew SR, Kwan AP, Hann A, Thomson BM, Archer CW.** The reactions of articular cartilage to experimental wounding: Role of apoptosis. Arthritis Rheum 2000; 43: 215-25.
4. **Holtzer H, Abbott J, Lash J, Holtzer S**. The loss of phenotypic traits by differentiated cells in vitro,I dedifferentiation of cartilage cells. Proc Natl Acad Sci USA 1960; 46 :1533-42.
5. Esfandiary E, Amirpour N, Fesharaki M, Nasr Esfahani MH, Molavi F, et al. Access to chondrocyte culture ,with alginate, In Iran. Yakhteh Med J 2008 ;10 :73-7.
6. **Benya PD, Shaffer JD.** Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. Cell 1982; 30: 215-24.
7. **Vacanti CA, Upton J.** Tissue-engineered morphogenesis of cartilage and bone by means of cell transplantation using synthetic biodegradable polymer matrices. Clin Plast Surg 1994; 21: 445-62
8. **Erdo F, Buhrle C.** Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. J Cereb Blood Fiow Metab 2003; 23:780-85.
9. **Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, Cho H, Matsumoto N, et al**. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologus transplantation . J Clin Invest 2004;113:1701-10.
10. **Muller SM, Glowacki J**. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. J Cell Biochem 2001; 82: 583 -90.
11. **Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ**. Identification of a subpopulation rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stormal cells. ,Proc Natl Acad Sci USA. 2001; 98: 7841-49.
12. Zuk PA, **Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, et al.** Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Molecul Biol 2002; 13: 4279-95.
13. **Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J.** Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. Stem Cells 2006; 24: 376–85.
14. **Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, Gimble JM, F Guilak F**. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate and gelatin scaffolds. Biomaterials 2004 ; 25: 3211-22.
15. **Wang FF, Wu CR, Wang YJ.** Preparation and application of poly (vinylamine) /alginate microcapsules to culturing of a mouse erythroleukemia cell line. Biotechnol bioeng 1992; 40: 1115-18.
16. **Kose G, Korkusuz TF, Özkul A, Soysal Y, Özdemir T.** Tissue engineered cartilage on collagen and PHBV matrices. Biomaterials 2005 ; 26: 518-27.
17. **Suh JK, Matthew HW.** Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering. Biomaterials 2000; 21:2589-98.
18. **Chen G, Ushida T, Tateishi T.** A biodegradable hybrid sponge nested with collagen microsponges. J Biomed Mater Res 2000 ;51: 273-79.
19. **Lahiji A, Sohrabi A, Hangerford DS.** Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. J Biomed Mater Res 2000; 51: 586 -95.
20. **Thomson RC,Yaszemski MJ, Powers JM.** Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone. J Biomater Sci Polym Ed 1995; 7:23-38.
21. **Stevens MM, Qanadilo HF, Langer R, Shastri PV.** A rapid-curing alginate gel system: utility in periosteum-derived cartilage tissue engineering .

Archive of SID

www.SID.ir

Biomaterials 2004; 25: 887-94.

22. **Stevens MM, Marini RP, Martin I, Langer R, Shastri PV**. FGF-2 enhances TGF-β1-induced periosteal chondrogengsis. J Orthop Res 2004; 22:1114-19.
23. **Hashemibeni B, Razavi S, Esfandiary E, Karbasi S, Mardani M ,et al.** Induction of chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells with TGF-β3 in pellet culture system. IJBMS 2008;11:10-17.
24. **Estes BT, Wu AW, Guilak F.** Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6. Arthrit Rheum 2006; 54: 1222-32.
25. **Majumdar MK, Wang E, MorrisEA.** BMP-2 and BMP-9 promote chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and and overcomes the inhibitory effect of IL-1. J Cell Physiol 2001; 189 :275 – 84.
26. **Hanada K, Solchaga LA, Caplan AI, Hering TM**. BMP-2 induction and TGF-I modulation of rat periosteal cell chondrogenesis. J Cell Biochem 2001; 81: 284-94.
27. **Bai X, Xiao Z, Pan Y, et al.** Cartilage-derived morphogenetic protein-1 promotes the differentiation of mesenchymal stem cells. Biochem Biophy Res Commun 2004;325: 453-60.
28. **Kassem M, Mosekilde L, Eriksen EF, Blum W, Ristelli J**. 1,25-dihydroxyvitamin D3 potentiates fluoride-stimulated collagen type I production in cultures of human bone marrow stromal osteoblast-like cells. J Bone Miner Res 1993; 8:1453-58.
29. **Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS.** The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. Cell Tissue Kinet 1970 ; 3: 393-03.
30. **Cotler DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ .** Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow . Natl Acad Sci 2000; 97: 3213-18.
31. **Mitchell TB., McIntosha K.**, **Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE , et al.** The immunophenotype of human adipose derived cells: Temporal changes in stromal- and stem cell-associated markers. Stem Cells 2006; 24: 376-85.
32. **Peptan IA, Hong L, Mao JJ.** Comparison of osteogenic potentials of visceral and subcutaneous adipose-derived cells of rabbits. Plast Reconstr Surg 2006;117:1462-70.
33. **Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J.** Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. Stem Cells 2006; 24: 376–85.
34. **Hashemibeni B, Razavi S, Esfandiary E, Karbasi S, Mardani M, SadeghiF.et al.** The effect of BMP-6 growth factor on differentiation of adipose-derived stem cells into chondrocyte in pellet culture. JIMS 2009, 27:613-44.
35. **Mehlhorn AT, Niemeyer P, Kaschte K, Muller L, Finkenzeller G.** Differential effects of BMP-2 and TGF-β1 on chondrogenic differentiation of adipose derived stem cells. Cell Proliferation 2007; 40: 809-23.
36. **Frenkel SR , Bradica G, Brekke JH, Goldman SM**.Regeneration of articular cartilage – evaluation of osteochondral defect repair in the rabbit using multiphasic implants. Osteoart Cartil 2005;13: 798-09.
37. **Chen YL, Lee HP, Chan HY, Sung LY, Chen HC, Hu YC**. Composite chondroitin-6-sulfate/dermatan sulfate/chitosan scaffolds for cartilage tissue engineering. Biomaterials 2007; 28: 2294-305.
38. **Wazney JM, Rosen V**.Bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. Clin Orthop 1998; 346: 26-37.
39. **Sekiya I, Colter DC, Prockop DJ**. BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. Biochem Biophys

Archive of SID

www.SID.ir

Res Commun. 2001;284:411-8.

40. **Chen H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC.** Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins. J Bone Joint Surg AM 2003; 85: 1544-52.
41. **Denker AE, Hass AR, Nicoll SB, Tuan RS.** Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: I. Stimulation by Bone morphogenetic protein-2 in high-density micromass culture. Differentiation 2002; 64 :67-76.
42. **Johnston B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM.** In vitro chondrogenesis of bone Marrow-derived. mesenchymal progenitor cells. Exp Cell Res 1989; 238: 265-72.

Archive of SID

www.SID.ir