ORIGINAL ARTICLE

Comparing the Chondrogenesis Potential of Human Adipose-derived Stem Cells in Monolayer and Micromass Culture Systems

Elmira Ghaffari[1],
Fereshteh Talebpour Amiri[2],
Abbasali Karimpour Malekshah[3],
Mehri Mirhosseini[4],
Amir Esmaeelnejad moghaddam[5],
Ayob Barzegarnejad[6]

[1] MSc in Anatomcal Sciences, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Anatomcal Sciences, Molecular and Cell Biology Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Professor, Department of Anatomcal Sciences, Molecular and Cell Biology Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] Assistant Professor, Amol Faculty of Nursing and Midwifery, Molecular and Cell Biology Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[5] Associate Professor, Department of Anatomcal Sciences, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[6] Assistant Professor, Department of Orology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received September 25, 2015 Accepted December 6, 2015)

Abstract

Background and purpose: Articular cartilage disease is prevalent in all societies and in most cases the damaged cartilage would not repair. Conservative treatments are associated with many problems. So cell therapy is needed as a definite treatment. One of the best and most accessible sources of cells for this purpose is stem cells derived from adipose tissue which can be differentiated into chondrocytes by tissue engineering techniques. Cell culture method has a key role in chondrogenic differentiation. In this study, two different culture methods (monolayer and micromass) were compared.

Materials and methods: In this descriptive study, stem cells were isolated from subcutaneous abdominal adipose tissue. Adipose-derived stem cells (ADSCs) were cultured by micromass and monolayer culture methods in chondrogenic differentiation medium for 14 days. The morphology of cells was observed using an inverted microscope. Chondrogenic differentiation was evaluated by histology and immunocytochemistry methods.

Results: The results revealed that micromass culture system increased the protein synthesis of collagen II and deposition of glycosaminoglycan in extracellular matrix.

Conclusion: This study suggests that the micromass culture system is a suitable condition for chondrogenic differentiation compared to monolayer cell culture.

Keywords: Chondrogenesis, differentiation, mesenchymal stem cell, adipos etissue, micromass culture

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(133): 37-47 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۳۳ بهمن سال ۱۳۹۴ (۴۷-۳۷)

مقایسه پتانسیل کندروژنز سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی انسانی در دو سیستم کشت تک لایه و ریز توده

المیرا غفاری[۱]
فرشته طالب پور امیری[۲]
عباسعلی کریمپورملکشاه[۳]
مهری میر حسینی[۴]
امیر اسماعیل نژاد مقدم[۵]
ایوب برزگرنژاد[۶]

چکیده

سابقه و هدف: بیماری‌های غضروف مفصلی در همه‌ی جوامع شیوع فراوانی دارد و در اکثر موارد غضروف آسیب دیده قادر به ترمیم نمی‌باشد. روش‌های درمانی حمایتی با مشکلات زیادی همراه است. بنابراین سلول درمانی به‌عنوان درمان قطعی مورد نیاز می‌باشد. یکی از بهترین و در دسترس‌ترین منابع سلولی، سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی است که با تکنیک‌های مهندسی بافت به سلول‌های غضروفی تمایز می‌یابد. روش کشت سلول در تمایز غضروفی نقش کلیدی دارد. هدف از این مطالعه مقایسه پتانسیل کندروژنز سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی انسانی در دو سیستم کشت تک لایه و ریز توده بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی سلول‌های بنیادی از بافت چربی زیر جلدی جدا شدند. سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در دوروش کشت سه بعدی (ریز توده) و تک لایه‌ای با محیط تمایزی کندروژنیک برای ۱۴ روز کشت داده شدند. مورفولوژی سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس مشاهده شد. تمایز کندروژنیک با دو روش هیستولوژیکی و ایمونوسیتوشیمی ارزیابی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد در سیستم کشت ریز توده، میزان سنتز پروتئین کلاژن نوع ۲ بیش‌تر بود. همچنین گلیکوزآمینوگلیکان بیش‌تری در ماتریکس خارج سلولی ترشح شد.

استنتاج: با توجه به نتایج این مطالعه می‌توان گفت که سیستم کشت ریز توده (Micromass) شرایط مناسب‌تری برای تمایز کندروژنیک نسبت به کشت تک لایه‌ای (Monolayer) دارد.

واژه های کلیدی: کندروژنز، تمایز، سلول بنیادی مزانشیمی، بافت چربی، کشت ریز توده

مقدمه

استئوآرتریت فرایندی دژنراتیو می‌باشد که با از دست رفتن غضروف مفصلی همراه است(۱). استئوآرتریت زانو مهم‌ترین علت ناتوانی مزمن در سالمندان به شمار می‌رود(۲). از آن‌جایی‌که غضروف بافتی فاقد عروق

مولف مسئول: عباسعلی کریمپور: ساری- کیلومتر ۱۸ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی
E-mail: amalekshah@gmail.com mailto:n.iranifam@urmia.ac.ir
۱. کارشناس ارشد علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. استادیار، گروه علوم تشریحی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. استاد، گروه علوم تشریحی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. استادیار، دانشکده پرستاری و مامایی آمل، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۶. استادیار، گروه ارولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۴/۷/۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۴/۷/۱۸ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۹/۱۵

خونی می‌باشد، به‌طور طبیعی توانایی محدودی در ترمیم آسیب‌ها دارد(۳،۲). روش‌های درمانی برای معالجه‌ی آسیب‌های غضروفی شامل درمان‌های دارویی غیراستروئیدی، استروئیدی و هیالورونیک اسید(۴-۸) و درمان‌های جراحی از قبیل لاواژ مفاصل، آرتروسکوپی، جراحی ارتوپدی، ارتوپلاستی سایشی و پیوند غضروف می‌باشد. این روش‌ها اغلب به اندازه کافی موفقیت‌آمیز نبوده و با مشکلات زیادی همراهند(۱۰،۹).

