

مطالعه پتانسیل تمایز به غضروف سلولهای فیبروبلاستی جدا شده از مغز

استخوان موش NMRI

✉ محمدرضا باغبان اسلامی نژاد *Ph.D.، لیلاتی یار *M.Sc.، احمد قارزی *Ph.D.

* گروه سلولهای بنیادی، پژوهشکده رویان

* گروه بیولوژی تکوینی دانشگاه خرمآباد

وصول: تیرماه ۸۵، پذیرش: شهریورماه ۸۵

چکیده

هدف: جداسازی سلولهای مزانشیمی از مغز استخوان موش NMRI و بررسی پتانسیل تمایزی آنها به غضروف در محیط آزمایشگاهی. **مواد و روشها:** موشهای NMRI با سن تقریبی ۶-۴ هفته کشته شدند و سلولهای مغز استخوان آنها به تعداد ۵۰۰ سلول در هر خانه از ظروف ۶ خانه کشت شد. با انجام دو پاساژ متوالی، جمعیت خالصی از سلولهای فیبروبلاستی ظاهر شد. به منظور تمایز به غضروف از دو روش (Micromass culture) و کشت تک لایه‌ای (Monolayer) استفاده شد. در روش اول، ۲۰۰۰۰۰ سلول پاساژ دوم با انجام سانتریفوژ متراکم شد و به مدت ۲۱ روز در محیط کندروژنیک قرار گرفت. در روش monolayer سلولهای پاساژ دوم در ظرف ۲۴ خانه کشت شد و پس از پرشدن کف ظرف، محیط تمایز کندروژنیک جایگزین محیط کشت سلول شد. برای ارزیابی تمایز از روشهای رنگ آمیزی اختصاصی تولوئیدن بلو، آلسین بلو و روش Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) استفاده شد. در مطالعه حاضر ماهیت مزانشیمی سلولهای جدا شده با روش تمایز به استخوان و چربی بررسی شد.

یافته‌ها: در روزهای اول، ظرف کشت حاوی سلولهای منفرد با مورفولوژی اغلب دوکی بود. دو هفته پس از آغاز کشت، سلولهای دوکی تکثیر یافته ایجاد کلنی کردند. با انجام پاساژ، کلنیهای سلولهای دوکی جدا شدند و به ظرف کشت جدید منتقل شدند. دو هفته پس از پاساژ اول، پاساژ دوم انجام گرفت که حاصل آن جمعیت نسبتاً یکنواختی از سلولهای دوکی فیبروبلاستی بود. در روش Monolayer تمایز اتفاق نیفتاد در حالی که با روش Micromass سلولهای جدا شده به غضروف تمایز یافتند. همچنین نتایج RT-PCR نشان داد که mRNA کلژن تایپ II، X و آگریکان به میزان زیادی در سلولهای تمایز یافته تولید شده است. رنگ آمیزی اختصاصی تولوئیدن بلو و آلسین بلو نمایانگر متاکروماتیک بودن ماتریکس ترشحی بود. سلولهای جدا شده در مطالعه حاضر به راحتی به استخوان و چربی تمایز یافتند که نشانگر ماهیت مزانشیمی آنها بود. نتیجه گیری: سلولهای فیبروبلاستی جدا شده با روش کشت در تراکم پایین پتانسیل تمایز به غضروف را دارند. با توجه به اینکه این سلولها به استخوان و چربی نیز تمایز یافتند، ماهیت مزانشیمی دارند.

کلیدواژه‌ها: سلول فیبروبلاستی، سلول مزانشیمی، تمایز به غضروف، استخوان و چربی، موش NMRI و Balb/c

✉ آدرس مکاتبه: تهران، پژوهشکده رویان، گروه سلولهای بنیادی، صندوق پستی:

E-mail: bagesla@yahoo.com

۱۳۹۵-۴۶۴۴

مقدمه

درمان ضایعات بافت غضروف، بدلیل عدم توان بازسازی آن، از مشکلات عمده جراحی ارتوپدیک محسوب می‌شود. بافت غضروف با وجودی که از لحاظ ساختاری به دلیل داشتن ماده زمینه‌ای ویژه به عنوان یک بافت محکم و در عین حال با انعطاف تلقی می‌شود، از لحاظ عدم توان ترمیم در مواقع آسیب، بافت ضعیفی است [۱]. استفاده از متدهای جراحی چون پیوند آلوگرافت، خیلی موفق نبوده، زیرا این تکنیکها قادر به برگرداندن خصوصیات کامل بافت غضروف هیالین نیستند [۲ و ۳]. همچنین پیوند آلوگرافت باعث فعال شدن سیستم ایمنی می‌شود [۴]. از طرفی سلولهای مورد استفاده در پیوند نوعی سلول بالغ محسوب شده و دو مشکل اساسی دارند اولاً براحتی تکثیر نمی‌شوند ثانیاً بعد از چند پاساژ دچار تمایز زدایی شده و از بین می‌روند [۵].

بنابراین یافتن راهی مناسب برای درمان آسیبهای غضروفی از اهداف مهم پژوهشگران بوده و در این خصوص پتانسیل سلولهای بنیادی مزانشیمی (MSCs: Mesenchymal stem cells) در بازسازی ضایعات غضروفی مورد توجه قرار گرفته است [۶-۱۰]. این سلولها به عنوان یک منبع سلولی مناسب برای ترمیم بافت غضروف شناخته شده است [۱۱].

