

Study of Differentiation Potential of the Dedifferentiated Chondrocytes from Rat Articular Cartilage into Skeletal Cell Lineages

***Baghaban Eslaminejad M.R., Ph.D.*; Taghiyar L., M.Sc., Falahi F., M.Sc.,
Ajdari Tafti Z., B.Sc.***

**P.O.Box: 19395-4644, Stem Cell Department I, Cell Sciences Research Center, Royan Institute,
ACECR, Tehran, Iran.*

Abstract

Purpose: Dedifferentiation of the chondrocyte from rat articular cartilage with multiple subcultures and study of the redifferentiation potential of the cells into bone, cartilage and fat cell lineages.

Materials and Methods: In this experimental study, chondrocytes from rat articular cartilage were isolated and expanded through several successive subcultures during which the expression levels of cartilage-specific genes including aggrecan and type II collagen were measured by using real-time PCR to determine the cell dedifferentiation (the time in which cartilage genes ceased their expression). Furthermore, during the culture period, the chondrocyte was examined morphologically by scanning electron microscopy (SEM). At the end, the dedifferentiated cells were subjected to osteogenic, adipogenic and chondrogenic culture condition to investigate whether or not they are able to redifferentiate into specialized progenies. Differentiation state was examined by specific staining and RT-PCR analysis.

Results: Based on the findings by real time PCR, the expression levels of the both studied genes were high at passage 2 and dramatically decreased at passage 4. Aggrecan expression ceased at passage 10 and collagen II stopped expressing at passage 6. SEM images indicated the flattened morphology of the cells at early passages and the fibroblastic appearance at late passages. Differentiation examination revealed that the dedifferentiated cells were readily differentiated into bone, adipose and cartilage cell lineages.

Conclusion: Considering all aspects together, this concluded that articular chondrocyte gradually lost their differentiated state during the long-term culture and changed into multipotent cells capable of differentiating into skeletal cell lineages.

Keywords: Chondrocytes, Articular cartilage, Dedifferentiation, Differentiation into skeletal cell lineages.

بررسی پتانسیل تمایز به رده‌های اسکلتی کندروسیت‌های تمایززدایی شده جدا شده از غضروف مفصلی موش صحرایی

محمد رضا باغبان اسلامی نژاد Ph.D.*، لیلا تقی‌پار M.Sc.*، فهیمه فلاحي M.Sc.*، زهرا اژدری تفتی M.Sc.*

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

تاریخ وصول: تیرماه ۸۷، تاریخ پذیرش: شهریورماه ۸۷

چکیده

هدف: تمایز زدایی کندروسیت‌های مفصلی موش صحرایی با کشت طولانی مدت و بررسی پتانسیل تمایزی آنها به رده‌های اسکلتی شامل استخوان، غضروف و چربی

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر، کندروسیت از غضروف مفصل زانوی موش‌های صحرایی استخراج شده و با انجام چند پاساژ سلولی تکثیر شد. در طول این مدت به فواصل چند پاساژ، میزان بیان ژن‌های ویژه غضروفی شامل اگریکان و کلاژن تیپ II با روش PCR (Polymerase Chain Reaction) کمی (Real Time) اندازه‌گیری شد تا زمان تمایز زدایی (زمانی که بیان ژن‌های غضروفی در کندروسیت‌های در حال کشت متوقف شود) تعیین شود. همچنین طی کشت مورفولوژی سلولی با روش میکروسکوپ اسکینینگ نیز بررسی شد. سلول‌های تمایززدایی شده در شرایط تمایز به استخوان، چربی و غضروف کشت شدند تا پتانسیل تمایز مجدد آنها بررسی شود. وقوع تمایز با روش رنگ‌آمیزی اختصاصی و انجام آنالیز بیان ژنی با روش RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) بررسی شد.

یافته‌ها: بر اساس نتایج PCR کمی، بیان ژن‌های غضروفی در پاساژ دو در حد بالایی بود و از پاساژ ۴ به شدت افت پیدا کرد. بیان ژن اگریکان در پاساژ ۱۰ و ژن کلاژن II در پاساژ ۶ متوقف شد. براساس تصاویر میکروسکوپ اسکینینگ، کندروسیت‌ها در پاساژ اولیه مورفولوژی پهن داشتند و در پاساژهای انتهایی ظاهر شبه فیبروبلاستی داشتند. بررسی تمایز نشان داد که کندروسیت‌های تمایز زدایی شده قادرند علاوه بر رده سلول‌های غضروفی به رده سلول‌های استخوانی و چربی نیز تمایز یابند.

نتیجه‌گیری: روی هم رفته می‌توان گفت که کندروسیت‌های مفصلی به تدریج طی کشت طولانی مدت حالت تمایز یافتگی خود را از دست داده و به یک سلول چند توان مبدل می‌شوند که قادرند با فراهم شدن شرایط لازم، به سه رده اسکلتی استخوان، غضروف و چربی متمایز شوند.

کلیدواژه‌ها: کندروسیت، غضروف مفصلی، تمایززدایی، تمایز به رده‌های اسکلتی

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

حافظ شرقی، پژوهشکده رویان، صندوق پستی: ۱۹۳۹۵-۴۶۴۴

E-mail: eslami@royaninstitute.org

مقدمه

غضروف هیالین مفصلی، به عنوان نوعی بافت همبند، فاقد عروق خونی بوده، از لحاظ تغذیه‌ای تا حد زیادی به مایع مفصلی وابسته است [۱]. تنها سلول‌های موجود در این بافت، کندروسیت‌ها هستند که توسط ماتریکس خارج سلولی متشکل از فیبرهای کلاژن (اغلب) تیپ II و مولکول‌های پروتئوگلیکان در برگرفته شده‌اند. [۲]. در مواقع آسیب، بافت غضروف قادر به ترمیم نبوده، ضایعات آن یکی از دغدغه‌های اساسی مهندسی بافت و ارتوپدی محسوب می‌شود.