مهندسی بافت غضروف با استفاده از سلول‌های بنیادی یک رویکرد امیدوارکننده برای بازسازی غضروف می‌باشد. در دهه‌ی گذشته درمان با سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته و پیشرفت‌های قابل توجهی به‌دست آمده(۱۲،۱۱)، ولی تحقیق در خصوص سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای بازسازی غضروف همچنان در مراحل اولیه می‌باشد(۱۱). سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌هایی چند استعدادی هستند که می‌توان آن‌ها را از مغز استخوان(۱۳)، بافت چربی(۱۴)، بندناف(۱۵)، جفت(۱۶)، پرده سینوویال(۱۷)، پریوستئوم استخوان(۱۸) و عضله(۱۹) جدا کرد. این سلول‌های چند ظرفیتی را می‌توان به انواع مختلفی از سلول‌ها از قبیل سلول‌های استخوانی، غضروفی، چربی، عضلانی و خونی تمایز داد(۱۳).

در گذشته مغز استخوان به عنوان اصلی‌ترین منشاء سلول‌های بنیادی برای مهندسی بافت محسوب می‌شد(۱۹)، اما امروزه منابع دیگری نیز مورد توجه قرار گرفتند. به عنوان مثال بافت چربی به علت داشتن ویژگی‌هایی از قبیل در دسترس بودن، فراوان بودن، کمتر تهاجمی بودن و نیز تراکم بالایی از سلول‌های بنیادی، منبع خوبی برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی محسوب شده و می‌تواند در مهندسی بافت غضروف مورد استفاده قرار گیرد(۲۲-۲۰). این سلول‌ها را می‌توان پس از جداسازی از بافت چربی، همانند سلول‌های استخراج شده از مغز استخوان در محیط آزمایشگاه (in vitro) کشت داد(۲۳). به علاوه براساس برخی گزارش‌ها سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی نسبت به سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان ظرفیت غضروف‌زایی بیش‌تری داشته و می‌توانند به رده‌های مختلف کندروژنیک تمایز یابند و در طی پاساژهای مختلف فنوتیپ آن‌ها حفظ می‌شود(۲۴).

ساده‌ترین نوع کشت سلولی کشت تک لایه‌ای (Monolayer) است که در آن سلول‌ها به کف ظرف چسبیده و رشد می‌نمایند. به طور معمول در این نوع کشت، علاوه بر سلول‌های اصلی مورد نظر، انواع مختلفی از سلول‌ها، مانند فیبروبلاست‌ها، وجود دارند که با انجام چندین پاساژ سلولی جمعیت سلولی خالص‌تر می‌شود. کشت تک لایه‌ای بیش‌تر با هدف تحقیقات اولیه صورت می‌گیرد(۲۵). اما در بسیاری از تحقیقات در زمینه‌ی تمایز غضروف، از روش کشت سه بعدی از قبیل ریز توده (Micromass) استفاده کرده‌اند. این نوع روش کشت بر اساس توان غضروف‌زایی سلول‌های مزانشیمی در دوران جنینی طراحی شده است.

مطالعات در زمینه‌ی چگونگی فرایند غضروف‌زایی در دوران جنینی نشان داده است که سلول‌های مزانشیمی در طی فرآیند تکامل جنینی به صورت توده‌ای متراکم تجمع یافته و تعامل بین سلولی به همراه دیگر فاکتورهای موثر سرانجام منجر به تشکیل غضروف می‌شوند(۲۷،۲۶). لذا سیستم کشت سه بعدی با هدف ایجاد محیط مناسب جهت کندروژنز طراحی شده است(۲۸).

در مطالعات قبلی پتانسیل کندروژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی در دو سیستم کشت سه بعدی از قبیل ریزتوده و Pellet با هم مقایسه شده بود و آن مطالعات بر این یافته تاکید داشتند که سیستم ریز توده شرایط مناسب‌تری را برای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های کندروبلاست فراهم می‌آورد(۲۹) در آن مطالعات منبع تهیه سلول های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان بوده است. از آنجا که تحقیقات نشان داده که بین رفتار بیولوژیک سلول‌های بنیادی و منبع آنها ارتباط وجود دارد(۳۱،۳۰)، در این مطالعه پتانسیل غضروف‌زایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی تهیه شده از بافت چربی در دو سیستم منولایر و ریز توده مورد مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش ها

تهیه نمونه چربی:

در این مطالعه تجربی نمونه‌های چربی از ناحیه‌ی زیرجلدی شکمی بیماران ۲۰تا ۳۵ سال که برای عمل فتق اینگواینال مراجعه کرده بودند، مطابق دستورالعمل کمیته اخلاق معاونت تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی مازندران و با رضایت آگاهانه از بیماران بستری در بیمارستان امام خمینی ساری تهیه شد. سپس نمونه چربی در داخل لوله فالکون حاوی PBS به آزمایشگاه کشت سلول بخش آناتومی دانشکده پزشکی منتقل شد. ۱۵ نمونه چربی از بیماران تهیه شد.

