

زیست پلیمر آلزینات بعنوان بستر سه بعدی جهت کشت و تمایز سلول‌های بنیادین مزانشیمی بافت چربی انسان به سلول‌های کندروسیت غضروف

عبدالخالق دیزجی*، لعی‌ا هدایی و زهرا سهیلا سهیلی

تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، علوم پایه، گروه بیوشیمی

تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۱۲

چکیده

هدف از مطالعه حاضر بررسی توانایی زیست پلیمر آلزینات به عنوان بستری برای تمایز سلول‌های مزانشیمی بافت چربی انسانی به سلول‌های کندروسیت می‌باشد. بدین منظور سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی انسانی افراد سالم توسط کلاژناز نوع I جداسازی و کشت داده شدند. سپس این سلول‌ها در بستر آلزینات با استفاده از اسید اسکوریک و $TGF-\beta 1$ به کندروسیت تمایز داده شدند. توانایی بستر آلزینات در تولید سلول‌های کندروسیت براساس بیان مارکرهای مولکولی مانند کلاژن نوع II به روش RT-PCR و همچنین بیان پروتئوگلیکان‌های سولفاته به روش رنگ آمیزی Alcian Blue انجام گرفت. رنگ آمیزی ایمونوشیمی با آنتی بادی بر علیه Vimentin نشانگر بالای ۹۵٪ از سلول‌های بنیادین مزانشیمی بود. در رنگ آمیزی Alcian Blue درصد سلول‌های رنگ شده در سلول‌های کنترل و سلول‌های کشت داده شده در بستر آلزینات به ترتیب در روز سوم 56.5 ± 4.9 و 0.7 ± 36.5 ٪ و در روز چهاردهم 93 ± 2.8 و 83 ± 2.8 ٪ بود. این یافته‌ها و نسبتها در روزهای سوم و پنجم از نظر آماری اختلاف معنی‌دار با هم داشتند. درصد بیان کلاژن نوع II سلول‌های کنترل و سلول‌های کشت داده شده در بستر آلزینات به ترتیب در روز سوم 5 ± 70 و 4.5 ± 43 ٪ و در روز چهاردهم 1.4 ± 77 و 2.8 ± 54 ٪ نسبت به بیان ژن GAPDH می‌باشد. بطور کلی نتایج حاصل کاربری سیستم آلزینات را در مهندسی بافت برای تولید کندروسیت پیشنهاد می‌کند.

واژه‌های کلیدی: سلول مزانشیمی بافت چربی انسانی، داربست آلزینات، تمایز به کندروسیت

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۴۴۷۸۷۳۷۷، پست الکترونیکی: deezagi@nigeb.ac.ir

مقدمه

خاص از منبع سلولی مناسب، رشد و تکثیر آنها در داربست‌های سه بعدی تحت شرایط کشت سلولی مناسب در محیط *In vitro* و در نهایت قرار دادن این مجموعه در محل مناسب در بدن بیمار و هدایت تشکیل بافت جدید در میان داربست می‌باشد. استفاده از منبع سلولی مناسب به ویژه سلول‌های بدست آمده از فرد بیمار تا حدود زیادی موجب کاهش مشکلات مربوط به سیستم ایمنی می‌گردد (۲۰). با معرفی و شناخت پتانسیل سلول‌های بنیادی در دو دهه گذشته این سلول‌ها جایگاه ویژه‌ای را در مهندسی بافت پیدا کرده اند. سلول‌های بنیادی سلول‌هایی تمایز