تا کنون روش‌های درمانی متفاوتی به‌منظور درمان ضایعات غضروف هیالین از جمله تراشیدن استخوان ساب کندرال و ایجاد شکستگی ریز در استخوان زیر غضروف مفصلی پیشنهاد شده است ولی هیچ‌یک از این روش‌ها به‌عنوان درمان استاندارد و قطعی شناخته نشده است زیرا حاصل هر دو روش، ساخت غضروف فیبرو به جای هیالین است [۳-۴]. روش دیگر، استفاده از پیوند استئوکندرال به صورت اتوگرافت یا آلوگرافت است. در پیوند اتولوگ مریض باید متحمل عمل جراحی ثانویه برای برداشت غضروف از بخش سالم مفصل شود و در ضایعات وسیع، تأمین غضروف به اندازه کافی از این محل میسر نیست. استفاده از آلوگرافت نیز با محدودیت منابع تأمین کننده (جسد) روبروست [۵].

یکی از روش‌های درمانی مورد توجه دیگر در این زمینه، سلول درمانی با استفاده از کندروسیت‌های اتولوگ است که اولین پیوند آن در سال ۱۹۹۴ گزارش شده است [۶-۷]. چون بافت غضروف از تراکم سلولی پایینی برخوردار است و از طرفی راهبردهای سلول درمانی، سلول فراوانی می‌طلبد، تکثیر آزمایشگاهی کندروسیت‌ها امری اجتناب‌ناپذیر است [۸-۱۲]. این درحالیست که براساس مطالعات پیشین، کندروسیت‌ها، در زمان کشت، به مرور دچار تغییراتی شده، ویژگی‌های تمایزی خود را از دست می‌دهند (تمایز زدایی) [۱۳-۱۵].

برخی مطالعات نشان داده است که اگرچه کندروسیت‌ها در کشت تک لایه، خصوصیات تمایز یافتگی خود را دست می‌دهند [۱۶] ولی این ویژگی‌ها برگشت‌پذیر است و حتی وقوع آن قابل پیشگیری است. در این ارتباط مندل (Mandl) در سال ۲۰۰۴ با افزودن فاکتور رشد فیبروبلاستی به محیط کشت سلول‌های غضروفی، تمایز زدایی آنها را کاهش داد [۱۷]. در مطالعه‌ای ایمابایاشی (Imabayashi) نشان داد که کندروسیت‌های تمایززدایی شده با کشت سه بعدی، ویژگی‌های تمایز یافتگی را مجدداً کسب می‌نمایند [۱۸]. همچنین مالدا (Malda) و همکاران نشان دادند که کاهش میزان اکسیژن محیط کشت سلول‌های تمایززدایی شده، موجبات تمایز مجدد آنها را فراهم می‌آورد [۱۹]. از طرفی یافته‌های گوسلر (Goessler) و همکاران نشان داده است که کندروسیت‌های تمایززدایی شده در بسیاری از ژن‌های ایستگ‌زینی مشابه سلول‌های بنیادی مزانشیمی هستند [۲۰]. یافته اخیر، این احتمال را تقویت می‌کند که سلول‌های تمایززدایی شده ممکن است مشابه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی از لحاظ تمایز نیز چند توان باشند. در این ارتباط مطالعات بسیار اندک است بنابراین در تحقیق حاضر این موضوع مورد توجه قرار گرفته است.

هدف مطالعه حاضر کشت طولانی مدت کندروسیت‌ها در محیط کشت به‌منظور تمایززدایی کامل آنها و سپس بررسی توان تمایزی آنها به رده‌های اسکلتی است. برای این منظور ابتدا کندروسیت‌های غضروف مفصل زانوی موش صحرایی به مدت ۱۰ پاساژ سلولی کشت و تکثیر شد. در فواصل زمانی مختلف، میزان بیان ژن‌های ویژه غضروفی با روش Real time RT-PCR تعیین شد تا از تمایززدایی کامل سلول اطمینان حاصل شود. در انتها سلول‌های تمایززدایی شده در شرایط تمایز به غضروف، استخوان و چربی قرار گرفتند تا پتانسیل تمایزی آنها بررسی شود. همچنین در این مطالعه با

بررسی میکروسکوپ اسکیننگ: از این روش به منظور بررسی مورفولوژی سلول‌ها طی کشت استفاده شد. ابتدا نمونه‌ها به کمک گلو تار آلد هید ۲/۵ درصد به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ثبوت اولیه شدند و پس از شستشو با محلول بافر، نمونه‌ها به کمک تثبیت کننده ثانویه تتراسید اسمیوم ۱ درصد آبی، به مدت ۲ ساعت تثبیت شد. سپس به کمک اتانل ۳۰ تا ۱۰۰ درصد آبیگری انجام شد و پس از آن به کمک دستگاه لیوفلایزر نمونه‌ها خشک شده و با میکروسکوپ اسکیننگ بررسی شد.