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی:

برای جداسازی سلول بنیادی مشتق از بافت چربی از روش هضم آنزیمی استفاده شد. نمونه چربی پس از سه بار شستشو در بافر PBS و پاک‌سازی خون و بافت اضافی، به قطعات چند میلی‌متری تقسیم گردید. سپس جهت هضم آنزیمی بافت به مدت ۴۰ دقیقه داخل لوله فالکون حاوی آنزیم کلاژناز نوع I (sigma) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و CO_2 ۵ درصد انکوبه شد. سپس آنزیم به وسیله DMEM (Bio Idea) حاوی FBS ۱۰ درصد خنثی شد. سوسپانسیون سلولی به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۲۵۰۰ سانتریفیوژ شده، مایع رویی تخلیه گردید. به پلاک سلولی محیط DMEM حاوی FBS (Gibco) ۱۰ درصد و پنی‌سیلین- استرپتومایسین (Gibco) ۱ درصد اضافه شده و سپس سوسپانسیون سلولی به فلاسک کشت سلول (T-25) منتقل شد. بعد از ۴۸ ساعت، سلول‌های غیرچسبنده از محیط خارج شدند. زمانی‌که تراکم سلول‌ها در کف فلاسک به ۸۰ درصد رسید، سلول‌ها پاساژ داده شدند. از سلول‌های پاساژ سوم یا چهارم برای تمایز کندروژنیک استفاده شد.

فلوسیتومتری:

به منظور تایید وجود سلول‌های بنیادی و برای شناسایی مارکر سطحی این سلول‌ها فلوسیتومتری انجام شد. برای این منظور دو مارکر سطحی اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی استرومایی شامل CD105 (Anti- Human CD105 (Endoglin) PE clone; SN6) و CD90 (clone: eBio5E10 (5E10)) و دو مارکر اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی هماتوپوئیتیک شامل CD31 Anti-Human CD31 ((PECAM-1) PE clone: WM-59 (WM59)) و CD45 (Anti-Human CD45 PE clone:2D1) بررسی شدند(۳۲).

از سلول‌های پاساژ ۴ بعد از شمارش توسط هموسایتومتر ، حدود ۲×۱۰^{۵} سلول به هر لوله فالکون کنترل و آزمایش منتقل شد. سپس به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۲۵۰۰ سانتریفیوژ شدند و پس از دور ریختن مایع رویی، رسوب سلولی در BSA ۳ درصد حل شد و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ انکوبه شد. سپس به لوله‌های تست، آنتی‌بادی‌هایCD90, CD31, CD45 و CD105 کونژوگه شده با فیکواریترین (PE) اضافه شد. به لوله کنترل منفی نیز ایزوتیپ آنتی‌بادی علیه IgG1 کونژوگه شده با PE اضافه شد. نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شدند. سپس PBS به آن‌ها اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۲۵۰۰ سانتریفیوژ شدند. مایع رویی تخلیه و توده‌های سلولی نشان‌دار شده در ۲ میلی‌لیتر بافر PBS حل و توسط دستگاه فلوسیتومتری (BD) تجزیه و تحلیل شدند.

تمایز کندروژنیک:

۱- در روش کشت تک لایه (Monolayer) سلول‌ها بعد از تریپسینه و سانتریفیوژ، مایع رویی تخلیه شد. پلاک سلولی مجددا در محیط تمایزی غضروف (Invitrogen) با ترکیب حاوی پنی سیلین- استرپتومایسین ۱ درصد، ترانسفرین –سلنیوس –انسولین ۱ درصد، دگزامتازون ۱۰۷ مولار، آلبومین 50µg/ml ، آسکوربات ۲- فسفات ۵۰µg/ml، پروتئین مورفوژنتیک استخوانی ۵۰۰ng/ml، لینولئیک اسید ۵mg/ml سوسپانسیون شدند. تعداد $۲/۵\times۱۰^{۵}$ سلول در کف هر چاهک ۲۴ خانه به

صورت سوسپانسون پخش شد و محیط تمایزی هر ۳ روز تعویض گردید. برای گروه کنترل از محیط DMEM پایه استفاده شد.

۲- در روش کشت ریز توده(Micromass) سلول‌ها بعد از تریپسینه و سانتریفیوژ، در محیط تمایزی بسیار کم حل شدند تا غلظت سلول با تراکم بالا به‌دست آید. به‌طوری‌که هر قطره ۲۵ میکرولیتری آن حاوی $۲/۵\times۱۰^{۵}$ تعداد سلول باشد. با دقت یک قطره ۲۵ میکرولیتری در مرکز هر چاهک ۲۴ خانه قرار داده شد. بعد از ۲ ساعت انکوبه، محیط کشت تمایزی کندروژنیک به هر چاهک اضافه شد. کشت به مدت ۱۴ روز ادامه یافته و هر ۳ روز محیط تمایزی تعویض گردید. به چاهک‌های گروه کنترل به جای محیط کندروژنیک محیط DMEM پایه اضافه شد. برای هر گروه تحقیق ۸ بار آزمایش تکرار شد.