سلولهای بنیادی مزانشیمی جمعیتی از سلولهای چند توان (Multipotential) هستند که برای اولین بار از مغز استخوان افراد بالغ جدا شدند و از طریق توانایی شان در تمایز به سه نوع فنوتیپ استخوان، چربی و غضروف قابل شناسایی هستند [۱۲].

این سلولها توسط الکساندر فریند شتاین (Aleksander Friedenstein) شناسایی شد. تحقیقات وی دلایل قطعی فراهم آورد که مغز استخوان علاوه بر پیش سازهای هماتوپوئیتیک، حاوی جمعیتی از سلولهای پیش ساز فیبروبلاستی کلونوژنیک^۱ نیز است [۱۳-۱۴]. سلولهای مزانشیمی در محیط *in*

vivo به صورت سلولهای در حال استراحت، خاموش تعریف می‌شوند که پس از کشت در *in vitro* تحریک شده و می‌توانند وارد چرخه سلولی شده و کلنیهای را ایجاد کنند که با بخشهای کوچکی از استخوان و غضروف مشابهت دارند [۱۶-۱۵].

ولی همچنان با وجود شناخت اهمیت سلولهای مزانشیمی در درمان ضایعات غضروفی و به طور کلی سلول درمانی هنوز مشکلات زیادی در بکارگیری این سلولها در *in vivo* وجود دارد. اولین قدم در به کارگیری این سلولها، جداسازی آنها از مغز استخوان است که این امر در مورد موش با وجودی که به عنوان یک مدل ارزشمند فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک برای بیماریهای انسان محسوب می‌شود، جداسازی سلول مزانشیمی با مشکلاتی از قبیل آلودگی آنها به سلولهای خون ساز همراه است. تا کنون چندین روش برای جدا سازی این سلولها از مغز استخوان عنوان شده [۱۷-۱۹] که برخی از آنها کارایی لازم را نداشته و برخی دیگر قابل تکرار در آزمایشگاههای دیگر نبوده است.

در مطالعه حاضر سلولهای فیبروبلاستی - مزانشیمی از مغز استخوان موش NMRI با روش نسبتاً ساده جدا سازی و تخلیص شده است و پتانسیل آنها در تمایز به غضروف مورد بررسی شده است. برای این منظور، از دو روش Micro mass Culture و کشت Monolayer استفاده شده است.

مواد و روشها

جداسازی، تکثیر و انجماد سلولهای مزانشیمی

ده سر موش NMRI نر به سن تقریبی ۶-۴ هفته با روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی (servical dislocation) کشته شدند و پس از ضد عفونی با الکل ۷۰ درصد و در شرایط کاملاً استریل، استخوانهای ران ودرشت نی جدا شد. بافت نرم و عضلات اطراف استخوانها به طور کامل پاک شد و درلوله ۱۵ میلی لیتری محتوی محیط DMEM (Dubleco's modified eagles medium Gibco;Germany) (۱۵ درصد سرم (Fetal Bovine Serum ; Gibco ,Germany) ۱۰۰ واحد بین المللی

1-Colonigenic

تحت ۱۲۰۰ g به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس محیط رویی تخلیه شده و محیط کندروژنیک شامل محیط DMEM حاوی ۱۰ نانوگرم فاکتور رشد TGF-B3 (Transforming Growth Factor B3)، ۱۰ نانوگرم BMP-6 (Bone Morphogenic Protection)، ۵۰ میلی گرم ITS+premix، ۵/۳۵ میلی گرم linoleic acid و ۱/۲۵ میلی گرم BSA و ۱ درصد سرم گاوی بر روی پلیت سلولی در ته لوله، اضافه شد. محیط تمایز هر ۳-۴ روز یکبار به مدت ۳ هفته تعویض شد. در برخی از نمونه‌ها محیط ذکر شده فاقد سرم گاوی بود.

رنگ آمیزی اختصاصی تولوئیدین بلو و آلسین بلو: برای ارزیابی تمایز به غضروف از دو روش رنگ آمیزی اختصاصی تولوئیدین بلو و آلسین بلو استفاده شد. نمونه‌ها پس از تثبیت با فرمالین ۱۰ درصد، آبگیری با الکل و شفاف سازی با گزلیل در پارافین قالب گرفته شدند و برشهای ۵ میکرومتری از آنها تهیه شد. به منظور رنگ آمیزی، رنگ تولوئیدین بلو به مدت ۳۰ ثانیه در دمای اتاق به مقاطع بافتی اضافه شد و در انتها رنگ اضافی با آب مقطر شسته شد. همچنین از رنگ اختصاصی آلسین بلو به این ترتیب استفاده شد که رنگ آلسین بلو به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بر روی سلولها قرار گرفت و در پایان این مدت رنگ اضافی به کمک HCl ۰/۱ درصد شسته شد. برشهای رنگ شده با استفاده از میکروسکوپ نوری مشاهده شدند.

RT-PCR: در روش RT-PCR پس از لیز نمودن سلولها به کمک محلول (Cinagen Inc) RNAase X و استخراج RNA سلولی، از روی RNA حاصل cDNA در حجم بالا ساخته شده و سپس PCR در حجم ۲۵ ماکرولیتر با dNTPs به حجم ۱۰ میکرو لیتر و آنزیم Taq DNA polymerase به حجم ۲/۵ میکرو لیتر و ۱۰۰ پیکومول از پرایمرهای ژنهای اختصاصی بافت غضروف که در جدول زیر نشان داده شده است، انجام شد.