بررسی Real time RT-PCR: از این روش به منظور مقایسه میزان بیان ژنی کندروسیت‌های در حال کشت و کندروسیت‌های بافتی استفاده شد. همچنین با بهره‌گیری از این روش، پاساژ سلولی که در آن بیان ژن‌های آگریکان و کلاژن II (جدول ۱) در کندروسیت‌های کشت شده متوقف می‌شود، تعیین شد. این کندروسیت‌ها به عنوان سلول‌های تمایززدایی شده در نظر گرفته شدند. برای انجام Real-time PCR، ابتدا کل موجودی RNA سلول‌های پاساژهای ۱۰-۲ با روش (NXTM-Plus) استخراج شد غلظت RNA با اسپکتوفوتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر تعیین شد. پیش از انجام RT-PCR، توده RNA استخراج شده در معرض DNAase قرار گرفت تا آلودگی احتمالی DNA بر طرف گردد. واکنش RT برای ۲ میلی گرم RNA با استفاده از پرایمر Random Hexamere و کیت Revert Aid TM برای سنتز cDNA تک رشته انجام شد. برای هر نمونه یک واکنش RT- ساخته شد. با استفاده از SYBRGreenPCR Master واکنش Real-time PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر تهیه شد. برای به دست آوردن Efficiency واکنش با پرایمرهای به کار برده شده، برای تمام ژن‌ها serial dilution در ۶ غلظت با ضریب رقت ۱/۵ انجام شد. Ct‌های به دست آمده از دستگاه Applied Biosystem با استفاده از روش $2^{-\Delta C_T}$ و با فرض

بهره‌گیری از PCR کمی، میزان بیان ژن‌های کلاژن II و آگریکان در کندروسیت‌های در حال کشت با کندروسیت‌های بافتی مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

کشت غضروف مفصلی رت

در این تحقیق از موش‌های صحرایی نر، نژاد ویستار (Wistar) به سن تقریبی ۶-۴ هفته استفاده شد. ابتدا مجوز لازم مبنی بر استفاده از این حیوان آزمایشگاهی، از کمیته اخلاق پزشکی پژوهشکده رویان اخذ شد. موش‌ها به روش خفگی با CO₂ قربانی شدند. ناحیه زانو با الکل ۷۰ درصد ضد عفونی شده، با تیغ تراشیده شد. مفصل زانو باز شد و لایه غضروف موجود روی انتهای استخوان ساق جدا و به داخل محیط کشت DMEM (Dubleco's modified eagles medium Gibco, Germany) حاوی ۱۵ درصد سرم FBS (Fetal Bovine Serum; Gibco, Germany)، ۱۰۰ واحد بین المللی آنتی بیوتیک پنی‌سلین و ۱۰۰ واحد بین‌المللی استروپتومایسین (Gibco, Germany) منتقل شد. در زیر هود استریل، غضروف به قطعات ۲-۳ میلی‌متری بریده شد و یک میلی‌لیتر محلول آنزیمی کلاژناز تیپ I ۰/۲ درصد (Sigma, Germany) به آن اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس قطعات بافت هضم شده به یک فلاسک کشت ۷۵ سانتی‌متری منتقل شد و ۱۵ میلی‌لیتر محیط DMEM به آن اضافه شد. پس از طی یک تا دو روز کندروسیت‌ها از کناره قطعات بافتی شروع به مهاجرت کرده، در کف ظرف کشت پراکنده شدند و طی یک هفته ظرف کشت را پر کردند. کشت سلول با انجام پاساژ سلولی تکثیر شد. در طول مدت کشت، بیان ژن‌های ویژه کندروسیت شامل کلاژن II و آگریکان در مقایسه با کندروسیت‌های بافتی بررسی شد.

بلو (Sigma, Germany) دردمای اتاق رنگ شد.

تمایز به استخوان: سلول‌های پاساژ ۱۰ به تعداد ۱۰۵ × ۲/۵ در ظروف کشت ۶ چاهکی کشت شد. زمانی که ظرف کشت پر از سلول شد، محیط آن‌ها با محیط تمایز به استخوان شامل محیط کشت DMEM حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر Ascorbic2- Phosphate (Germany)، ۱۰ نانومولار Dexametasone (Sigma, Germany) و ۱۰ میلی‌مولار B-Glycerol Phosphate (Sigma, Germany) جایگزین شد. در پایان هفته سوم تمایز سلول‌ها به روش رنگ‌آمیزی آلیزارین رد و آنالیز RT-PCR ارزیابی شد.

رنگ‌آمیزی آلیزارین رد: تک لایه سلولی با PBS⁺ (Phosphate Buffered Saline) شسته شده و به مدت ۱۰ دقیقه با متانل (Merck, Germany) تثبیت شد و سپس با محلول رنگی (۱ درصد آلیزارین رد اس در آب آمونیاکی ۲۵ درصد) به مدت ۲ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. سلول‌ها با آب مقطر شسته و خشک شد.

تمایز به چربی: سلول‌های حاصل از پاساژ ۱۰ به تعداد ۱۰۵ × ۲/۵ سلول در ظروف کشت ۶ چاهکی کشت شده و پس از پر شدن کف ظرف، محیط تمایز به چربی به آن اضافه شد. این محیط شامل DMEM حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر Ascorbic2-Phosphate (Sigma, Germany)، ۱۰۰ نانومولار Dexametasone (Sigma; Germany) و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر Indomethacine (Sigma; Germany) بود. برای بررسی نتایج از روش رنگ‌آمیزی اوایل رد و RT-PCR استفاده شد.

رنگ‌آمیزی Oil red: ابتدا سلول‌ها به مدت یک ساعت در دمای اتاق با فرمالین ۴ درصد تثبیت شده و سپس با الکل ۷۰ درصد شسته شد و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه با محلول Oil red ۰/۵ درصد در ۹۹ درصد الکل ایزوپروپانل، رنگ‌آمیزی شد و در انتها محلول رنگی خارج شد و سه بار با الکل ۷۰ درصد شستشو شد.

۱۰۰ درصد efficiency آنالیز شدند. داده‌های حاصل با استفاده از SPSS نسخه ۱۳ و آزمون آماری LSD و Tukey بررسی شدند و نمودار داده‌های مربوط به بیان ژن با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شد.