ارزیابی هیستولوژیکی:

۱۴ روز بعد از کشت، نمونه‌های ریز توده و تک لایه بعد از دو بار شستشو با بافر PBS به مدت ۲۰ دقیقه در پارافرمالدهید ۴ درصد فیکس شدند. بعد از شستشو با آب مقطر، رنگ تولوئیدن بلو به آن‌ها اضافه شد. نمونه‌ها سپس با میکروسکوپ نوری بررسی شدند.

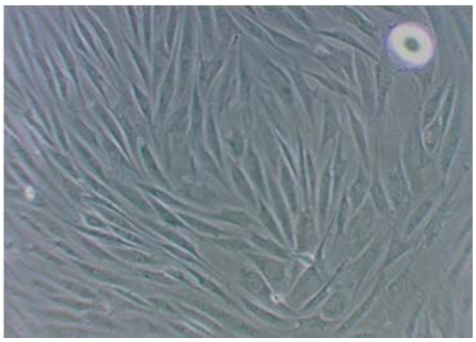
ارزیابی ایمونوسیتوشیمی:

جهت ارزیابی ایمونوسیتوشیمی ۱۴ روز بعد از کشت، نمونه‌ها با PBS شسته شدند. سپس با پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت ۲۰ دقیقه فیکس شدند. سپس نمونه‌ها دو بار با PBS شستشو داده شدند و به مدت ۱۵ دقیقه تحت تاثیر Triton X100 در دمای اتاق قرار گرفتند. بعد از شستشو با PBS، سرم بز ۱۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه اضافه گردید سپس آنتی‌بادی اولیه علیه کلاژن نوع ۲ Anti Collagen II Anti body (Abcam) به سلول‌ها اضافه شد و ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه انکوبه شد. پس از شستشو با PBS، سلول‌ها با آنتی‌بادی ثانویه بز علیه خرگوش Goat anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (Abcam) به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند. سوبسترای DAB به سلول‌ها اضافه شد و حضور کلاژن نوع ۲ با میکروسکوپ نوری (Nikon) مشاهده گردید.

یافته ها

جداسازی و کشت سلول:

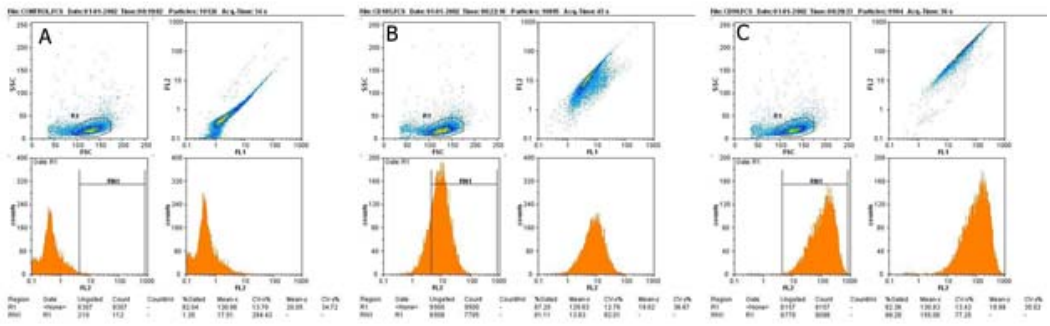
۲ روز بعد از کشت و تعویض اولین محیط کشت، سلول‌های دوکی شکل شبه فیبروبلاست با زوائد سیتوپلاسمی متصل به کف فلاسک دیده شدند. بعد از ۱۰ روز، تراکم سلول‌های کشت داده شده به ۸۰ درصد رسید و پاساژ داده شد (تصویر شماره ۱).



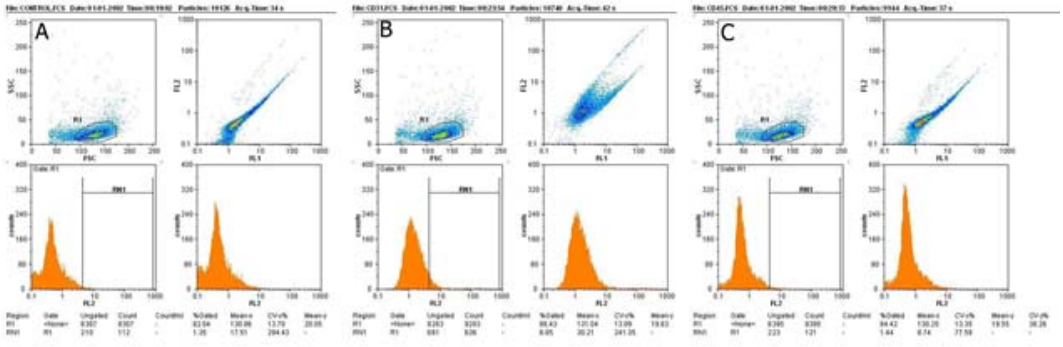
تصویر شماره ۱: سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از بافت چربی پیش از تمایز که دارای نمای دوکی شکل و شبه فیبروبلاستی می‌باشند. بزرگنمایی ۴۰×

روش فلوسیتومتری:

تجزیه وتحلیل مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی توسط روش فلوسیتومتری نشان داد که سلول‌های پاساژ ۴ چسبیده به کف فلاسک به‌طور میانگین ۸۱/۱ درصد از سلول‌ها مارکر CD105 و حدود ۹۹/۲ درصد مارکر CD90 (مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی استرومایی) را بیان کردند (تصویر شماره ۲). در حالی‌که همین سلول‌ها مارکرهای سلول هماتوپوئیتیک مانند CD31 و CD45 را به میزان کم‌تر از ۷ درصد بیان کردند (تصویر شماره۳).



