پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره هفدهم شماره ۵۹ مرداد و شهریور سال ۱۳۸۶ (۳۴-۲۴)

مطالعه ساختار غضروف حاصل از تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی موشی در مقایسه با غضروف هیالین دنده ای

محمدرضا باغبان اسلامی نژاد (Ph.D.) *+ **لیلا تقی یار** (M.Sc.)** **عباس پیریایی** (M.Sc.)***

چکیده

سابقه و هدف : تا به حال، تمایز به غضروف سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط آزمایشگاهی در مطالعات زیادی مورد توجه قرار گرفته است. در این تحقیقات، اغلب تمایز مولکولی سلول‌ها بررسی شده است. این در حالی است که تمایز ساختاری و مورفولوژیک سلول‌ها اغلب به دست فراموشی سپرده شده است. مطالعه حاضر به بررسی ساختار و فراساختار غضروف حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مقایسه با غضروف طبیعی جدا شده از انتهای دنده می‌پردازد.

مواد و روش‌ها : ۲×۱۰^{۵} سلول بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان موش‌های NMRI (حاصل از پاساژ دوم) با انجام سانتریفوژ متراکم شده و به مدت ۲۱ روز در لوله حاوی محیط کندروژنیک (سیستم Micro mass) کشت داده شد. در پایان دوره تمایز، وقوع کندروژنزیس با روش RT-PCR تایید شده و پس از آن بافت غضروفی حاصل از تمایز برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی آماده گردید. در مطالعه حاضر به منظور مقایسه ساختار غضروف تولید شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی با غضروف طبیعی بدن، غضروف دنده‌ای از موش دهنده سلول بنیادی مزانشیمی اخذ شد و مراحل آماده‌سازی بافتی برای میکروسکوپ الکترونی گذاره را طی کرد.

یافته‌ها : مطالعات ساختار نشان داد که در بافت غضروف حاصل از تمایز همانند بافت غضروف طبیعی، لایه (شبه) پری کندریومی ساخته شده است. این لایه، توده سلول‌های غضروفی با مورفولوژی‌های گرد و بیضی را از خارج احاطه کرده بود. بر اساس تصاویر برش‌های نازک، سلول‌های تمایز داده شده بر خلاف سلول‌های بافت طبیعی، هسته یوکروماتینی داشتند و سیتوپلاسم آنها حاوی ارگانل‌های ترشحی فراوانی بود. همچنین ماتریکس بافت غضروفی حاصل از تمایز بر خلاف غضروف طبیعی رشته‌ای بود.

استنتاج : نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بافت غضروف تولید شده در سیستم Micro mass از لحاظ فرا ساختار با بافت غضروف هیالین طبیعی تفاوت دارد. سلول‌های این بافت فعال تر از سلول‌های بافت طبیعی به نظر رسیدند.

واژه های کلیدی : سلول‌های بنیادی مزانشیمی، کشت Micro mass ، بافت غضروف، تمایز به غضروف

* دکترای علوم تشریح پژوهشکده رویان

+ ✉ **مولف مسئول:** تهران- بزرگراه رسالت، خیابان بنی هاشم، میدان بنی هاشم، کوچه حافظ شرقی، پژوهشکده رویان
Email: bagesla@yahoo.com

** کارشناس ارشد بیولوژی تکوینی پژوهشکده رویان *** کارشناس ارشد علوم تشریح، عضو هیأت علمی(مربی) دانشگاه شهید بهشتی

تاریخ دریافت : ۸۵/۱۱/۱۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۸۶/۱/۱۸ تاریخ تصویب: ۸۶/۵/۳

www.SID.ir
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

مقدمه

آسیب‌های بافت غضروف یکی ازمعضلات گسترده جهانی بوده و انسان‌های زیادی را درگیر می‌نماید. این آسیب‌ها معمولاً در اثر ضربه و یا بیماری‌های دژنراتیو وابسته به سن ایجادمی گردد(۲-۱) و به‌دلیل بیولوژی ویژه بافت غضروفی، به طور طبیعی قابل ترمیم نیستند(۶-۳). با وجودی که تلاش‌های گسترده‌ای جهت درمان آسیب‌های غضروفی صورت گرفته، با این حال، روش کاملا مناسب برای ترمیم و بازسازی بخش آسیب دیده غضروف ارائه نشده است(۸-۷).

تحقیقات پیشین به خوبی، نقش ارزنده پیوند سلول و یا به عبارتی سلول درمانی را در ترمیم بافت غضروف نشان داده است(۱۳-۹). پیوند سلول‌های کندروسیت تکثیر یافته در محیط کشت، یک استراتژی ارزنده جهت درمان آسیب‌های غضروفی است ولی به دلیل این‌که سلول‌های کاملاً تمایز یافته از تکثیر پایینی برخوردار هستند(۱۴)، محققین همواره به دنبال منبع سلولی دیگری بوده‌اند که در این بین سلول‌های بنیادی به ویژه نوع مزانشیمی همواره مورد توجه بوده است، زیرا این سلول‌ها تکثیر بالایی دارند(۱۶- ۱۵) و در نتیجه یک منبع سلولی بی پایانی را در اختیار درمانگر قرار می‌دهند و از طرفی اگر در شرایط مناسب قرار گیرند، به راحتی به غضروف تمایز می‌یابند(۱۹-۱۷).