بررسی پتانسیل تمایزی سلول‌های تمایززدایی شده

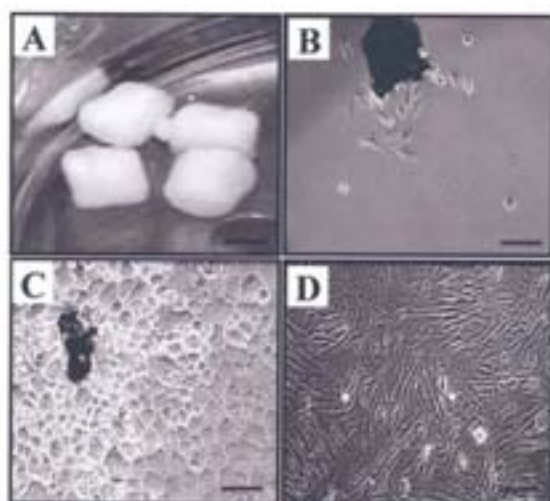
با توجه به اینکه سلول‌ها در پاساژ ۱۰ بیان ژن آگریکان در پاساژ ۶ بیان ژن کلاژن II را متوقف کردند از سلول‌های پاساژ ۱۰ که در آن بیان هر دو ژن متوقف بود برای بررسی توان تمایز به سه رده استخوانی، غضروف و چربی استفاده شد.

تمایز به غضروف: حدود ۱۰۵ × ۲/۵ سلول پاساژ ۱۰ به یک لوله ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شد. سلول‌ها تحت ۱۲۰۰ g به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد تا تراکم سلولی ایجاد شود. محیط رویی تخلیه شد و محیط کندروژنیک شامل محیط DMEM حاوی ۱۰ نانوگرم فاکتور رشد (Sigma, Germany) TGF-B3، ۱۰ نانوگرم BMP-6 (Sigma, Germany)، ۵۰ میلی‌گرم ITS+premix (Sigma, Germany)، ۵/۳۵ linoleic acid (Sigma, Germany) و ۱/۲۵ میلی‌گرم bovine serum albumin (Sigma, Germany) روی پلیت سلولی، اضافه شد. محیط تمایز هر ۳-۴ روز یکبار به مدت ۳ هفته تعویض شد. برای ارزیابی تمایز از رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو و روش RT-PCR استفاده شد.

رنگ‌آمیزی اختصاصی تولوئیدین بلو: نمونه‌ها به روش روتین بافتی پردازش، و برش‌های ۵ میکرومتری از آن‌ها تهیه شد. به این ترتیب که سلول‌ها ابتدا به مدت ۲ ساعت در پارا فرمالدهید ۴ درصد تثبیت شدند. سپس به ترتیب با استفاده از الکل و گزلیل، آبگیری و شفاف‌سازی شدند و در انتها در پارافین قالب‌گیری شدند و با استفاده از میکروتوم، برش‌های ۵ میکرومتری تهیه شد و به مدت ۳۰ ثانیه با رنگ تولوئیدین

یافته‌ها

کشت کندروسیت‌های غضروف مفصلی رت: تکه‌های بافت غضروف در کلاژناز تیپ I به حالت نیمه‌هضم شده درآمد و اتصال سلول‌ها به دلیل حل شدن ماده زمینه‌ای سست شد (شکل ۱A). پس از کشت تکه‌های بافت، کندروسیت‌ها از نواحی حاشیه‌ای بافت شروع به مهاجرت کرده و در کف ظرف کشت پراکنده شدند (شکل ۱B). کندروسیت‌ها در کشت اولیه مورفولوژی پنج و شش ضلعی داشتند و بسیار کوچک بودند (شکل ۱C) و به مرور طی ۱۰ پاساژ مورفولوژی کندروسیت‌ها از فرم گرد به سلول‌های کشیده و دوکی تغییر کرد و اندازه آن‌ها بزرگتر از کشت اولیه به نظر رسید (شکل ۱D).



شکل ۱. کشت سلول‌های کندروسیت.

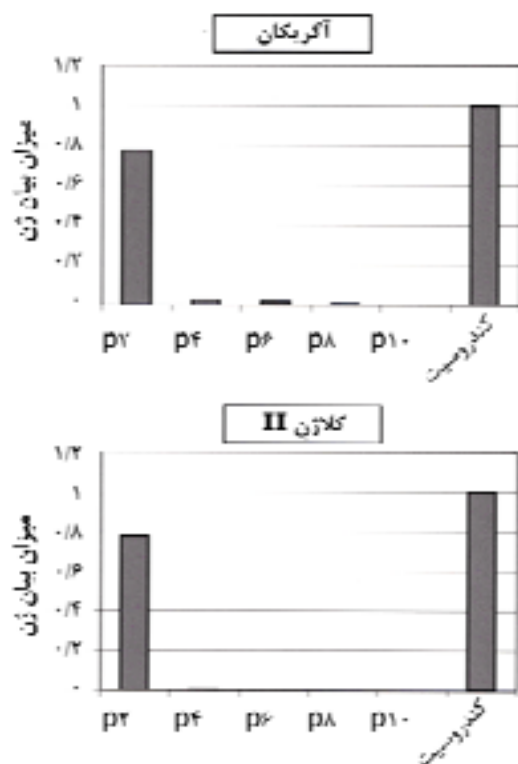
A: تکه غضروف در محلول کلاژناز I، B: سلول‌های کندروسیت در حال مهاجرت از بافت، C: جمعیت کندروسیت‌ها با مورفولوژی گرد در کشت اولیه، H: کندروسیت‌ها در پاساژ ۱۰، (میکروسکوپ نوری، بار: ۱۰۰ میکرومتر)