هدف اصلی در مهندسی بافت بازسازی و یا تولید بافت یا اندام سالم برای جایگزینی بافت‌های ناسالم و یا ترمیم بافت‌های آسیب دیده یک بیمار می‌باشد. ظرفیت محدود سلول‌های بالغ یک بافت از نظر تقسیم سلولی و تکثیر و تمایز آنها به سلول‌های تمایز یافته و بخصوص عدم رگ-زایی کافی این سلول‌ها در محیط آزمایشگاهی از محدودیت کاربردی آنها در مهندسی بافت می‌باشد. سه جز اصلی شکل‌گیری یک بافت در مهندسی بافت نوع سلول، داربست و فاکتورهای رشد مورد استفاده می‌باشند (۱۲). لذا مهندسی بافت شامل جداسازی سلول‌های ویژه و

نیافته می‌باشند که توسط دو خصوصیت خود نوسازی (Self-renewal) و توانایی تولید انواع مختلف سلول‌های اختصاصی و اجدادی مشخص می‌شوند. در استفاده از این سلول‌ها در مهندسی بافت در جهت افزایش بازدهی، محققین با دیدگاه‌های مختلف عوامل متفاوتی را بررسی می‌کنند. از مهمترین آنها می‌توان به بررسی پتانسیل سلول‌های بنیادی از منابع مختلف بافتی، عوامل و فاکتورهای مؤثر در رشد، عوامل القا کننده تمایز و همچنین عوامل ایجاد کننده بستر و Microenvironment و... اشاره کرد. از میان سلول‌های بنیادی فرد بالغ، سلول‌های بنیادی مزانشیمی منابع مناسبی برای مهندسی بافت می‌باشند (۲۳). این سلول‌ها براحتی از بافت‌های گوناگون نظیر مغز استخوان، بافت چربی و ... جداسازی و بدون از دست دادن ظرفیت و توانایی خود نوسازی خود در محیط *in vitro* کشت داده می‌شوند و در نهایت توانایی تمایز به سلول‌هایی نظیر کندروسیت‌ها، آدیپوسیت‌ها و... را دارند (۱۷). سلول‌های بنیادی مزانشیمال جمعیتی از سلول‌های بنیادین سوماتیک چندتوانه می‌باشند که تاکنون در بافت‌هایی نظیر: مغز استخوان، ماهیچه اسکلتی، مغز، بافت چربی، خون بندناف، خون محیطی و بافت‌های پیوندی پوستی شناسایی شده‌اند. سلول‌های مزانشیمی، برای مارکرهای سطحی شامل (CD 29, 44, 105, 106 and 166) 73, 90 مثبت بوده و فاقد مارکرهای سطحی هماتوپوئیتیک و HLA-DR می‌باشند (۳). این سلول‌ها صرف‌نظر از منبع مربوط به آن، در پاره‌ای از خصوصیات نظیر: توانایی تکثیر و خود نوسازی طولانی مدت تحت شرایط کنترل شده کشت سلول، مرفولوژی دوکی شکل - فیروبلاست مانند و پتانسیل تمایز به دودمان مزودرمی و حتی غیر مزودرمی، مشترک می‌باشند (۱۹). سلول‌های مزانشیمی، پتانسیل تمایز به سلول‌های مزودرم احشایی، استئوبلاست، آدیپوسیت، کندروسیت و مایوسیت، را دارا می‌باشند. همچنین مطالعات اخیر نشان داده‌اند که در ریز محیط مناسب، سلول‌های مزانشیمی می‌توانند به کاردیومیوسیت و یا حتی