آنتی بیوتیک پنی سلین و ۱۰۰ واحد بین المللی استروپتومایسین (Gibco; Germany) قرار داده شده و به زیر هود استریل منتقل گردید. به کمک قیچی استریل دو انتهای استخوانها قطع و مغز استخوان با استفاده از یک سرنگ و سر سوزن شماره ۲۲ حاوی محیط DMEM به روش flashing در یک لوله ۱۵ میلی لیتری تخلیه شد. سلولهای به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه تحت ۱۲۰۰g سانتریفوژ شد. پس از آن، محیط رویی تخلیه شد و پلیت (plate) سلولی تشکیل شده در ۱ میلی لیتر محیط DMEM تازه، معلق شد و بوسیله فیلتر مش ۰/۲ ماکرو لیتر فیلتر شد. در این مرحله سلولهای حاصل از هر استخوان دراز به کمک لام نئوبار مورد شمارش سلولی قرار گرفت و تعداد ۵۰۰ سلول در هر یک از خانه‌های ظروف کشت ۶ چاهکی کشت شد. سپس ظرف حاوی سلول به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ CO2 منتقل گردید. بعد از ۲ روز محیط رویی خارج گردید و محیط DMEM تازه اضافه گردید. 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. برای انجماد از ترکیب ۳۰٪ DMSO (Dimethyl Sulfoxide: Sigma, USA) و ۶۵٪ DMEM استفاده شد. هر فلاسک ۲۵ سانتی متری به ۵ ویال انجماد تقسیم شد.

تمایز به غضروف

به منظور تمایز به غضروف از دو روش Micromass culture و Monolayer استفاده شد.

۱- روش Micromass culture: برای این منظور سلولهای منجمد شده پاساژ ۲ ذوب شد و پس از شمارش با لام نئوبار ۲۰۰۰۰۰ سلول به یک لوله ۱۵ میلی لیتری منتقل شد. سلولها

Collagen type II	Forward primer 5'-GGCTTAGGGCAGAGA GAG AAG G-3' Reverse primer 5'-TGGACAGTAGACGGAGGA AAGTC -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'

(Oil red) استفاده شد.

رنگ آمیزی آلیزارین رد (Alizarin red) : تک لایه سلولی با PBS+ 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 رنگ آمیزی شد. سلولها با آب مقطر شسته و خشک شد. رنگ آمیزی اوایل رد (Oil red) : سلولها به مدت یک ساعت در دمای اتاق با فرمالین ۴ درصد تثبیت شدند و سپس با الکل ۷۰ درصد شسته شده و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه با محلول اوایل رد (Oil red) ۰/۵ درصد در ۹۹ درصد الکل ایزوپروپانل، رنگ آمیزی شد و در انتها محلول رنگی خارج شد و سه بار با الکل ۷۰ درصد شستشو شد.

یافته‌ها

کشت سلول

در روزهای اول، ظرف کشت حاوی سلولهای منفرد با مورفولوژی اغلب دوکی بود. البته تعدادی سلول با مورفولوژی گرد و چند وجهی نیز در بین سلولهای دوکی مشاهده شد (شکل ۱A). یک هفته پس از آغاز کشت، سلولهای دوکی تکثیر یافته و ایجاد کلنی کردند و سلولهای گرد به صورت منفرد باقی ماندند (شکل ۱B). با انجام پاساژ سلولی، کلنیهای سلولهای دوکی جدا شدند و به ظرف کشت جدید منتقل شدند در حالی که سلولهای منفرد غیر دوکی به دلیل اتصال محکمتر به کف ظرف کشت با انجام پاساژ حذف شدند و در این زمان جمعیت سلولی تشکیل دهنده کشت، اغلب دوکی

۲- روش Monolayer : سلولهای حاصل از پاساژ دوم پس از ذوب، شمارش شد و حدود ۲۰۰۰۰۰ سلول در هر خانه ظرف کشت ۲۴ خانه ای کشت شد. یک هفته پس از آغاز کشت، زمانی که ظرف کشت پر از سلول شد، محیط کندروژنیک جایگزین محیط کشت شد. هر ۳-۴ روز یکبار و به مدت ۳ هفته محیط تمایز سلولی تعویض شد. در پایان تک لایه سلولی با روش گفته شده برای نمونه‌های کشت Micromass ارزیابی شد.