بررسی میکروسکوپ اسکینینگ: کندروسیت‌ها در کشت اولیه گرد و کوچک بودند و زواید سیتوپلاسمی در این سلول‌ها مشاهده نشد (شکل ۲A). کندروسیت‌های تمایززدایی

RT-PCR: به منظور بررسی تمایز در سطح مولکولی از روش RT-PCR استفاده شد. ابتدا با استفاده از کیت (740955) Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel, Germany) سلولی استخراج شد. نمونه‌های RNA موجودی استخراج شده تحت تیمار با Dnase I (104132, Roch) قرار گرفتند تا آلودگی‌های احتمالی مربوط به DNA ژنومیک از نمونه‌های RNA حذف شد. سپس خلوص و غلظت RNA استخراج شده با روش اسپکتروفتومتری تعیین و پس از آن ۱ میکروگرم از RNA استخراج شده با استفاده از پرایمر ژن‌های مورد نظر (جدول ۱) و Random Hexamer از کیت (K 1622 Fermentas) Revert AidTMH Minus First Strand cDNA Synthesis نسخه‌برداری معکوس شد. سپس از cDNA تولید شده به عنوان الگو برای PCR استفاده شد. برای این منظور PCR Buffer (AMS) ۲ μl، cDNA (۱۰۰ ng/μl) ۲/۵، PCR (۱۰×) ۲/۵، dNTPmix (۱۰ mM) ۰/۵ از هر پرایمر (۵ μM) ۱ μl، Taq (5 unit/1 μl) ۰/۵، (سیناژن، 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 روی آگارز ۱/۷ درصد جدا شدند و سپس با اتیدیوم بروماید قابل مشاهده شدند.

جدول ۱ پرایمرهای PCR

نام ژن	توالی پرایمر
PPAR gamma	F: 5' GGCAAATCTCTGTTTATG3' R: 5' GGAGTGGTCATCCATCACAG3'
PPAR alpha	F: 5' CTGCTATAATTTGCTGTGGAG 3' R: 5' GCTCCGTGACCAGCTGCCGG 3'
C-EBP alpha	F: 5' CCGCACCCCGACCTCCGCACC 3' R: 5' TTTATCTCGGCTCTGCGCAC 3'
osteocalcin	F: 5' AGAACAGACAAGTCCCACAC 3' R: 5' GCCGGAGTCTATTCACCAC 3'
GAPDH	F: 5' ATCATCTCTGCTCTTCTGC 3' R: 5' GTCCTCTGGGTGGCAGTGAT 3'
Aggrecan	F: 5' ATGGTGACAAGGACGAGTTC 3' R: 5' CGTGCCCCAGCCTCCG 3'
Col II	F: 5' CAATGATGTGGAGATGAGCC 3' R: 5' CAATGTCAACATGGGAAGG 3'
ALP	F: 5' ACACGGACAAGAAGCCCT 3' R: 5' GTGAAGCAGGTGAGCCATAG3



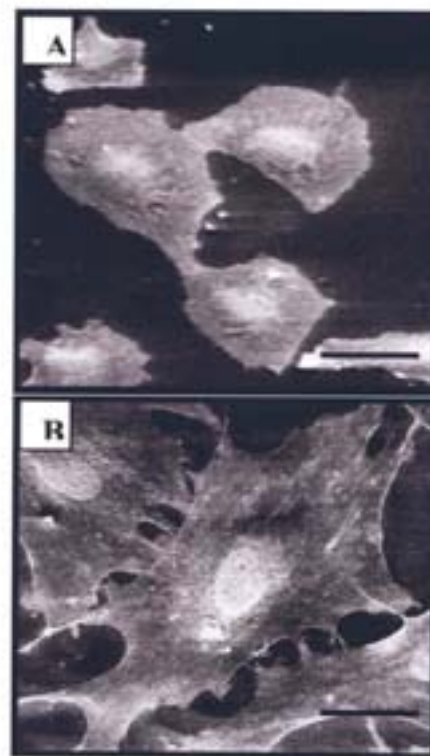
شکل ۳. PCR کمی (Real-Time) برای بررسی میزان بیان ژن‌های آگریکان و کلاژن II طی کشت. بیان ژن‌های کلاژن II و آگریکان در کندروسیت‌های مفصلی موش صحرایی در مقایسه با کندروسیت‌های بافتی کاهش یافته است. بیان آگریکان در پاساژ ۱۰ و بیان کلاژن II در پاساژ ۶ متوقف شده است.

تمایز

تمایز به غضروف: در برش‌های تهیه شده از کشت تمایز به غضروف که با تولوئیدین بلو رنگ‌آمیزی شدند، مناطق بنفش رنگ متاکروماتیک مشاهده شد (شکل ۴A). بر اساس RT-PCR انجام شده ژن‌های ویژه غضروف یعنی کلاژن II، X و آگریکان در سلول‌های تمایز یافته بیان شده بود (شکل ۴C).

تمایز به استخوان: این کشت هر روز با میکروسکوپ معکوس مشاهده شد. اولین نشانه‌های تغییرات مورفولوژیک و تمایز به استخوان یک هفته پس از القای تمایز مشاهده شد، بدین ترتیب که در مناطقی از تک لایه سلولی، توده‌های سلولی تشکیل شد و به تدریج بزرگتر شد (شکل ۲A). سلول‌ها از لحاظ ترشح ماتریکس معدنی با روش آلیزارین رد ارزیابی