تصویر شماره۲: بررسی فلوسایتومتری. منفی بودن مارکرهای سطحی استرومایی در گروه‌های CD 31 (B) و CD45 (C) نسبت به گروه کنترل (A)

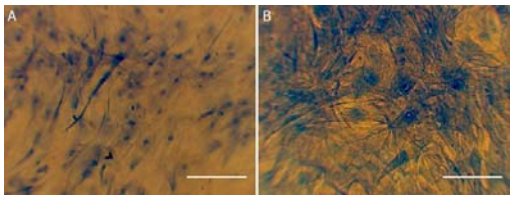


تصویر شماره۳: بررسی فلوسایتومتری. منفی بودن مارکرهای سطحی استرومایی در گروه‌های CD 31 (B) و CD45 (C) نسبت به گروه کنترل (A)

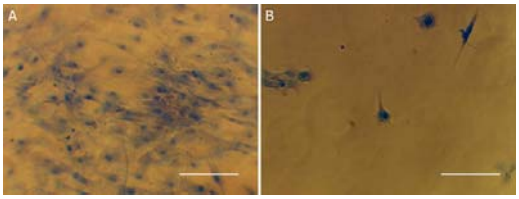
ارزیابی هیستولوژیکی سلول‌های کشت داده شده در محیط تمایزی:

سلول‌های مزانشیمی مشتق از بافت چربی پاساژ ۴ تریپسینه و از کف فلاسک جدا شدند. سلول‌ها در سیستم کشت ریز توده و تک لایه‌ای با محیط تمایزی کندروژنیک کشت داده شدند. ۱۴ روز بعد از شروع تمایز، ظرفیت غضروف‌زایی سلول‌های مزانشیمال از دیدگاه بافتی با رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو مشخص گردید.

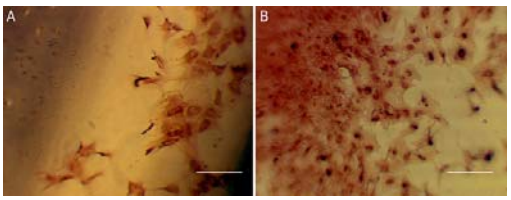
در گروه ریز توده سلول‌های کروی با هسته بازوفیل شناسایی گردید که مورفولوژی متفاوتی نسبت به گروه کنترل داشتند (تصویر شماره۴). علاوه بر این، ماتریکس خارج سلولی بازوفیل به میزان زیاد در اطراف سلول‌ها دیده شد، ولی میزان تمایز سلول‌ها و ترشح ماتریکس خارج سلولی در روش کشت تک لایه‌ای بسیار اندک بود (تصویر شماره ۵). برای نشان دادن وجود پروتئوگلیکان در ماتریکس خارج سلولی، از رنگ‌آمیزی متاکروماتیک تولوئیدن بلو استفاده شد. رنگ آبی نشانگر متاکروماتیک بودن و حضور ماتریکس غضروفی بود. برای تایید نتایج بدست آمده آنالیز ایمنوسیتوشیمی برای کلاژن نوع ۲ با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال انجام شد. تفاوت در میزان رنگ سلول‌هایی که با DAB باند شده بودند حاکی از آن بود که سلول‌های موجود در پلیت ریز توده میزان ماتریکس بیش‌تری را نسبت به سلول‌های تک لایه ترشح کرده بودند (تصویر شماره۶).



تصویر شماره۴: سلول¬های غضروفی حاصل از تمایز سلول¬های بنیادی مشتق از بافت چربی در سیستم کشت ریز توده در روز ۱۴ (B) و مقایسه آن با گروه کنترل (A). رنگ¬آمیزی تولوئیدن بلو. بزرگنمایی ۴۰ µ.Bar=20



تصویر شماره۵: سلول¬های غضروفی حاصل از تمایز سلول¬های بنیادی مشتق از بافت چربی در کشت تک لایه¬ای در روز ۱۴ (A) و مقایسه آن با گروه کنترل (B). رنگ¬آمیزی تولوئیدن بلو. بزرگنمایی ۴۰. Bar=20 µ.



تصویر شماره۶: رنگ¬آمیزی ایمنوهیستوشیمی. رنگ قهوه¬ای نشانگر وجود کلاژن نوع ۲ در ماتریکس خارج سلولی می¬باشد که در کشت ریز توده (B) تراکم رنگ بیستری نسبت به کشت تک لایه¬ای(A) مشهود می¬باشد. بزرگنمایی ۴۰. Bar=20 µ.