نکته‌ای که در به‌کارگیری سلول‌های مزانشیمی با هدف باز سازی غضروف وجود دارد این است که محققین معتقدند که پیش از پیوند، بهتر است سلول مزانشیمی در محیط آزمایشگاه به کندروسیت کاملا بالغ تمایز داده شود. این رویکرد انتقال کندروسیت‌ها را به محل مورد نظر تضمین کرده و از تمایزهای ناخواسته در محل آسیب دیده غضروف مفصلی از جمله تمایز به استخوان و چربی که از توانایی‌های بالقوه سلول‌های مزانشیمی محسوب می‌شود، جلوگیری می‌نماید(۲۰).

معمولاً برای تمایز سلول‌های مزانشیمی به غضروف از سیستم کشت Micro mass استفاده می‌شود. در این روش، سلول‌ها در یک حالت متراکم، به شکل سه بعدی کشت می‌شوند. این سیستم کشت را Manning و همکاران در سال ۱۹۶۷ معرفی کردند(۲۱). کشت سلول‌های مزانشیمی با استفاده از این سیستم، برای اولین بار توسط Johnstone توصیف شده است(۲۲) و پس از آن گزارشات متعدد، کارآیی این روش را در تمایز به غضروف سلول‌های مزانشیمی به خوبی نشان داده است(۲۵-۲۳).

در تمام مطالعات فوق، برای ارزیابی تمایز به غضروف سلول‌های مزانشیمی کشت شده در سیستم Micro mass از روش‌های مولکولی استفاده شده است بدین ترتیب که محققین با دیدن بیان ژن‌های ویژه غضروف ازقبیل کلاژنII ،X و ماکرومولکول آگریکان، تمایز غضروفی سلول‌ها را به اثبات رسانده‌اند(۲۵-۲۳).

نکته‌ای که وجود دارد این است که بیان ژن‌های ویژه غضروفی فرآیندی است که در طی کندروژنزیس، در مراحل ابتدایی آن آغاز می‌شود و در انتهای دوره تمایز به حداکثر خود می‌رسد. تاکنون هیچ ملاک کمی از لحاظ میزان بیان ژنی که نشان دهنده تمایز نهایی غضروف باشد ارائه نشده است. بنابراین صرفا با تکیه بر بیان ژنی میزان تمایز سلول مشخص نمی شود و برای این منظور بررسی سایر شاخص‌های تمایز از قبیل فراساختار و مقایسه آن با غضروف طبیعی ضرورت پیدا می‌کند. این درحالی است‌که تمایزساختاری سلول‌های مزانشیمی در سیستم Micro mass مشخص نیست و این که غضروف تمایز یافته در سیستم Micro mass تا چه حدی از لحاظ فرا ساختار به غضروف طبیعی بدن نزدیک است، گزارشی وجود ندارد. این مطالعه با هدف مقایسه ساختار غضروف حاصل از تمایز سلول‌های

Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

www.SID.ir

مزانشیمی موشی با غضروف هیالین دنده‌ای انجام شده است.

مواد و روش ها

جداسازی و تکثیر سلول‌های مزانشیمی:

سلول‌های مزانشیمی موش با روشی که در مقالات ذکر گردیده، جدا شد(۲۵). موش‌های نر، نژاد NMRI به سن تقریبی ۶-۴ هفته با روش جابجایی مهره گردنی (servical dislocation) قربانی شدند. سپس به کمک الکل ۷۰درصد ضدعفونی شده و درشرایط کاملا استریل، استخوان‌های ران ودرشت نی آنها جدا گردید. سپس بافت نرم و عضلات اطراف استخوان‌ها به طور کامل پاک گردید و در لوله ۱۵ میلی‌لیتری محتوی محیط DMEM (Dubleco's modified eagles medium Gibco; Germany) حاوی ۱۵ درصد سرم FBS (Fetal Bovine Serum ; Gibco ; Germany) ، 100 واحد بین المللی آنتی بیوتیک پنی سلین و ۱۰۰ واحد بین‌المللی استروپتومایسین(Gibco;Germany) قرار داده شده و به زیر هود استریل منتقل گردید.

به کمک قیچی استریل دو انتهای استخوان‌ها قطع گردیده و مغز استخوان با استفاده از یک سرنگ و سر سوزن شماره ۲۲ حاوی محیط DMEM به روش flashing در یک لوله ۱۵ میلی‌لیتری تخلیه گردید. سلول‌های به‌دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه تحت g ۱۲۰۰ سانتریفوژ شد. پس ازآن، محیط رویی تخلیه گردید و پلت سلولی تشکیل شده در ۱ میلی لیتر محیط DMEM تازه، معلق شد و در نهایت به وسیله فیلتر مش ۰/۲ میکرو لیتر فیلتر شد، در این مرحله سلول‌های حاصل از هر استخوان دراز به کمک لام نئوبار شمارش شد 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 سانتی‌گراد و ۵ درصد CO2 منتقل گردید. بعد از۲روز محیط رویی، دور ریخته شد و سلول‌های چسبیده به کف ظرف، دوبار با محلول PBS^+ (Dobleco phosphate buffer solution, Gibco, UK) شستشو شده و سپس محیط DMEM تازه اضافه گردید. محیط سلول‌ها هر ۴-۳ 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٪ (Gibco;Germany) از کف ظرف کنده شد و در فلاسک ۲۵ سانتی متر مربعی کشت شد (پاساژ یک). دو هفته پس از پاساژ اول، پاساژدوم انجام شد. این سلول‌ها پس از پر کردن کف ظرف کشت برای تمایز به غضروف استفاده شد.