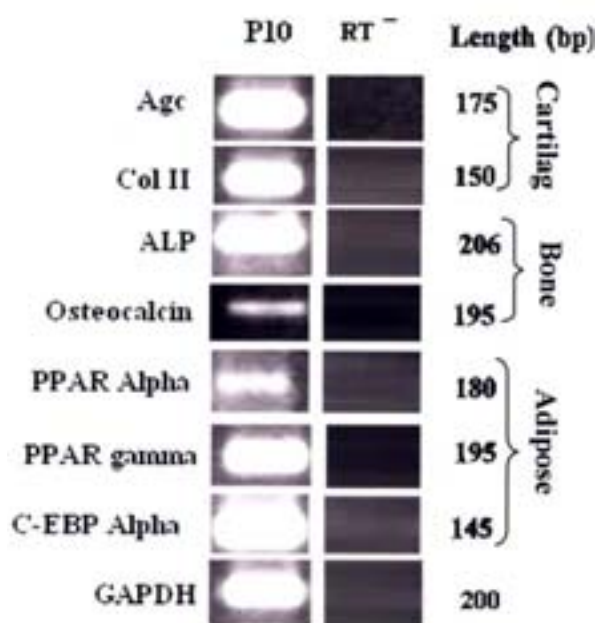
شده در پاساژ ۱۰، کشیده و دوکی شکل بوده، زواید سیتوپلاسمی داشتند (شکل ۲B).



شکل ۲. بررسی میکروسکوپ اسکینینگ.

A: کندروسیت‌ها در کشت اولیه دارای مورفولوژی گرد و کوچک بود و زواید سیتوپلاسمی در این سلول‌ها مشاهده نشد. B: کندروسیت‌های تمایززدایی شده در پاساژ ۱۰ مورفولوژی دوکی و کشیده به خود گرفتند و دارای زواید سیتوپلاسمی بودند (میکروسکوپ اسکینینگ، بار: ۵۰ میکرومتر).

نتایج Real time PCR: این بررسی نشان داد که در کندروسیت‌های در حال کشت در مقایسه با کندروسیت‌های بافتی به مرور میزان بیان ژن‌های کلاژن II و آگریکان کاهش می‌یابد. براساس این بررسی‌ها، کندروسیت‌ها در کشت تک لایه در پاساژ ۲ بیشترین مقدار بیان ژن کلاژن II و آگریکان را داشتند. با انجام دو پاساژ متوالی، میزان بیان این دو ژن به میزان زیادی کاهش یافت. در پاساژ ۶ بیان کلاژن II و در پاساژ ۱۰ بیان ژن آگریکان متوقف شد (شکل ۳).



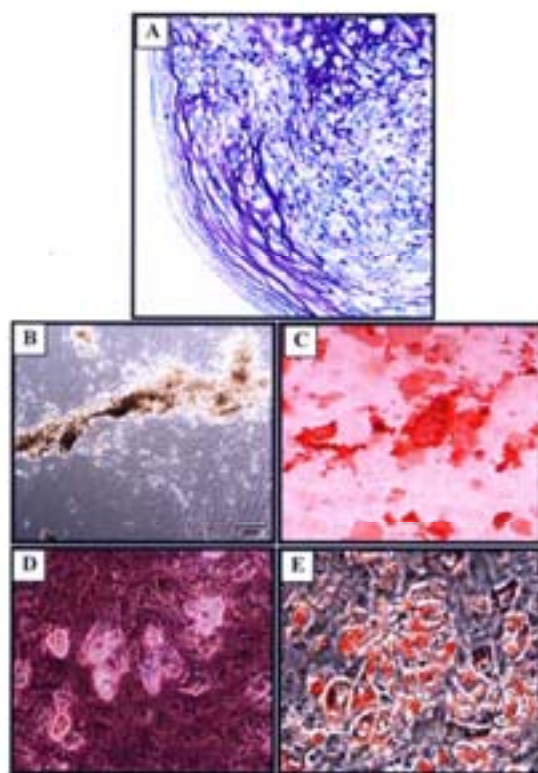
شکل ۵. آنالیز مولکولی بیان ژن‌های اختصاصی در تمایز به غضروف استخوان و چربی با روش RT-PCR.

بحث

در تحقیق حاضر با انجام چندین پاساژ سلولی، حالت تمایز یافتگی در کندروسیت‌های مفصلی موش صحرایی زودده شد و سپس پتانسیل تمایز مجدد آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که چنین سلول‌هایی قادرند با فراهم شدن شرایط لازم علاوه بر رده سلول‌های غضروفی به رده‌های استخوانی و چربی نیز متمایز شوند. این مطالعه از این نظر اهمیت دارد که نشان‌دهنده منبع دیگری از سلول‌های چندان‌توان است که از سلول‌های تمایز یافته غضروف مفصلی در شرایط کشت طولانی مدت حاصل شده است. چنین سلول‌هایی، کاندید مناسبی برای استراتژی‌های سلول درمانی و مهندسی بافت با هدف بازسازی ضایعات وسیع بافتی محسوب می‌شوند.

البته مطالعه حاضر اولین گزارش در این زمینه نیست. در تحقیقی باربرو (Barbero) و همکاران در سال ۲۰۰۳ گزارش

شدند که حاصل آن قرمز شدن توده‌های مذکور بود (شکل ۲B). براساس نتایج RT-PCR در کشت تمایز، ژن‌های ویژه رده استخوانی شامل استئوکلکسین، آلکالین فسفاتاز (ALP: Alkaline Phosphatase) و کلاژن نوع I بیان شده بود. **تمایز به چربی:** اولین قطرات چربی ۳ روز پس از آغاز کشت در برخی از سلول‌ها مشاهده شد. این قطرات به تدریج در سایر سلول‌ها نیز ظاهر شد، به طوری که در پایان دوره تمایز (روز ۲۱)، اغلب سلول‌ها حاوی قطرات چربی بودند (شکل ۳A). قطرات چربی، به دنبال رنگ آمیزی اوایل رد قرمز رنگ شدند (شکل ۳B)، نتایج RT-PCR بیانگر بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های چربی شامل PPAR alpha، LPL و PPAR gamma بود.