سلول‌هایی از مشتقات غیر مزودرمی نظیر هپاتوسیت‌ها و نورون‌ها، تمایز یابند. تمامی خصوصیات ذکر شده، سلول‌های بنیادی مزانشیمال را تبدیل به منبع سلولی مناسبی جهت کاربرد در مهندسی بافت و سلول درمانی ساخته است (۸). مشخص شده است که سلول‌های بنیادین مزانشیمی بدست آمده از بافت چربی (ADMSCs) و مغز استخوان (BDMSCs) هیچ یک از آنتی ژن‌های تحریکی نظیر آنتی ژن‌های نوع دو HLA و همچنین مولکول‌های هم-تحریکی نظیر (CD۸۵ و CD۸۰) را یا بیان نمی‌کنند و یا در سطح بسیار ناچیزی بیان می‌کنند و به طور کلی این سلول‌ها ذاتاً ایمنوژنیک نبوده و استفاده از این سلول‌ها در مهندسی بافت دارای اثرات تعدیل‌کنندگی سیستم ایمنی نیز می‌باشد (۵). از دیگر مسائل مطرح در مهندسی بافت تهیه و آماده سازی داربست‌های طبیعی و سنتتیک به عنوان بستر و ماتریکسی برای تکثیر و تمایز سلول‌ها در محیط *in vitro* می‌باشد (۹). پلیمرهای سنتزی (مانند آلژینات) که تحت شرایط کنترل شده تولید می‌شوند می‌توانند برای مهندسی بافت مفید باشند. در رابطه با پلیمرهای سنتزی ویژگی‌هایی نظیر خواص مکانیکی، هندسه، شیمی سطح، تعداد منافذ و... باید در نظر گرفته شود (۱۶). تاکنون مطالعات و تحقیقات زیادی در رابطه با بکارگیری سلول‌های بنیادی و تمایز آنها به بافت‌هایی نظیر بافت استخوان، غضروف و... صورت گرفته است. از جمله می‌توان تمایز سلول‌های بنیادی بدست آمده از مغز استخوان با استفاده از داربست‌های هیبریدی بتا-تری کلسیم فسفات-آلژینات-ژلاتین، تمایز سلول‌های مزانشیمی بدست آمده از مغز استخوان به سلول‌های کندروسیت در بستری از آلژینات را ذکر کرد (۴، ۱۰، ۱۴ و ۱۸). با توجه به موارد ذکر شده هدف از مطالعه حاضر بررسی توانایی آلژینات به عنوان ماتریکسی برای سلول‌های مزانشیمی بدست آمده از بافت چربی انسانی در تمایز این سلول‌ها به سلول‌های کندروسیت می‌باشد.

مواد و روشها

cyto chemistry: پس از تهیه لام از سلول‌های جداسازی شده توسط دستگاه سیتوسانتریفوژ Cell Spin(Tharmac) (دور ۱۵۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه)، سلول‌ها ابتدا توسط متانول در دمای 10°C به مدت ۵ دقیقه تثبیت شدند. سپس نمونه‌ها با محلول بلوکه کننده (محلول بافر فسفات سالین PBST حاوی ۱٪ سرم موشی) به مدت ۲۰ دقیقه، به منظور مهار اتصال‌های غیر اختصاصی آنتی‌بادی انکوبه شدند. پس از پایان ۲۰ دقیقه شستشو با PBST انجام گرفت. سپس آنتی‌بادی اولیه Monoclonal Mouse Anti-human vimentin (DAKO) با غلظت $2\mu\text{g/ml}$ در محلول PBST حاوی ۱/۵٪ سرم موشی اضافه و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از سه بار شستشو با محلول PBST نمونه‌ها توسط آنتی‌بادی ثانویه Goat Anti Mouse IgG Peroxidase conjugated (شرکت Calbiochem) با غلظت $1\mu\text{g/ml}$ در محلول PBST به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. لام‌ها بعد از سه بار شستشو با PBST با سوبسترای دی‌آمینو بنزیدین DAB انکوبه شده و بعد از شستشو جهت میانکنش اختصاصی مورد بررسی قرار گرفتند.

لام‌های تهیه شده در زیر میکروسکوپ بررسی و در هر لام ۲۰۰ سلول جهت شناسایی درصد سلول‌های رنگ شده و رنگ نشده شمارش گردید.