تمایز سلول‌های mMSCs به غضروف:

به منظور کشت Micro mass $۲/۵\times۱۰^۵$ سلول به یک لوله ۱۵میلی‌لیتری منتقل شد. سلول‌ها تحت g ۱۲۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس محیط رویی تخلیه شده و نیم میلی‌لیتر محیط کندروژنیک شامل محیط DMEM حاوی ۱۰ نانوگرم فاکتور رشد TGF-B3 ، ۱۰ نانوگرم BMP-6 ، ۵۰ میلی‌گرم ITS+premix ، ۳/۵۵ میلی‌گرم linoleic acid و ۱/۲۵ میلی گرم bovine serum albomin و ۲درصد سرم گاوی بر روی پلت سلولی در ته لوله، اضافه شد. محیط تمایز هر ۴-۳ روز یکبار به مدت ۳ هفته تعویض گردید.

تهیه غضروف:

بافت غضروف هیالین از انتهای دنده موشی که مغز استخوان آن برای استخراج سلول مزانشیمی استفاده شده بود، تهیه شد. به این ترتیب که قفسه سینه پس از ضدعفونی با الکل ۷۰ درصد باز شد و بافت همبند موجود بر روی دنده‌ها به طور کامل پاک گردید و سپس بافت غضروف از انتهای دنده در محل اتصال به جناغ سینه جدا شد و در داخل PBS قرار گرفت.

Archive of SID
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

www.SID.ir

RT-PCR:

در ابتدا با استفاده از کیت Nucleospin RNA II kit (740955;Macherey-Nagel,Germany) کل‌موجودی RNA سلولی از سلول‌های مزانشیمی تمایز یافته به غضروف استخراج گردید. نمونه‌های RNA استخراج شده تحت تیمار با Dnase I (104132, Roch) قرار گرفتند تا آلودگی‌های احتمالی مربوط به DNA ژنومیک از نمونه‌های RNA حذف گردد. سپس خلوص وغلظت RNA استخراج شده با روش اسپکتروفوتومتری تعیین گردید و پس از آن ۱ میکروگرم از RNA استخراج شده با استفاده از پرایمر Random Hexamer و کیت Revert (K 1622 Fermentas) AidT^{MH} Minus First Strand cDNA Synthesis نسخه‌برداری معکوس گردید. سپس از cDNA تولید شده به عنوان الگو برای PCR استفاده شد برای این منظور PCR Buffer ,۲ µl cDNA (۱۰۰ng/µl) (AMS) (۱۰×)۲/۵ µl , MgC12 (۵۰mM) ۰/۷۵ µl و dNTPmix(۱۰mM)،۰/۵ µl (۵ µM) ۱ µl از هر پرایمرهای Collagen type II: Reverse primer 5′-TGGACAGTAGACGGAGGA AAGTC-3′,Forward primer 5′-GGCTTAGGGCAGAGA GAG AAG G-3′,Collagen type X: Forward primer 5′-CAG CAG CAT TAC GAC CCA AG-3′, Reverse primer5′-CCTGAGAAGGACGAGTGGAC-3, Aggrecan: Forward primer 5′-CAG CAG CAT TAC GAC CCA AG -3′, Reverse primer 5′-CCTGAGAAGGACGAGTGGAC-3′, Smar Taq µl(5unit/1µl)۰/۵ (سیناژن، TA8110C) در یک لوله PCR با یکدیگر مخلوط شدند و در نهایت با استفاده از آب دو بار تقطیر به حجم ۲۵ µl رسانده شد. پس از انجام PCR محصولات آن بر روی آگارز ۱/۷ درصد جدا شدند و سپس با اتیدیوم بروماید قابل رؤیت گردیدند.

آماده‌سازی بافت برای میکروسکوپ الکترونی‌گذاره

تکه‌های بافت غضروفی انتهای دنده و توده‌های سلولی تمایز یافته در کشت Micro mass به روش زیر برای بررسی ساختار آماده شدند. ابتدا نمونه‌ها به کمک گلوتارآلدهید ۲/۵ درصد به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ثبوت اولیه شدند و سپس در بافر فسفات سورنسون شسته شدند و ثبوت ثانویه به کمک محلول آبی ۱ درصد تتراکسید اسمیوم انجام شد (به مدت۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد). آنگاه نمونه‌ها در آگار ۱ درصد مذاب قرار داده شدند و در زیر استریومیکروسکوپ به قطعات یک میلی‌متری بریده شدند. به کمک درجات مختلف الکل اتیلیک و استون به ترتیب عمل آبگیری و شفاف سازی انجام شد. پس از آن نمونه‌ها در رزین آرالدایت قالب‌گیری شدند. عمل پلی‌مریزاسیون در درجه حرارت ۶۰°C و به مدت ۲۴ ساعت انجام شد و برش‌گیری با دستگاه اولترامیکروتوم (Richert) انجام شد مقاطع بافتی ضخیم (نیمه نازک Semi thin) در حدود ۱ میکرون و رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو و قاطع ظریف۹۰-۷۰ نانومتری با سیترات سرب و استات آمونیوم رنگ‌آمیزی شد و در زیر میکروسکوپ الکترونی مشاهده گردید.