بحث

در این مطالعه ابتدا سلول‌های بنیادی مزانشیمی از کشت بافت چربی انسانی به دست آمد. سپس پتانسیل تمایز کندروژنیک آن‌ها در سیستم‌های کشت تک لایه‌ای و ریز توده در شرایط in vitro در حضور محیط تمایزی غضروفی پس از چهارده روز کشت، به دو روش بافتی و ایمنوسیتوشیمی مورد ارزیابی قرار گرفت.

شکل دوکی سلول‌های شبه فیبروبلاست به دست آمده از بافت چربی و توان تکثیر بالای آنها مبنی بر وجود سلول‌های بنیادی است. هم‌چنین بیان بیش از ۹۰ درصد شاخص‌های مثبت سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر روی غشاء سلول‌های کشت داده شده نشان دهنده این مطلب است که سلول‌های به دست آمده در این مطالعه جمعیت خالصی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشند. این یافته‌ها مشابه مطالعه Lee و همکارانش (۲۰۰۴) و Dominici و همکارانش (۲۰۱۳) است که نشان داده‌اند بیان مارکرهای CD105 و CD90 و عدم بیان مارکرهای CD45 و CD31 دلیلی برای بنیادی بودن سلول‌های حاصله می‌باشد(۳۳،۳۲).

مطالعه سلول‌های کشت داده شده در محیط تمایزی نشان داد تعدادی از سلول‌ها پس از پایان روز هفتم حالت کشیده و شبه فیبروبلاست خود را تقریبا از دست داده و به شکل چند ضلعی و گرد درآمدند و در پایان روز ۱۴ کاملاً مورفولوژی کندروسیتی را داشتند. با این تفاوت که در کشت تک لایه تعداد سلول‌های تمایز یافته کاهش یافته و بتدریج مورفولوژی خود را تغییر داده و از شکل گرد و چندضلعی مجددا به فرم تقریبا کشیده و شبه فیبروبلاست برگشتند. در حالی که در کشت به صورت ریز توده سلول القایی غضروف یکنواخت‌تر و غنی از ماتریکس خارج سلولی بود. Erickson و همکارانش (۲۰۰۲) نیز در مطالعات خود کاهش نسبی غضروف زایی را در کشت دو بعدی نسبت به کشت سه بعدی گزارش کرده بودند(۳۴). این نتایج نشان می‌دهد که احتمالا سیستم کشت ریز توده که در آن سلول‌ها به صورت سوسپانسیونی با تراکم بالا به سلول غضروفی تمایز می‌یابند، نسبت به روش کشت تک لایه‌ای شرایط مناسب تری را برای تمایز فراهم می آورد.

تولید پروتئوگلیکان، گلیکوزآمینوگلیکان و کلاژن نوع ۲ از نشانه‌های تمایز کندروژنیک می‌باشند(۲۹). برای نشان دادن وجود پروتئوگلیکان در ماتریکس خارج سلولی، از رنگ‌آمیزی متاکروماتیک تولوئیدن بلو استفاده شد. رنگ آبی نشانگر متاکروماتیک بودن و حضور ماتریکس غضروفی می‌باشد. یافته‌ها نشان داد که میزان ماتریکس خارج سلولی تولید شده توسط کندروبلاست‌های تمایز یافته در روش ریز توده نسبت به روش کشت تک لایه به میزان قابل توجهی بیشتر بود. کار آمدی بیش‌تر روش کشت ریز توده‌ای در فرایند غضروف زایی با نظر به شاخص حجم ماتریکس تولیدی سلول‌های تمایز یافته، پیش از این نیز مورد تاکید قرار گرفته بود(۳۵). در میان اجزای ماتریکس

خارج سلولی غضروف از جهت اختصاصی بودن، کلاژن نوع ۲ از اهمیت ویژه ای دارد. لذا در این تحقیق وجود کلاژن نوع ۲ در ماتریکس خارج سلولی به روش ایمنوسیتوشیمی مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های مطالعه حاضر نیز برتری روش کشت ریز توده در مقایسه با روش تک لایه از نظر توان غضروف زایی را مورد تایید قرار داده است. این یافته گزارش Hamid و همکاران (۲۰۱۲) که نشان دادند بیان بسیاری از ژن‌های غضروفی از جمله کلاژن نوع ۲ در سلول‌های بنیادی مشتق از چربی انسانی در محیط تک لایه در هفته دوم و سوم پس از کشت کاهش می‌یابد را مورد تایید قرار می‌دهد(۳۶). این محققان همچنین گزارش کردند کشت متوالی سلول‌ها در محیط القای غضروف‌زایی به روش تک لایه نمی‌تواند باعث تحریک بیش‌تر تولید ماتریکس خارج سلولی جهت افزایش اندازه تجمعات سلولی گردد(۳۶). ماتریکس خارج سلولی به علت داشتن نقش حفاظتی برای سلول‌ها و تنظیم عملکرد آن‌ها، جهت زنده ماندن سلول‌ها بسیار ضروری می‌باشد لذا کاهش ترشح آن باعث آپوپتوز سلولی شده که می‌تواند تعداد کم سلول‌های تمایز یافته در کشت تک لایه‌ای را توجیه کند(۳۷).