تمایز به استخوان و چربی

به منظور ارزیابی ماهیت مزانشیمی، سلولهای جدا شده در این تحقیق به استخوان و چربی تمایز داده شدند. به این ترتیب که سلولهای منجمد شده پاساژ ۲، پس از ذوب، در ظروف کشت ۶ چاهکی کشت شد. پنج روز پس از آغاز کشت محیط سلولها با محیط تمایز استخوان و چربی جایگزین شد. محیط تمایز به استخوان شامل محیط کشت DMEM حاوی ۵۰ میکرو گرم در میلی لیتر Ascorbic2- Phosphate (Sigma;USA) ۱۰، نانومولار Dexametasone (Sigma;USA) و ۱۰ میلی مولار B-Glycerol Phosphate (Sigma;USA) بود و محیط تمایز به چربی شامل DMEM حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر Ascorbic2- Phosphate (Sigma;USA)، ۱۰۰ نانومولار Dexametasone (Sigma;USA) و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر Indomethacine (Sigma;USA) بود. در پایان هفته سوم، تمایز سلولها ارزیابی شد، برای استخوان از رنگ آمیزی آلیزارین رد و چربی از رنگ اوایل رد

تمایز به غضروف

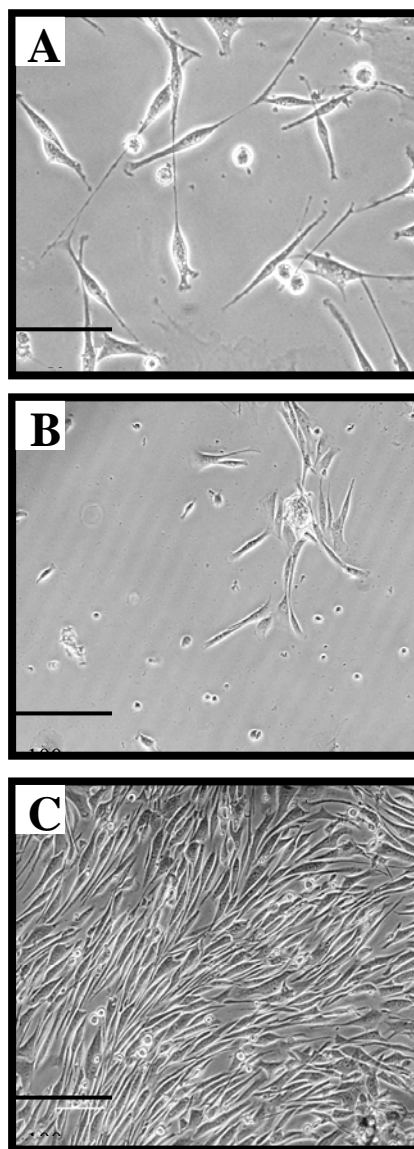
۱- روش Micromass: پلیت سلولی که به مدت ۲۱ روز در معرض محیط کندروژنیک قرار داشت، هر ۴-۳ روز یکبار با میکروسکوپ معکوس مشاهده شد. توده سلولی در محیط تمایز حاوی ۱ درصد سرم گاوی به خوبی رشد کرده و اندازه آن تقریباً دو برابر شد (شکل ۲A, B, C) در حالی که پلیت سلولی در محیط تمایز بدون سرم دچار مرگ سلولی شده و در نتیجه افزایش حجم پیدا نکرد و اندازه آن در مقایسه با ابتدای کشت کاهش یافته بود.

رنگ آمیزی تولوئیدن بلو و آلسین بلو: سلولهای کشت شده در محیط تمایز بدون سرم گاوی دچار مرگ سلولی شده و تمایز مشاهده نشد ولی سلولهای کشت شده در محیط تمایز حاوی یک درصد سرم گاوی، در طی ۲۱ روز به مقدار زیادی ماتریکس خارج سلولی ترشح کرده بود. در رنگ آمیزی تولوئیدن بلو، ماتریکس ترشح شده توسط سلولها به رنگ بنفش (شکل ۲D) و در رنگ آمیزی آلسین بلو به رنگ سبز متمایل به آبی در آمد که نمایانگر از متاکروماتیک بودن آن بود (شکل ۲E).