یافته ها

کشت سلول:

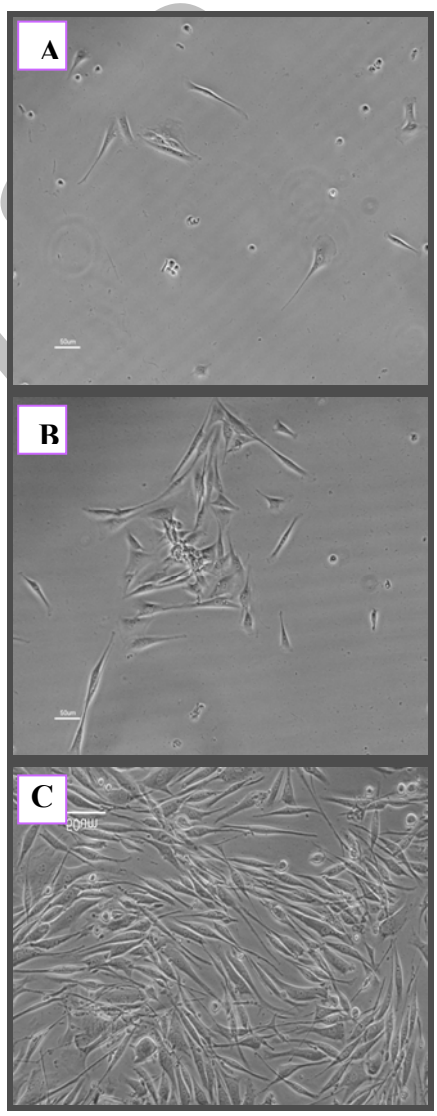
در کشت اولیه برخی از سلول‌ها چسبیدند و منشا کشت شدند و برخی دیگر در محیط کشت شناور باقی ماندند که با اولین تعویض محیط دور ریخته شدند. سلول‌های چسبیده اشکال متفاوتی از جمله ستاره‌ای،

Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

www.SID.ir

گرد، چندضلعی و کشیده و دوکی داشتند (شکل۱-A). با انجام اولین پاساژ تکثیر سلول‌های دوکی تحریک شد به طوری که این سلول‌ها بر کشت سلول غالب شدند (شکل۱-B) در پاساژ دوم کشت، تک لایه تشکیل شده جمعیت خالصی از سلول‌های دوکی مزانشیمی بود (شکل ۱-C).



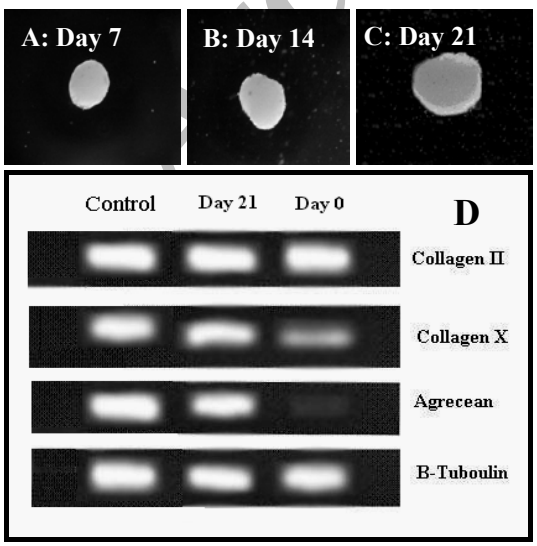
شکل شماره ۱ : کشت اولیه سلول های مغز استخوان موش (A: بزرگنمایی×۲۰). پاساژ اول (B : بزرگنمایی×۴۰). پاساژ دوم : کشت حاوی جمعیت یکنواختی از سلول های دوکی است (C: بزرگنمایی×۴۰).

تمایز سلول های mMSCs به غضروف:

پلت سلولی که به مدت ۲۱ روز در معرض محیط کندروژنیک قرار داشت، هر ۴-۳ روز یک بار با میکروسکوپ معکوس مشاهده شد. توده سلولی درطول این مدت به خوبی رشد کرده و اندازه آن تقریبا دو برابر شد (شکل A و B، C ۲).

RT-PCR:

با انجام تکنیکRT-PCRمشخص شدکه سلول‌های مزانشیمی روز صفر کلاژن تیپ II را تا حدودی ترشح کرده و کلاژن تیپ X را نیز به مقدار بسیار اندک ترشح می‌کنند ولی اگریکان در این سلول‌ها ترشح نشده و با استفاده از محیط تمایز کندروژنیک بیان ژن‌های مذکور در روز ۲۱ افزایش چشم‌گیری را نشان داد. کلاژن تیپ X کلاژن اختصاصی سلول‌های کندروسیت می‌باشد که در سلول‌های تمایز یافته در روز ۲۱ به مقدار زیادی ترشح شد و ژن اگریکان نیز به مقدار زیادی در این سلول‌ها بیان شد. الگوی بیان این ژن‌ها در سلول‌های تمایز یافته وکندروسیت‌های طبیعی به مقدار زیادی شبیه بود (شکل D ۲).