در مطالعه‌ای Guo و همکاران در رابطه با کندروسیت‌های مفصلی که به صورت تک لایه‌ای کشت داده شده بودند به مطالعه بیان ژنی آن‌ها پرداختند. طول دوره کشت آن‌ها ۱۴ روزه بود. نتایج نشان داد که در روز هفتم بیان پروتئین‌هایی نظیر کلاژن Tenacsin C ،XI و فیبرونکتین افزایش و بیان Sox9 نسبتا کاهش می‌یابد(۳۸). این در حالی است که در مطالعه دیگر نشان داده شد SOX9 یکی از مارکرهایی است که در سلول‌های غضروفی در مرحله تراکم بیان می‌گردد(۳۹). در طی فرایند غضروف زایی به صورت ریز توده miR-92α به عنوان یک فاکتور محرک در بیان مثبت کلاژن نوع ۲ و آگریکان کمک می‌کند(۴۰).

کشت سلول با تراکم بالا روشی موثر جهت تمایز سلول غضروف از سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد(۲۹). سیستم کشت ریز توده محیطی مشابه شرایط تشکیل غضروف در دوران جنینی ایجاد می‌کند و باعث می‌شود سلول بنیادی به سلول غضروفی تمایز یابد. در دوران جنینی، اساس تمایز به غضروف، تراکم سلولی است که در سلول‌های مزانشیمی محل تشکیل غضروف اتفاق می‌افتد و در نتیجه آن، تعامل سلولی افزایش می‌یابد و سلول‌ها به کندروسیت متمایز می‌شوند.

غضروف القا شده در روش کشت ریز توده نسبت به کشت دو بعدی یکنواخت‌تر است. علت آن ممکن است تراکم بالای سلولی در این نوع روش کشت باشد. Kanichai و همکارانش در سال ۲۰۱۰ گزارش کردند که تراکم بالای سلول و کاهش فشار اکسیژن دو عامل موثر جهت القای کندروژنز می‌باشد(۴۱).

استفاده از کشت ریز توده نسبت به روش‌های دیگر جهت بررسی مکانیسم‌های مولکولی تنظیم‌کننده غضروف و رابطه سیگنالیک مولکول‌های مختلف مناسب‌تر می‌باشد(۲۹) که این، اهمیت و اعتبار مدل کشت سه بعدی ریز توده را تایید می‌کند.

بر اساس یافته های این مطالعه می توان گفت که روش کشت ریز توده در مقایسه با روش کشت تک لایه برای تمایز سلول های مزانشیمی مشتق از بافت چربی به سلول های غضروفی مناسب تر است. همچنین بیان کلاژن نوع دو و گلیکوزآمینوگلیکان ها دلالت بر شکل گیری بافت نرمال غضروف دارد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه دانشجوی کارشناسی ارشد خانم المیرا غفاری می باشد.

بدینوسیله از همکاری مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی که زمینه انجام طرح را فراهم نموده اند تشکر و قدردانی می شود.

References

1. Gupta PK, Das AK, Chullikana A, Majumdar AS. Mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis. Stem Cell Res Ther 2012; 3(4): 25.
2. Correia CR, Moreira-Teixeira LS, Moroni L, Reis RL, van Blitterswijk CA, Karperien M, et al. Chitosan scaffolds containing hyaluronic acid for cartilage tissue engineering. Tissue Eng Part C: Methods 2011; 17(7): 717-730.
3. Yan L-P, Oliveira JM, Oliveira AL, Caridade SG, Mano JF, Reis RL. Macro/microporous silk fibroin scaffolds with potential for articular cartilage and meniscus tissue engineering applications. Acta Biomater 2012; 8(1): 289-301.
4. Buckwalter JA, Saltzman C, Brown T. The impact of osteoarthritis: implications for research. Clin Orthop Relat Res 2004; 427: S6-S15.
5. Dougados M. The role of anti-inflammatory drugs in the treatment of osteoarthritis: a European viewpoint. Clin Exp Rheumatol 2000; 19(6 Suppl 25): S9-14.
6. Pincus T, Koch G, Sokka T, Lefkowith J, Wolfe F, Jordan J, et al. A randomized, double-blind, crossover clinical trial of diclofenac plus misoprostol versus acetaminophen in patients with osteoarthritis of the hip or knee. Arthritis Rheum 2001; 44(7): 1587-1598.
7. Eyigor S, Hepguler S, Sezak M, Oztop F, Capaci K. Effects of intra-articular hyaluronic acid and corticosteroid therapies on articular cartilage in experimental severe osteoarthritis. Clin Exp Rheum 2006; 24(6): 724.
8. Karatosun V, Unver B, Ozden A, Ozay Z, Gunal I. Intra-articular hyaluronic acid compared to exercise therapy in osteoarthritis of the ankle. A prospective randomized trial with long-term follow-up. Clin Exp Rheum 2008; 26(2): 288-294.
9. Steinert AF, Ghivizzani SC, Rethwilm A, Tuan RS, Evans CH, Nöth U. Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. Arthritis Res Ther 2007; 9(3): 213.
10. Martin I, Miot S, Barbero A, Jakob M, Wendt D. Osteochondral tissue engineering. J Biomech 2007; 40(4): 750-765.
11. Tuli R, Li W-J, Tuan RS. Current state of cartilage tissue engineering. Arthritis Res Ther 2003; 5(5): 235-238.
12. Bölgen N, Yang Y, Korkusuz P, Güzel E, El Haj A, Pişkin E. 3D ingrowth of bovine articular chondrocytes in biodegradable cryogel scaffolds for cartilage tissue engineering. J Tissue Eng Regen Med 2011; 5(10): 770-779.
13. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science 1997; 276(5309): 71-74.
14. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell 2002; 13(12): 4279-4295.
15. Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. Stem Cells 2003; 21(1): 105-110.
16. Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I,Kitamura T, Tsuji K. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. Stem Cells 2004; 22(5): 649-658.
17. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem

cells from adult human synovial membrane. Arthritis Rheum 2001; 44(8): 1928-1942.