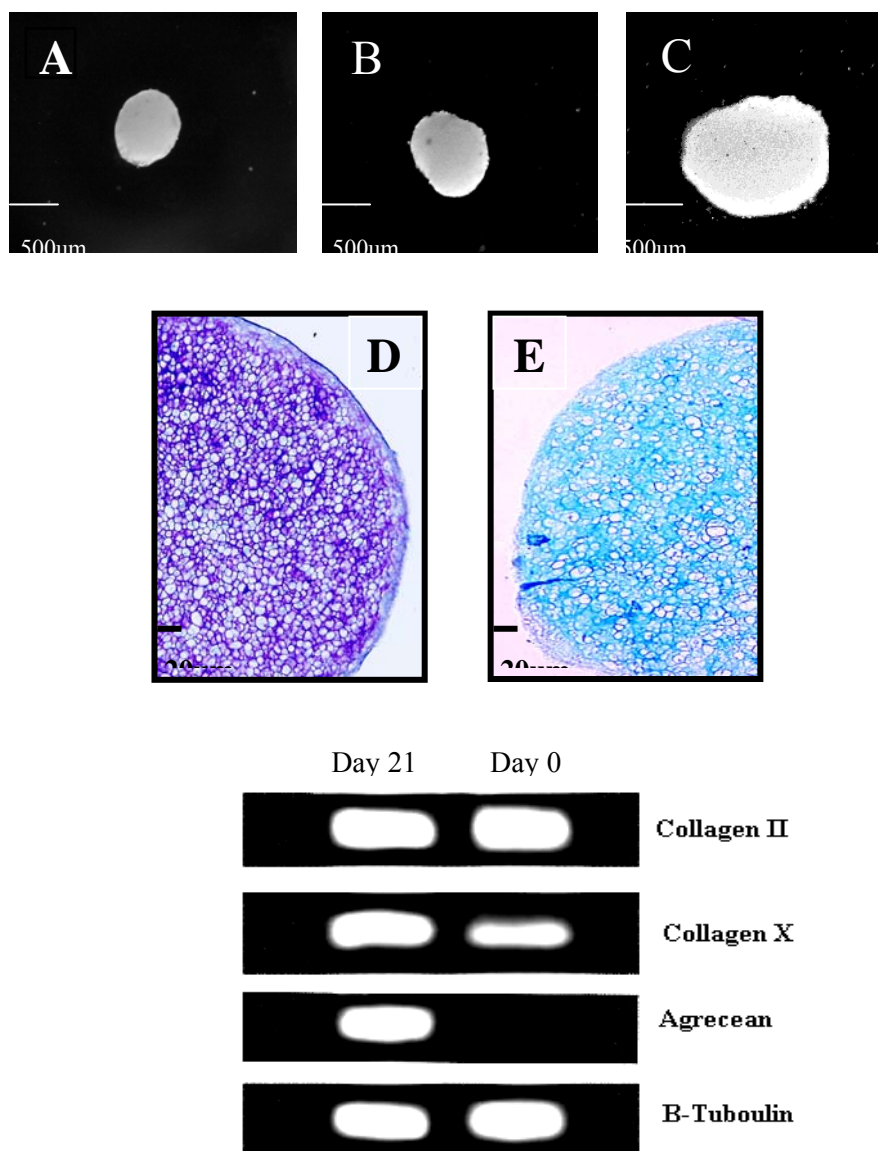
RT-PCR: با انجام RT-PCR مشخص شد که سلولهای مزانشیمی mRNA کلاژن تیپ II را به مقدار زیادی ترشح کرده و mRNA کلاژن تیپ X را نیز تا حدودی ترشح می کنند ولی اگریکان در این سلولها ترشح نشد. با استفاده از محیط تمایز کندروژنیک بیان ژن کلاژن X افزایش یافت و mRNA مولکول اگریکان به مقدار زیادی تولید شد (شکل ۲، ردیف پایین).

۲- روش Monolayer: در کشت تک لایه، سلولها به مرور از یکدیگر فاصله گرفتند. مورفولوژی این سلولها نیز تا حدودی تغییر کرده و از لحاظ اندازه کوچکتر شد. ارزیابیها در تحقیق حاضر ما نشان داد که در این سلولها تمایز اتفاق نیافتاده است.

شکل بودند. دو هفته پس از پاساژ اول پاساژ دوم انجام گرفت که حاصل آن جمعیت نسبتاً یکنواختی از سلولهای دوکی فیبروبلاستی بود. (شکل ۱C).



شکل ۱. کشت سلول به منظور جدا سازی سلول فیبروبلاستی. A: در کشت اولیه سلولها دوکی شکل و گرد بودند. B: سلولهای دوکی تکثیر یافتند و ایجاد کلونی کردند (بزرگنمایی $\times 100$). C: با انجام دو پاساژ متوالی جمعیت یکنواختی از سلولهای دوکی تشکیل شد (Bar=200 μ m).



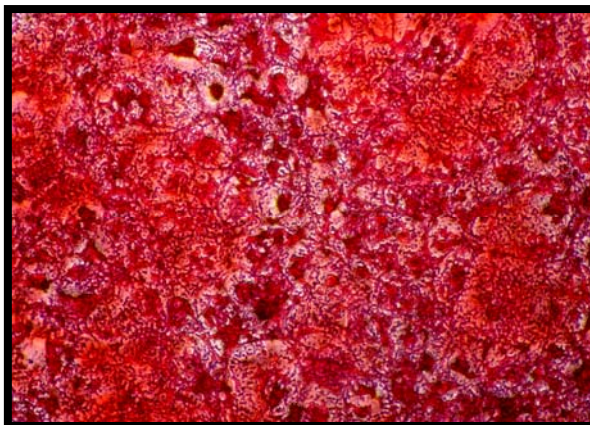
شکل ۲. A، B و C: تغییر اندازه پلیت سلولی در کشت Micromass culture. اندازه پلیت سلول به تدریج افزایش یافته است. A: آغاز تمایز، B: اواسط تمایز، C: پایان تمایز. میکروسکوپ معکوس، Bar=500µm. D و E: ماتریکس پلست سلولی در پایان تمایز با رنگ آمیزی تولوئیدین بلونفش (D) و با آلسین بلو سبز متمایل به آبی (E) شده است. F: در پایان تمایز ژنهای شاخص غضروف به مقدار زیادی بیان شده است. Bar=50µm.

پایان روز ۲۱ اکثریت سلولها حاوی قطرات چربی بودند که با اویل رد (Oil Red) به رنگ قرمز در آمد. در محیط استخوان ساز نیز سلولها به سلولهای استخوانی تمایز یافتند و مواد معدنی تولید شد؛ این قضیه در رنگ آمیزی آلیزارین رد (Alizarin Red) به خوبی مشهود بود (شکل ۳).