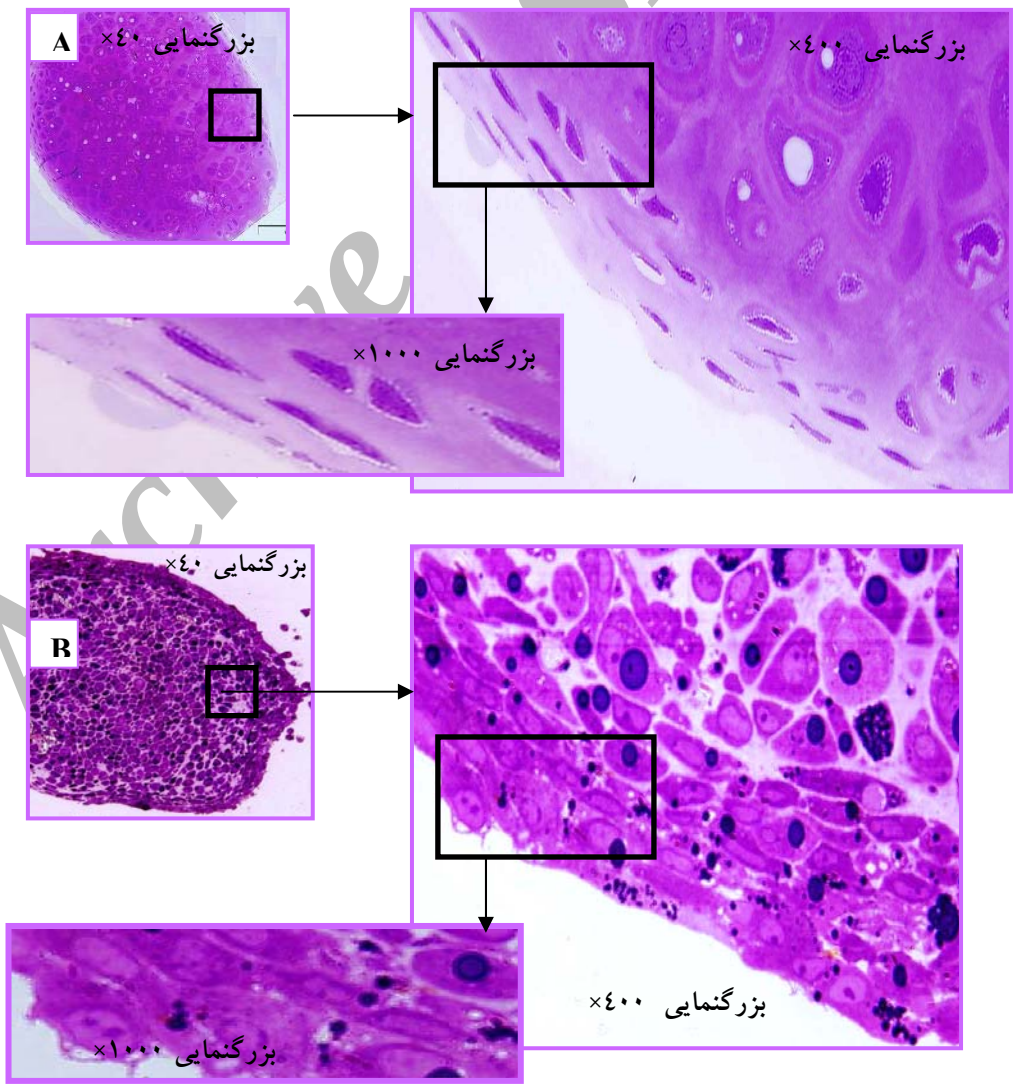
شکل شماره ۲ : RT-PCR برای بیان ژ ن های شاخص غضروفی . گروه کنترل سلول های غضروف دنده ای می باشد.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

www.SID.ir

فراساختار:

درمقاطع نیمه نازک تهیه شده از غضروف دنده‌ای، در حاشیه لایه پری کندریوم متشکل از سلول‌های کشیده مشاهده شد. این لایه در سمت داخل بافت غضروفی را احاطه کرده بود. در داخل این توده غضروفی کندروسیت‌ها با اشکال متنوع گرد، بیضی و کشیده واقع شده بودند. در لابلای سلول‌ها ماده زمینه‌ای نسبتا یکنواختی تجمع پیدا کرده بود که با رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو بنفش رنگ شده بود (تصویر شماره ۳A). در غضروف تمایز یافته از سلول‌های مزانشیمی، مشابه با غضروف دنده‌ای، در اطراف، لایه شبه پری کندریومی تشکیل شده بود. سلول‌های این بخش به اندازه پری کندریوم غضروف دنده‌ای کشیده نبودند. همچنین، سلول‌ها در این بخش در مقایسه با بخش مشابه غضروف دنده‌ای قدری متراکم تر بودند. توده غضروفی که داخل تر از لایه شبه پری کندریومی واقع شده بود، مشابه با بافت غضروف دنده‌ای حاوی سلول‌هایی با مورفولوژی متنوع بود. ماده زمینه‌ای، در اثر رنگ‌آمیزی با تولوئیدن بنفش شده بود ولی به شدت ماتریکس غضروف دنده‌ای رنگ نگرفته بود(۳B).



تصویر شماره۳- A : رنگ آمیزی تولوئیدن بلو برش‌های نیمه نازک بافت غضروف دنده‌ای و B : غضروف حاصل ازتمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی

www.SID.ir
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

در بررسی مقاطع نازک جزئیات ساختاری سلول‌ها بیشتر آشکار شد. مطالعه این مقاطع نشان داد که کندروسیت‌های غضروف دنده‌ای سطحی ناصاف (مضرس) داشته و هسته آنها کشیده می‌باشد. در داخل هسته بویژه در زیر پوشش آن مناطق هتروکروماتینی به چشم می‌خورد(۴A). سیتوپلاسم سلول حاوی چند مخزن شبکه اندوپلاسمی خشن، یک دستگاه گلژی و چند میتوکندری با سطح مقطع گرد بود. در داخل سیتوپلاسم به صورت پراکنده مناطق الکترون دنس (احتمالا دانه‌های گلیکوژن) وجود داشت(۴E و ۴C). ماده زمینه درغضروف دنده به شکل لایه نسبتا یکنواخت روشن ظاهر شده بود (۴G). مطالعه مقاطع نازک غضروف تمایز یافته از سلول‌های مزانشیمی حاکی از تفاوت‌هایی بین کندروسیت‌های دو گروه بود. هسته در سلول‌های بافت تمایز یافته در مقایسه با کندروسیت‌های غضروف دنده‌ای، مورفولوژی گرد داشت و حاوی یوکروماتین یکنواختی بود. در سطح این سلول‌ها زوائد مشابه با کندروسیت های غضروف دنده‌ای مشاهده نشد(۴B). سیتو پلاسم کندروسیت‌های حاصل از تمایز سلول‌های مزانشیمی پر ارگانل بود به طوری‌که مخازن شبکه آندوپلاسمی خشن متعدد بود و گلیکوژن بیشتری در این سلول‌ها تجمع یافته بود. همچنین این سلول‌ها حاوی گرانول‌های ترشحی بودند(۴Fو۴D). درحالی‌که سلول‌های غضروف دنده‌ای در مجموع سیتوپلاسم کمتری نسبت به سلول‌های تمایز یافته داشتند. این سیتوپلاسم کم ارگانل بود و تنها حاوی چند مخزن شبکه آندوپلاسمی خشن بود و در بعضی موارد پروفیل چند میتوکندری در آن مشاهده شد(۴Eو۴C). سلول‌های غضروف دنده‌ای فاقد گرانول ترشحی بودند. تفاوت دیگری که بین غضروف تمایز یافته و غضروف طبیعی انتهای دنده وجود داشت مربوط به ماده زمینه‌ای تجمع یافته در لابلای کندروسیت‌ها بود. ماتریکس بین سلولی در غضروف حاصل از تمایز سلول‌های مزانشیمی در مقایسه با ماتریکس غضروف دنده‌ای رشته بیشتری داشت(۴G و ۴H).

بحث

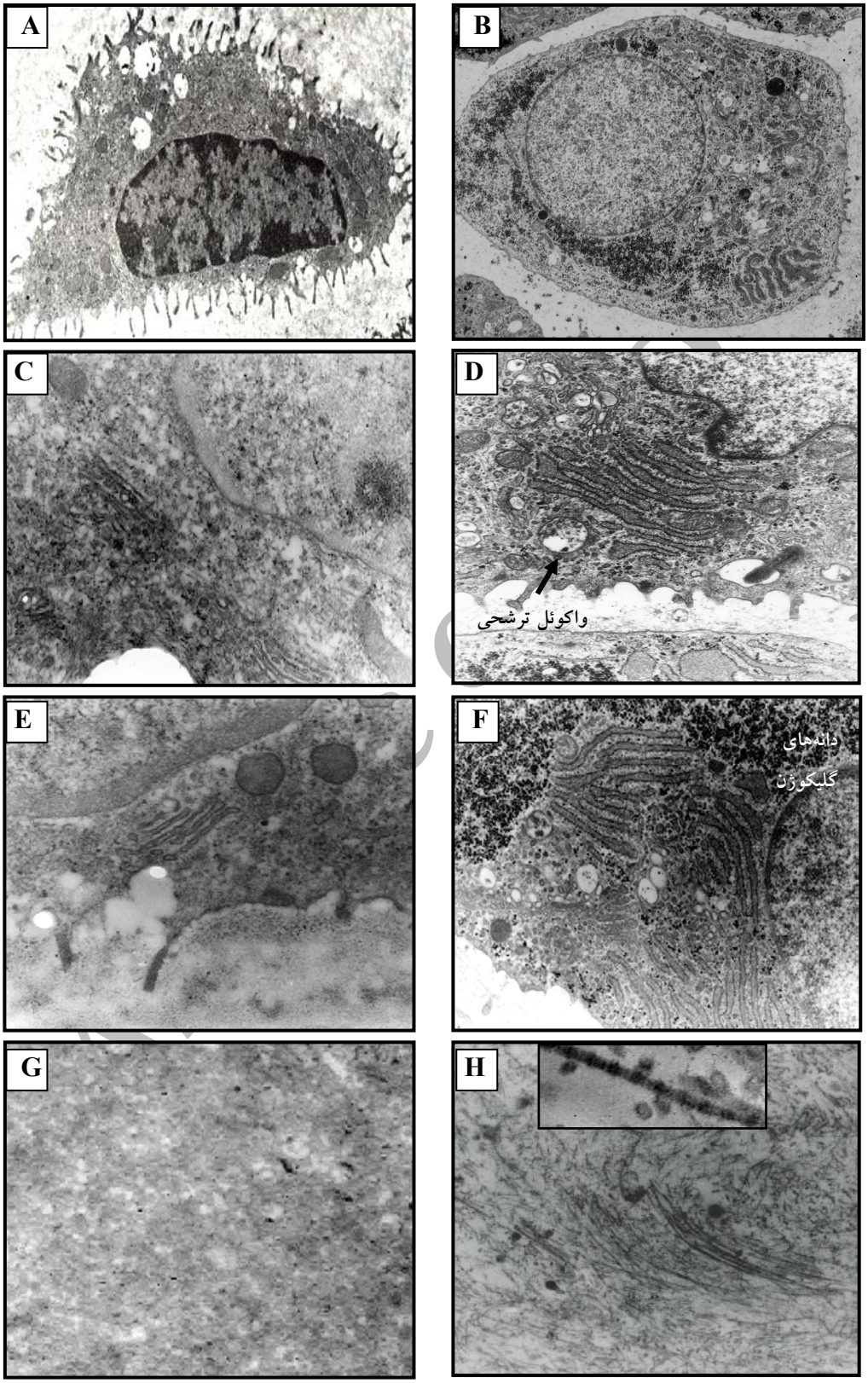
سیستم کشت Micro mass یک سیستم پایه برای تمایز غضروف محسوب می‌شود. این روش بر اساس فرآیند غضروف‌زایی در دوران جنینی طراحی شده است. در دوران جنینی، اساس تمایز به غضروف، تراکم سلولی است که در سلول‌های مزانشیمی محل تشکیل غضروف اتفاق می‌افتد و در نتیجه آن، تعامل سلولی افزایش می‌یابد وسلول‌ها به کندروسیت متمایز می‌شوند. در روشMicro Mass نیز تراکم سلولی به وسیله سانتریفوژ کردن سلول‌ها ایجاد می‌گردد(۱۳). در مطالعه حاضر، پتانسیل تمایز به غضروف سلول های بنیادی مزانشیمی در سیستم کشت Micro mass مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین ترتیب که سلول‌های مزانشیمی در این سیستم به غضروف تمایز داده شد و ساختار آنها در کنار غضروف هیالین طبیعی بدن (غضروف دنده‌ای) مطالعه شد. مطالعه ما، اولین گزارش در این ارتباط است.