شکل ۴. A: تمایز به غضروف سلول‌های حاصل از پاساژ ۱۰. ماده زمینه با رنگ تولوئیدین بلو به رنگ بنفش در آمده است. B: تمایز به استخوان سلول‌های تمایز زدایی شده، بدون رنگ آمیزی. C: و با رنگ آمیزی آلیزارین رد. D: کشت تمایز به چربی بدون رنگ آمیزی و E: با رنگ آمیزی اوایل رد.

کردند که چنین خاصیتی را سلول‌های کندروسیت مفصل انسانی دارند [۲۱]. این محققین با کشت کندروسیت‌های انسانی در حضور فاکتورهای که سبب از بین رفتن تمایز یافتگی سلول می‌شوند، اقدام به بررسی پتانسیل تمایزی سلول‌های حاصل کردند. در این مطالعه، تمایززدایی کندروسیت‌ها بررسی نشد. بنابراین این نکته که کندروسیت‌های مورد بررسی آن‌ها کاملاً تمایز زدایی شده بودند یا نه معلوم نیست. در تحقیق حاضر با کشت طولانی مدت کندروسیت‌های مفصلی موش صحرایی و بررسی بیان ژنی آن‌ها در طول کشت، از عدم بیان ژن‌های غضروبی شامل آگریکان و کلاژن II اطمینان حاصل شد. براساس این مطالعات که با روش Real time انجام شد مشخص شد که پروسه تمایززدایی به تدریج در کشت طولانی مدت انجام می‌شود به طوری که در پاساژ ۱۰ بیان ژن آگریکان و در پاساژ ۶ بیان ژن کلاژن II کاملاً محو می‌شود.

در دوران جنینی در هنگام تشکیل اندام حرکتی از limb bud، ابتدا یک تراکم سلولی از سلول‌های مزانشیمی در محور مرکزی اندام، جایی که استخوان‌های آتی تشکیل می‌شود، اتفاق می‌افتد و سپس در این تراکم تمایز غضروف به وقوع می‌پیوندد [۲۲]. علاوه بر سیگنال‌های محیطی، فاکتورهای تمایز و تراکم سلولی نیز پیش شرط تمایز به غضروف در *in vivo* است [۲۳]. در کشت تک لایه، نظیر آنچه که در مطالعه حاضر اتفاق افتاد، نه تراکم سلولی فراهم می‌شود و نه سیگنال‌های مشابه با محیط بدن وجود دارد، در نتیجه کندروسیت، حالت تمایز یافتگی خود را از دست می‌دهد. با توجه به این که سلول‌های تمایززدایی شده قادر بودند، علاوه بر رده غضروبی به دو رده اسکلتی دیگر (استخوان و چربی) تمایز یابند، از این نظر با سلول‌های بنیادی مزانشیمی برابری داشتند. به عبارت دیگر به نظر می‌رسد کندروسیت‌ها در شرایط کشت طولانی مدت تحقیق

حاضر، به سلول بنیادی مزانشیمی تبدیل شده اند. سلول بنیادی مزانشیمی نوعی سلول بنیادی بزرگسال محسوب می‌شود که برای اولین بار توسط فردنشتاین (Fridenstein) و همکاران از نمونه‌های مغز استخوان استخراج و توصیف شد [۲۴]. بعدها، محققین توانستند از بافت‌های دیگر نظیر چربی، کبد، مایع آمنیوتیک، استخوان تراکولار، پرده سینوئال، عضله اسکلتی و دندان شیری و خون بند ناف نیز سلول بنیادی مزانشیمی استخراج نمایند [۲۳-۲۵]. حال سئوالی که مطرح است و تا به حال جواب قطعی برای آن ارائه نشده است، ماهیت سلول بنیادی است. آیا این سلول که با روش‌های کشت سلولی از بافت‌ها جدا شده و تکثیر می‌شود، به طور واقعی در بافت‌ها وجود دارد؟ احتمال دیگر این است که سلول بنیادی مزانشیمی استخراج شده از بافت، در اصل سلول‌های اصلی بافت بوده که تحت شرایط کشت به سلول بنیادی مبدل شده است. نتایج مطالعه حاضر، امکان وقوع چنین پدیده‌ای را تأیید می‌کند.

در تحقیق حاضر مورفولوژی کندروسیت‌ها طی پاساژها با روش SEM مطالعه شد. بر اساس تصاویر مشخص شد که سلول‌ها در پاساژهای اول پهن هستند و به تدریج به مورفولوژی فیبروبلاستی تغییر شکل می‌دهند. این در حالیست که سلول‌های بنیادی مزانشیمی نیز به صورت سلول‌های شبه فیبروبلاستی تعریف شده‌اند [۲۴، ۳۴]. با در نظر گرفتن این نکته و نیز با به یاد آوردن توان تمایز به رده‌های اسکلتی سلول‌های مطالعه حاضر، شباهت این سلول‌ها به سلول‌های بنیادی مزانشیمی بیشتر آشکار می‌شود.

روی هم رفته می‌توان گفت که کندروسیت‌های مفصلی به تدریج طی ۱۰ پاساژ حالت تمایز یافتگی خود را از دست داده و به یک سلول چند توان شبیه سلول بنیادی مزانشیمی تبدیل می‌شوند که قادرند با فراهم شدن شرایط لازم، به سه رده اسکلتی استخوان، غضروف و چربی متمایز شوند.