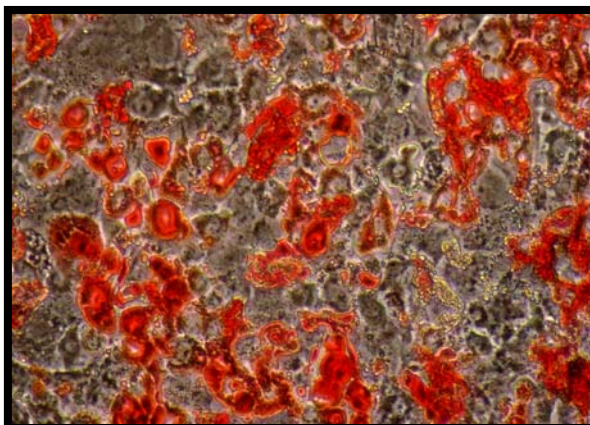
تمایز به استخوان و چربی

برای اطمینان از ماهیت مزانشیمی، از تست تمایز به استخوان و چربی به عنوان شاخص سلول مزانشیمی استفاده شد. در محیط چربی پس از ۲-۳ روز اولین قطرات چربی مشاهده شد و پس از یک هفته به سرعت تعداد آنها زیاد شد و در

(A) رنگ آمیزی آلیزارین رد
برای استخوان



(B) رنگ آمیزی اوایل رد
برای چربی



شکل ۳. تمایز سلولهای فیبروبلاستی پاساژ ۲ به استخوان A: (رنگ آمیزی آلیزارین رد) و چربی B: (رنگ آمیزی اوایل رد) که نشان دهنده ماهیت مزانشیمی آنهاست.

بحث

در تحقیق حاضر سلولهای فیبروبلاستی جدا شده از مغز استخوان موش به راحتی در یک سیستم کشت Micromass و حضور محیط مناسب کندروژنیک به بافت غضروف تمایز یافت که این مسئله در ارزیابیهای انجام شده کاملاً مشهود بود. در لابه لای سلولها ماتریکس متاکروماتیک تجمع یافته بود و در سطح مولکولی نیز mRNA مولکولهای شاخص غضروف تولید شده بود.

در مطالعه حاضر سلولهای فیبروبلاستی از مغز استخوان موش با روش نسبتاً ساده جدا شد و پتانسیل تمایز به غضروف آنها بررسی شد. با توجه به این که بافت غضروفی در مواقع آسیب و یا بیماری قدرت ترمیم ندارد [۲۰]، سلولهایی با توان تمایز به غضروف اهمیت زیادی دارند و به عنوان یک ابزار مهم و ایده ال در ترمیم ضایعات بافت غضروفی مطرح هستند.

در تمایز کندروژنیک بود. نتایج ما بیانگر از آن بود که وجود سرم گاوی به میزان ۱ درصد برای زنده ماندن سلولها و تمایز به غضروف ضروری است، به طوری که در محیطهای بدون سرم، سلولها از پلیت سلولی کنده شدند و به حالت شناور در محیط کشت قرار گرفتند و به تدریج پلیت سلولی انسجام خود را از دست داد و ناپدید شد. این یافته ما بر خلاف یافته سایر محققین است. اغلب محققین از محیطهای تمایز بدون سرم برای تمایز غضروف استفاده کرده اند. البته Ballock نقش مهم سرم را در تمایز کندروژنیک و ترشح ماتریکس خارج سلولی نیز عنوان کرده است [۲۳].

در مطالعه حاضر به منظور بررسی تمایز غضروفی از روش RT-PCR برای بررسی تولید mRNA برخی مارکرهای غضروفی از قبیل mRNA مربوط به کلاژن تایپ II، X و agreacan استفاده شد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سلولهای مزانشیمی در روز اول تمایز، mRNA مربوط به کلاژن II را تقریباً به همان اندازه پس از تمایز تولید کرده است ولی mRNA مربوط به کلاژن X در حد کم و پس از تمایز با شدت بیشتری تولید شد و mRNA مربوط به agreacan در سلولهای تمایز نیافته اصلاً تولید نشده و پس از تمایز با شدت زیادی تولید شد. البته این الگوی تولید ماکرومولکولهای غضروف تا حد زیادی منطقی به نظر می رسد. agreacan یکی از ماکرومولکولهای اصلی ماتریکس غضروف بوده و از گلیکوزآمینو گلیکانهای مختلف غضروفی ساخته شده است و کلاژن تایپ X نیز از مارکرهای اصلی کندروسیت‌های بالغ است [۲۴]. البته تولید mRNA کلاژن II در سلولهای تمایز نیافته نیز بایستی توضیح منطقی داشته باشد. دو توجیه برای این پدیده قابل تصور است: ۱- کلاژن II علاوه بر اینکه بعنوان مارکر غضروفی مطرح است می تواند به عنوان یکی از مارکرهای سلول مزانشیمی نیز مطرح باشد. ۲- تولید mRNA کلاژن II در روز اول تمایز نشانگر این است

یکی از ویژگیهای سلول مزانشیمی خاصیت تمایز به غضروف آنها در محیط کشت است ولی این تنها خاصیت آنها نبوده و صرفاً به دلیل داشتن این خاصیت نمی توان سلولی را سلول مزانشیمی در نظر گرفت. بر اساس تحقیقات پیشین سلول مزانشیمی، سلولی است که قادر است تحت شرایط مناسب به سه رده استخوانی، غضروفی و چربی تمایز یابد. در تحقیق حاضر سلولهای فیبروبلاستی جدا شده از مغز استخوان به استخوان و چربی نیز تمایز داده شدند و نتایج به ترتیب با روش آیزارین رد و اوایل رد بررسی شد. این دو روش نوعی رنگ آمیزی اختصاصی برای استخوان و چربی بوده و محققین پیشین نیز تنها با این روشها تمایز به استخوان و چربی را نشان داده اند [۲۱]. نتایج رنگ آمیزی ما نشان داد که سلولهای فیبروبلاستی جدا شده در مطالعه حاضر به راحتی قادرند در حضور محیط مناسب به استخوان و چربی تبدیل شوند و به همین دلیل این سلولها را می توان به عنوان سلول مزانشیمی در نظر گرفت.