در مطالعه حاضر، سلول‌های مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان موش، درسیستم Micro mass به غضروف تمایز داده شدند و سپس وقوع تمایز باروش RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، مارکرهای ویژه غضروف یعنی کلاژن نوع II ، X و ماکرومولکول آگریکان به مقدار زیادی در غضروف حاصل از تمایز سلول مزانشیمی بیان شد. بنابراین ما متقاعد شدیم که سلول‌هایی که در این تحقیق ساختار آنها مطالعه شد، از لحاظ ماهیت کندروسیت هستند.

Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

www.SID.ir



تصویر شماره ٤ : فتومیکروگراف مربوط به فراساختار غضروف دنده‌ای(A,C,E,G) و غضروف حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی موش(B,D,F,H). در مجموع سلول‌های حاصل از تمایز پر ارگانل تر و در نتیجه فعال تر به نظر می‌رسند. (A و B بزرگنمایی×۳۰۰۰) (C، D، E و F بزرگنمایی×۷۰۰۰) (G و H بزرگنمایی×۲۰۰۰۰).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

www.SID.ir

در مجموع، نتایج این مطالعه نشان داد که غضروف حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی از لحاظ ساختار شباهت‌هایی را به غضروف طبیعی دنده‌ای دارد. در مجموع به نظر می‌رسد که این بافت در حین تمایز، ساختار عمومی بافت غضروفی را کسب می‌کند. بر اساس تصاویر نیمه نازک، غضروف حاصل از تمایز همانند غضروف طبیعی از سمت بیرون توسط لایه (شبه) پری کندریومی احاطه شده بود و در سمت داخل از توده سلول‌های غضروفی ساخته شده بود. با این وجود دو بافت از لحاظ جزئیات فراساختاری تا حدودی متفاوت بودند.

براساس این نتایج، یک تفاوت این بود که سلول‌های غضروفی تولید شده در آزمایشگاه، از لحاظ ساختاری فعال به نظر رسیدند که این قضیه در وضعیت کروماتین هسته، نوع و تعداد ارگانل‌های داخل سیتوپلاسمی مشهود بود. این سلول‌ها برخلاف کندروسیت‌های طبیعی، هسته کاملا یوکروماتینی داشتند و در سیتوپلاسم آنها، ارگانل‌ای ترشحی از قبیل شبکه آندوپلاسمی و گرانول‌های ترشحی به وفور وجود داشت. به عبارتی سلول‌های غضروف حاصل از تمایز، به کندروبلاست شباهت داشتند تا به کندروسیت‌های تیپیک غضروف طبیعی. به نظر می‌رسد در سیستم کشت Micro mass تمام عوامل لازم برای شروع و ادامه روند تمایز به غضروف وجود دارد ولی عوامل مربوط به بالغ شدن ساختاری و توقف پروسه کندروژنزیس وجود ندارد.

تفاوت عمده دیگر غضروف تمایز داده شده در مقایسه با غضروف هیالین، در ماده زمینه ای ترشح شده بود. رشته کلاژن غضروف، کلاژن نوع II است که به دلیل اینکه فیبر تشکیل نمی‌دهد در مقاطع میکروسکوپ الکترونی نیز قابل رویت نیست. این قضیه در مقاطع غضروف طبیعی بوضوح مشخص بود به طوری که در این غضروف ماده زمینه‌ای به شکل یک لایه یکنواخت غیر رشته‌ای ظاهر شد. در حالیکه در غضروف حاصل از تمایز سلول بنیادی مزانشیمی، ماتریکس ترشح شده حاوی مقدار زیادی رشته بود. البته در این مطالعه وجود کلاژن نوع I را در غضروف با روش RT-PCR بررسی نشد ولی با توجه به این که رشته کلاژن نوع I فیبر تشکیل می‌دهد به نظر می‌رسد در غضروف تولید شده مقداری کلاژن غیر اختصاصی غضروف هیالین نیز تولید شده است.