References

1. **Treadwell BV, Mankin HJ.** The synthetic processes of articular cartilage. *Clin Orthop Relat Res* 1986; 213: 50-61.
2. **Yang IH, Kim SH, Kim YH, Sun HJ, Kim SJ, Lee JW.** Comparison of phenotypic characterization between "alginate bead" and "pellet" culture systems as hondrogenic differentiation models for human mesenchymal stem cells. *Yonsei Med J* 2004; 45(5): 891-900
3. **Johnson L.** Arthroscopic abrasion arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 2001; 391: S306-17.
4. **Sledge SL.** Microfracture techniques in the treatment of osteochondral injuries. *Clin Sports Med* 2001; 20(2): 365-77.
5. **Yamashita F, Sakakida K, Suzu F, Takai S.** The transplantation of an autogeneic osteochondral fragment for osteochondritis dissecans of the knee. *Clin Orthop Relat Res* 1985; 201: 43-50.
6. **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.
7. **Brittberg M, Tallheden T, Sjögren-Jansson B, Lindahl A, Peterson L.** Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update. *Clin Orthop Relat Res* 2001. 337-48.
8. **Holtzer H, Abbott J, Lash J, Holtzer S.** The loss of phenotypic traits by differentiated cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci* 1960; 46(12): 1533-42.
9. **von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, Müller P.** Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* 1977; 267(5611): 531-2.
10. **Domm C, Fay J, Schünke M, Kurz B.** Redifferentiation of dedifferentiated joint cartilage cells in alginate culture. Effect of intermittent hydrostatic pressure and low oxygen partial pressure. *Orthopade* 2000; 29(2): 91-9.
11. **Guo JF, Jourdian GW, MacCallum DK.** Culture and growth characteristics of chondrocytes encapsulated in alginate beads. *Connect Tissue Res* 1989; 19(2-4): 277-97.
12. **Wakitani S, Goto T, Young RG, Mansour JM, Goldberg VM, Caplan AI.** Repair of large full-thickness articular cartilage defects with allograft articular chondrocytes embedded in a collagen gel. *Tissue Eng* 1998; 4(4): 429-44.
13. **Lindahl A, Brittberg M, Peterson L.** Health economics benefits following autologous chondrocyte transplantation for patients with focal chondral lesions of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2001; 6: 358-63.
14. **Rodriguez AM, Vacanti CA.** Tissue engineering of cartilage. In: Patrick Jr CW, Mikos AG, McIntire LV, editors. *Frontiers in tissue engineering* Elsevier Science, 1998, pp 400-41.
15. **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.
16. **Benya PD, Nimni ME.** The stability of the collagen phenotype during stimulated collagen, glycosaminoglycan, and DNA synthesis by articular cartilage organ cultures. *Arch. Biochem Biophys* 1979; 192(2): 327-35.
17. **Mandl EW, Jahr H, Koevoet JL, van Leeuwen JP, Weinans H, Verhaar JA, van Osch GJ.** Fibroblast growth factor-2 in serum-free medium is a potent mitogen and reduces dedifferentiation of human ear chondrocytes in monolayer culture. *Matrix Biol* 2004; 23(4): 231-41.

18. **Imabayashi H, Mori T, Gojo S, Kiyono T, Sugiyama T, Irie R, Isogai T, Hata J, Toyama Y, Umezawa A.** Redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes and chondrogenesis of human bone marrow stromal cells via chondrosphere formation with expression profiling by large-scale cDNA analysis. *Exp Cell Res* 2003; 288(1): 35-50.
19. **Malda J, van Blitterswijk CA, van Geffen M, Martens DE, Tramper J, Riesle J.** Low oxygen tension stimulates the redifferentiation of dedifferentiated adult human nasal chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12(4): 306-13.
20. **Goessler UR, Bieback K, Bugert P, Heller T, Sadick H, Hormann K, Riedel F.** In vitro analysis of integrin expression during chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and chondrocytes upon dedifferentiation in cell culture. *Int J Mol Med* 2006; 17(2): 301-7.
21. **Barbero A, Ploegert S, Heberer M, Martin I.** Plasticity of clonal populations of dedifferentiated adult human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2003 May; 48(5): 1315-25.
22. **Sekiya I, Vuoristo J.T, Larson BL, Prockop D.J.** In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(7): 4397-402.
23. **Imabayashi H, Mori T, Gojo S, Kiyono T, Sugiyama T, Irie R, Isogai T, Hata J, Toyama Y, Umezawa A.** Redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes and chondrogenesis of human bone marrow stromal cells via chondrosphere formation with expression profiling by large-scale cDNA analysis. *Exp Cell Res* 2003; 288(1): 35-50.
24. **Friedenstein AJ, Chailakhajan RK, Lalykina KS.** The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970; 3: 393-403.
25. **Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang G, Futrell JW, Katz AJ, et al.** Multilineage cells from human adipose tissue: Implication for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7: 211-28.
26. **Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM.** Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver and bone marrow. *Blood* 2001; 98: 2396-402.
27. **Pieterella S, Anker SA, Kleijburg-van der keur C, Noort WA, Class FH, Willemze R.** Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 2003; 102: 1548-9.
28. **Erices A, Conget P, Minguell JJ.** Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000; 109: 235-42.
29. **Noth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS.** Multilineage mesenchymal differentiation of human trabecular bone-derived cells. *J Ortho Res* 2002; 20: 1060-9.
30. **Wickham MQ, Erickson GR, Gimple JM, Vail TP, Guilak F.** Multipotent stromal cells derived from infrapatellar fat pad of knee. *Clin Ortho* 2003; 412: 196-212.
31. **Jankowsk RJ, Deasy BM, Huard J.** Muscle-derived stem cells. *Gene Ther* 2002; 9: 642-7.
32. **Miura M, Grothos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robery PG.** Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceed Nation Acad Sci USA* 2003; 100: 5807-12.
33. **De bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP.** Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *J Cell Biol* 2001; 44: 1928- 42.
34. **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.