در تحقیق حاضر به منظور تمایز سلولهای مزانشیمی به غضروف از دو روش کشت Monolayer و Micromass استفاده شد. در روش کشت Monolayer، تمایز اتفاق نیافتاد در حالی که در روش Micromass سلولهای مزانشیمی بخوبی به کندرو بلاست تمایز یافتند و تولید ماتریکس سلولی کردند. در واقع تمایز به روش Micromass از *in vivo* الهام گرفته شده است. در زمان تشکیل اندام حرکتی از limb bud، ابتدا یک تراکم سلولی در محور مرکزی اندام، جایی که استخوانهای اتمی تشکیل می شود، اتفاق می افتد و سپس در این تراکم تمایز غضروف به وقوع می پیوندد [۲۲]. در روش Micromass ابتدا یک تراکم سلولی با استفاده از سانتیفریژ ایجاد می شود و سپس با فراهم کردن ریز محیط (Microenvironment) مناسب سلولهای مزانشیمی به سلولهای غضروفی تبدیل می شوند. یکی دیگر از یافته های جالب تحقیق حاضر، نقش سرم گاوی

کشت (RPMI) بود [۲۱]. Sun و همکاران نیز به طور مشابه گزارش دادند که توانسته‌اند سلولهای فیبروبلاستی خالصی را با استفاده از کشت با تراکم بالا و استفاده از فاکتور رشد فیبروبلاستی جدا نمایند، این محققین قطعات استخوانی تیبیا و فمور را به محیط کشت سلولهای مزانشیمی اضافه کردند [۲۹]. سعی ما در استفاده از این دو روش برای جدا سازی سلول مزانشیمی از مغز استخوان موش NMRI بی نتیجه ماند و به همین دلیل روش حاضر برای جداسازی و تخلیص سلولی استفاده شد.

در مطالعه حاضر سلولهای مزانشیمی از مغز استخوان موش NMRI که نوعی موش برون‌گونه‌ای (outbred) است، جدا گردید و پتانسیل تمایز به غضروف آن مورد بررسی قرار گرفت. علیرغم گزارشهای متعدد در ارتباط با جدا سازی سلول مزانشیمی از موشهای [jnbred، ۲۱، ۲۷ و ۲۹]، تا به حال هیچ گزارشی در مورد جدا سازی و تخلیص سلول مزانشیمی از موش outbred ارائه نشده است. این در حالیست که موشهای outbred ارزان تر بوده و طول عمر زیادی دارند. همچنین این موشها نسبت به بیماریها مقاوم بوده و سرعت رشد بالایی دارند. مهمتر اینکه موشهای outbred لحاظ اندازه بزرگتر از inbred هستند. این ویژگیها باعث می‌شود که آنها برای تحقیقات مربوط به (stem cell therapy) مناسبتر از موشهای inbred باشند.

سلولهای فیبروبلاستی جدا شده با روش کشت با تراکم پایین، پتانسیل تمایز به غضروف را دارند. باتوجه به اینکه این سلولها به استخوان و چربی نیز تمایز یافتند، ماهیت مزانشیمی دارند.

تقدیر و تشکر

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

که این ماکرومولکول خیلی زود و در روزهای اول تمایز به غضروف شروع به تولید شدن در سطح mRNA می‌کند. با وجود اینکه موش به عنوان یک مدل تحقیقاتی اهمیت فراوانی دارد، جداسازی سلولهای مزانشیمی آن با مشکلاتی همراه است. تحقیقات نشان داده است که در کشت سلولهای مزانشیمی موش اغلب، سلولهایی با مورفولوژی ستاره ای و چند وجهی (احتمالاً ماکروفاژ، اندوتلیال و خونساز) رشد نموده و پس از مدت کوتاهی بر جمعیت سلولهای فیبروبلاستی (مزانشیمی) غالب شده و سطح کشت را فرا می‌گیرد [۲۵-۲۶]. برای حل این مشکل محققین روشهای متفاوتی را به کار برده‌اند. (Van Vlasselaer) و همکاران، با استفاده از دو مولکول سطح سلولی Sca-1 و Wheat germ agglutinin سلولهای دوکی با خاصیت تمایز به بافت استخوان و چربی جدا کردند ایراد این روش پایین بودن توان زیستی سلولهای جدا شده بود [۲۷]. مودرمن Modderman و همکاران سلولهای ماکروفاژ موجود در کشت را با به‌کارگیری تیوسیانات پتاسیم، حذف کردند [۱۹]. (Baddoo) و همکاران، برای حذف جمعیت سلولهای غیردوکی غیر مزانشیمی از روش تهی سازی ایمنی (mmunodepleting) استفاده کردند [۲۸]. ایراد این دو روش وارد کردن یک عامل خارجی (آنتی بادی یا مواد سایتوتوکسیک) به محیط کشت سلول است و چه بسا همین عوامل بر سلولهای مزانشیمی تأثیرات منفی داشته باشند. در مطالعه حاضر سلولهای مزانشیمی بدون دخالت عوامل خارجی و تنها با فراهم کردن شرایط کشت با تراکم پایین جدا شده است.