امروزه گرایش زیادی به استفاده ازسلول‌های بنیادی مزانشیمی در بازسازی بافت غضروف مفصلی آسیب دیده وجود دارد. با توجه به این رویکرد که معتقد است سلول مزانشیمی بهتر است قبل از پیوند در ضایعات غضروفی به بافت حاوی سلول‌های ترمینال غضروفی تمایز داده شود(۲۰)، به نظر می‌رسد که سیستم کشت Micro mass به عنوان سیستم تمایز به غضروف، سیستم مناسبی برای مقاصد بالینی نباشد زیرا سلول‌های تولید شده در این سیستم، اولا از لحاظ فراساختار کاملا شبیه سلول‌های بالغ کندروسیت واقع در غضروف هیالین نبودند. ثانیا ماتریکس ترشح شده در غضروف حاصل از تمایز، مقدار زیادی کلاژن غیر اختصاصی (احتمالا کلاژن نوع I) داشت به عبارتی این غضروف از لحاظ ساختار کاملا هیالین نبوده و درجاتی ازخواص غضروف فیبرو را داشت.

درمجموع می‌توان گفت که حاصل تمایز سلول‌های مزانشیمی درسیستم کشت Micro mass، بافت غضروفی است که از لحاظ ساختار خصوصیات کلی تعریف شده برای غضروف طبیعی را دارد ولی جزئیات فرا ساختاری غضروف کاملا طبیعی در این غضروف ایجاد نمی‌شود. به نظر می‌رسد این غضروف مناسب مقاصد بالینی نیست زیرا از لحاظ ساختار کاملا هیالین نبوده و درجاتی از ساختار غضروف فیبرو را نشان می‌دهد.

Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

www.SID.ir

سپاسگزاری

مطالعه حاضر با حمایت‌های مالی سازمان گسترش و نوسازی صنایع انجام گرفته است. بدین وسیله نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را ابراز می‌نماید.

فهرست منابع

1. Buckwalter JA. Articular cartilage injuries. ***Clin. Orthop.*** 2002; 402: 21-37.
2. Martin JA, Buckwalter JA. Aging, articular cartilage chodrocyte senescence and osteoarthritis. ***Biogerontology.*** 2002; 3: 357-264.
3. Hardingham T, Tew S, Murdoch A. Tissue engineering: chondrocytes and cartilage. ***Arthritis Res.*** 2002; 4: 563-568.
4. Mitchell N, sheparol N. The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone. ***J. Bone joint surg. Am.*** 1976; 58: 230-233.
5. Mankin H, Mow V, Buchwalter J. Form and function of articular cartilage. In: ***simon S, ed. Orthopaedic Basic science.*** Rosemont, IL: American Academy of orthopaedic surgeons. 1994: 443-470.
6. Frenkel SR, Clancy RM, Ricci JL, Di Cesare PE, Rediske JJ, Abramson SB. Effects of nitric oxide on chondrucyte migration, adhesion, and cytoskeletal assembly. ***Arthritis Rheum.*** 1996; 39: 1905- 1912.
7. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage:degeneration and osteoarthritis, repair regeneration, and transplantation. ***Instr. Course. Lect.*** 1998; 47: 487-504.
8. Frenkel SR, Di cesare PE. Scaffolds for articular cartilage repair. ***Am. Biomed. Eng.*** 2004; 32: 26-34.
9. Brittberg MM, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. ***N. Engl. J. Med.*** 1994; 331: 889-895.
10. Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. ***Matrix Biol.*** 2003; 22: 81-91.
11. Peterson L, Minas T, Brittberg M, Lindhal A. Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation: results at two to ten years. ***J. Bone Joint Surg. Am.*** 2003; 85: A Suppl 2: 17-24.
12. Peterson L,Minas T,Brittberg M, Nilsson A, Sjogren- Jansson E, Lindhal A. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. ***Clin. Orthop.*** 2000; 374: 212-234.

Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

www.SID.ir

13. Richardson JB, Caterson B, Erans EH, Ashton BA, Roberts S. Repair of human articular cartilage after implantation of autologuse chondrocyte. ***J. Bone. Joint Surg. Br.*** 1999; 81: 1064-1068.
14. Dozin B, Malpeli M, Camardella L, Cancedda R, Pietrangelo A. Response of young, aged and osteorthritic human articular chondrocytse to inflammatory cytokines: molecular and cellular aspects. ***Matrix Biol.*** 2002; 21: 449-459.
15. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth, kinetics, self-ren-wal, and the osteogenie potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopresevation. ***J. cell Biochem.*** 1997; 64: 278-294.
16. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in culture of plastic-adherent cells from human bone marrow. ***Peoc. Nah. Acad. Sci.*** U.S.A. 2000; 97: 3213-3218.
17. Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Brnder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. ***Cell Transplant.***1997; 6: 125-134.
18. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogensis of bone marrow-drived mesenchymal stem cells. ***Exp. cell Res.*** 1998; 238: 265-272.
19. Sekiya I, Vuoristo JT, Larson BL, Prockop DJ. In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. ***Dev. Biol.*** 2002; 99: 4397-4402.
20. Heng BC, Cao T, Lee H. Directing stem cell differentiation into the chondrogenic lineage in vitro. ***Stem Cells.*** 2004; 22: 1152-1167.
21. Manning WK, Bonner WM JR. Isolation and culture of chondrocytes from human adult articular cartilage. ***Arthritis Rheum.*** 1967; 10: 235-239.
22. Johnstone B. Mesenchymal stem cells and chondrogenesis. ***Europ. Cell Mat.*** 2002; P: 27.
23. Sun S, Guo Z, Xiao X, Liu B, Liu X, Tang PH, Mao N.Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method. ***Stem cells*** .2003; 21: 527-535.
24. Tropel P, Noel D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Berger F. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. ***Exp. Cell. Res.*** 2004; 295: 395-406.
25. 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: 361-370.

Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

www.SID.ir