18. Salter RB. The Biologic Concept of Continuous Passive Motion of Synovial Joints: The First 18 Years of Basic Research and Its Clinical Application. Clin Orthop Relat Res 1989; 242: 12-25.
19. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. Keio J Med 2005; 54(3): 132-341.
20. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. J Cell Sci 2006; 119(11): 2204-2213.
21. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. Trends Biotechnol 2006; 24(4): 150-154.
22. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. Arthritis Rheum 2005; 52(8): 2521-2529.
23. Lin T-M, Tsai J-L, Lin S-D, Lai C-S, Chang C-C. Accelerated growth and prolonged lifespan of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells in a medium using reduced calcium and antioxidants. Stem Cells Dev 2005; 14(1): 92-102.
24. |Lee HJ, Choi BH, Min BH, Park SR. Changes in surface markers of human mesenchymal stem cells during the chondrogenic differentiation and dedifferentiation processes in vitro. Arthritis Rheum 2009; 60(8): 2325-2332.
25. Aronow MA, Gerstenfeld LC, Owen TA, Tassinari MS, Stein GS, Lian JB. Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. J Cell Physiol 1990; 143(2): 213-221.
26. Loening AM, James IE, Levenston ME, Badger AM, Frank EH, Kurz B, et al. Injurious mechanical compression of bovine articular cartilage induces chondrocyte apoptosis. Arch Biochem Biophys 2000; 381(2): 205-212.
27. Nazem K, Safdarian A, Fesharaki M, Moulavi F, Motififard M, Zarezadeh A, et al. Treatment of full thickness cartilage defects in human knees with Autologous Chondrocyte Transplantation. J Res Med Sci 2011; 16(7): 855-861.
28. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. Exp Cell Res 1998; 238(1): 265-272.
29. Zhang L, Su P, Xu C, Yang J, Yu W, Huang D. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: a comparison between micromass and pellet culture systems. Biotechnol lett 2010; 32(9): 1339-1346.
30. Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. Br J Haematol 2005; 129(1): 118-129.
31. Danisovic L, Varga I, Polak S, Ulicna M, Hlavackova L, Böhmer D, et al. Comparison of in vitro chondrogenic potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. Gen Physiol Biophys 2009; 28(1): 56-62.
32. Lee OK, Kuo TK, Chen W-M, Lee K-D, Hsieh S-L, Chen T-H. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Blood 2004; 103(5): 1669-1675.

33. Rasini V, Dominici M, Kluba T, Siegel G, Lusenti G, Northoff H, et al. Mesenchymal stromal/stem cells markers in the human bone marrow. Cytotherapy 2013; 15(3): 292-306.
34. Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. Biochem Bioph Res Co 2002; 290(2): 763-769.
35. Murdoch AD, Grady LM, Ablett MP, Katopodi T, Meadows RS, Hardingham TE. Chondrogenic Differentiation of Human Bone Marrow Stem Cells in Transwell Cultures: Generation of Scaffold-Free Cartilage. Stem cells 2007; 25(11): 2786-2796.
36. Hamid AA, Idrus RBH, Saim AB, Sathappan S, Chua K-H. Characterization of human adipose-derived stem cells and expression of chondrogenic genes during induction of cartilage differentiation. Clinics 2012; 67(2): 99-106.
37. Meredith J, Fazeli B, Schwartz M. The extracellular matrix as a cell survival factor. Mol Biol Cell 1993; 4(9): 953-961.
38. Guo D, Tan W, Wang F, Lv Z, Hu J, Lv T, et al. Proteomic analysis of human articular cartilage: identification of differentially expressed proteins in knee osteoarthritis. Joint Bone Spine 2008; 75(4): 439-444.
39. Venkatesan JK, Ekici M, Madry H, Schmitt G, Kohn D, Cucchiarini M. SOX9 gene transfer via safe, stable, replication-defective recombinant adeno-associated virus vectors as a novel, powerful tool to enhance the chondrogenic potential of human mesenchymal stem cells. Stem Cell Res Ther 2012; 3(3): 22.
40. Hou C, Zhang Z, Zhang Z, Wu P, Zhao X, Fu M, et al. Presence and function of microRNA-92a in chondrogenic ATDC5 and adipose-derived mesenchymal stem cells. Mol Med Rep 2015; 12(4): 4877-4886
41. nichai M, Ferguson D, Prendergast PJ, Campbell VA. Hypoxia promotes chondrogenesis in rat mesenchymal stem cells: A role for AKT and hypoxia-inducible factor (HIF)-1α. J Cell Physiol 2008; 216(3): 708-715.