بیستر Peister و همکاران با یک روش نوین سلولهای مزانشیمی را از چند موش درون‌گونه‌ای (inbred) شامل Balb/c، FVB/N، BL/6، DAB1 جدا کردند. روش جدا سازی اغلب بر اساس کشت با تراکم بالا و جلوگیری از رشد سلولهای غیر مزانشیمی با استفاده از نوعی محیط

Reference

1. **Williams CG, Kim TK, Taboas A, Malik A, Manson P, Elisseeff J.** In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a photopolymerizing Tissue Eng 2003; 4:679-88.
2. **Freed ,LE. and Vunjak –Novakovic G.** Tissue engineering of cartilage. The Biomedical Engineering Handbook .CRC press 1995; 1778-96.
3. **Yang WD, Chen SJ, Mao TQ, Chen FL, lei DL, et al.** A study of injectable tissue-engineering autologous cartilage. Clin J Dent Res 2000; 3: 10-15.
4. **Ashton TD, Allen CR, Howlett CC, Eaglesom A, et al.** Hatottori M. Owen, Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. Clin Orthop 1980; 151: 294-307.
5. **Benya PD, Shaffer JD.** Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. Cell 1982 ; 30: 215-24.
6. **Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG.** Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. Stem Cells 2001; 19: 180-92.
7. **Crevensten G, Walsh AJ, Ananthakrishnan D, Page P, Wahba GM, Lotz JC, Berven S.** Intervertebral disc cell therapy for regeneration: mesenchymal stem cell implantation in rat intervertebral discs. Ann Biomed Eng 2004; 32: 430-434.
8. **Barry FP.** Mesenchymal stem cell therapy in joint disease. Novartis Found Symp 2003; 249: 86-96
9. **Ahn JI, Terry Canale S, Butler SD, Hasty KA.** Stem cell repair of physal cartilage. J Orthop Res 2004; 22: 1215-21.
10. **Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM.** Mesenchymal cell-based repair of large full thickness defects of articular cartilage. J Bone Joing Surg 1994; 76: 579-592.
11. **Bryant SJ, Nuttleman CR, Anseth KS.** The effect of cross linking density on cartilage formatin in photocross linkable hydrogels .Bio Sci Instram 1999; 35: 399-414.
12. **Salaszyk RM, Williams WA, Boskey A, Batorsky A, plopper GE.** Adhesion to vitronectin and collagene I promotes osteogenic differentiation of human Mesenchymal stem cells. J of Biomed and Biotech 2003; 1 : 24-34.
13. **Friedenstein AJ, Deriglasora UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA, et al.** Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as deteted by the in vitro colony assay methods. Exp Hematol 1974; 2: 83-92.
14. **Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV. Panansyuk AF, Keiliss - Borok IV.** Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hematopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation. *In vivo* Transplant 1974; 17: 331-40.

15. **Minguell SS, conget P, Erices A.** Biology and clinicad utilization of Mesenchymal progenitor cells. *Braz Med Biol Res* 2000; 33: 881-887.
16. **Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS.** The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pic bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970; 3: 393-403.
17. **Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ.** Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem* 1999; 72: 570-585.
18. **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: 395-406.
19. **Modderman WE, Vrijheid-Lammers T, Lowik CW, Nijweide PJ.** Removal of hematopoietic cells and macrophages from mouse bone marrow cultures: isolation of fibroblastlike stromal cells. *Exp Hematol* 1994; 22: 194-201.
20. **Bert JM.** Role of abrasion arthroplasty and debridement in the management of osteoarthritis of theknee. *Rheum Dis Clin North Am* 1993; 19: 725-39.
21. **Peister A, Mellad JA, Larsen LL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ.** Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood* 2004; 103: 1662-8.
22. **Gibson GJ, Flint MH.** Type X collagen synthesis by chick sternal cartilage and its relationship to endochondral development. *J Cell Biol* 1985; 101: 277-84.
23. **Ballock RT, Reddi AH.** Thyroxine is the serum factor that regulates morphogenesis of columnar cartilage from isolated chondrocytes in chemically defined medium. *J Cell Biol* 1994; 126: 1311-8.
24. **Homicz MR, Schumacher BL, Sah RL, Watson D.** Effects of serial expansion of septal chondrocytes on tissue-engineeredneocartilagecomposition. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 127: 398-408.
25. **Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP.** Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant* 1997; 6: 125-34.
26. **Devine SM, Bartholomew AM, Mahmud N, Nelson M, Patil S, Hardy W, et al.** Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Exp Hematol* 2001; 29: 244-55.
27. **Van Vlasselaer P, Falla N, Snoeck H, Mathieu E.** Characterization and purification of osteogenic cells from murine bone marrow by two-color cell sorting using anti-Sca-1 monoclonal antibody and wheat germ

- agglutinin. *Blood* 1994; 84: 753-63.
28. **Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, Gaupp D, Hughes C, Kopen GC, Phinney DG.** Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection *Cell Biochem* 2003; 15: 1235-49.
29. **Sun S, Guo Z, Xiao X, Liu B, Liu X, Tang P-H, MAO N.** Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable methods. *Stem Cells* 2003; 21: 527-35.