تهیه بستر و مهره‌های آلژینات: تهیه بستر سه بعدی و مهره‌های آلژینات برای کشت سلول‌های مزانشیمی براساس روش کار Bucco و همکارانش انجام گرفت. روش کار بطور خلاصه به شرح زیر است. مهره‌های آلژینات از طریق مخلوط سازی ۲ الی ۳ میلیون سلول بصورت سوسپانسیون سلولی ($2-3 \times 10^6$ سلول در هر ۱ml) با ۳ml آلژینات ۴٪ (low-Viscosity Alginic) acid, Sigma, St.Louis, MO, USA تهیه شدند. سوسپانسیون حاصل به سرنگ ۱۰cc استریل انتقال داده شد و از میان سوزن ۲۱ درجه به روش قطره‌ای بیان شدند. سپس عمل ژلاسیون

جداسازی سلول‌های مزانشیمی: بافت چربی زیر جلدی انسانی از طریق آسپیراسیون بافت چربی زیر جلدی از افراد سالم با رضایت بیماران توسط جراح تهیه شد. لیپوآسپیره حاصل به دفعات توسط بافر شستشو دهنده (Hanks Balanced Salt Sigma, St.Louis, MO, USA) Solution (HBSS) (حاوی ۲۰۰mg استرپتومایسین (Fluka, Switzerland) و ۱۲۰mg پنی‌سیلین (Fulka, Switzerland) شستشو داده شد. سپس عمل هضم بافت توسط 0.25mg/ml کلاژناز نوع I (200unit/mg) (شرکت Calbiochem) در محلول HBSS به مدت ۲ ساعت در 37°C صورت گرفت سپس سلول‌های آدیپوسیت شناور از طریق سانتریفوژ از سلول‌های بنیادی ته نشین شده جداسازی شدند.

شمارش سلولی و تعیین درصد سلول‌های زنده: در تمام مراحل کار برای شمارش سلولی از رنگ متیلن بلو و... برای تعیین درصد سلول‌های زنده از روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو استفاده شد، تعداد کل سلولی و درصد سلول‌های زنده با استفاده از لام نئوبار (Hemocytometer) در زیر میکروسکوپ نوری شمارش شد.

کشت سلول‌های مزانشیمی: سلول‌های حاصل در فلاسک‌های کشت سلول 75cm^2 و در محیط کشت سلولی Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (FBS (Fetal Bovine (Gibco, Grand Island, NY), 20% Serum)، ۲۰۰mg استرپتومایسین و ۱۲۰mg پنی‌سیلین، به تعداد تقریبی 5000 cell/cm^2 کشت داده شدند. محیط کشت هر ۳ روز یکبار تعویض شد. پس از پر شدن فلاسک‌ها توسط سلول‌های اولیه، سلول‌ها با استفاده از ۲۵٪ تریپسین-EDTA ۱mM جداسازی شده و به مدت ۲ هفته در محیط یک بعدی کشت داده شدند. پس از ۲-۴ پاساژ سلول‌ها در محیط سه بعدی آلژینات کشت و به سلول‌های کندروسیت تمایز داده شدند.

شناسایی و تعیین خصوصیات سلول‌های مزانشیمی جداسازی شده به روش ایمونوسیتوشیمی Immuno

دقیقه قرار گرفتند و در نهایت پس از شستشو با آب مقطر، لامل‌ها با ریختن یک قطره چسب هیستوشیمی بر روی لامل‌ها قرار گرفتند. لام‌های تهیه شده در زیر میکروسکوپ بررسی و در هر لام ۲۰۰ سلول جهت شناسایی سلول‌های رنگ شده و رنگ نشده شمارش گردید.

استخراج RNA و انجام RT-PCR برای بیان ژن کلاژن نوع II: استخراج RNA کل به صورت‌های مختلف انجام می‌شود. در این تحقیق استخراج RNA با استفاده از محلول RNX (شرکت سینا ژن) انجام گرفت. جهت خارج سازی سلول‌ها از مهره‌های آلزینات و در نهایت استخراج RNA کل، پس از خارج نمودن محیط کشت، مهره‌ها توسط محلول بافر PBS شستشو داده شدند و سپس محلول EDTA ۴۰mM به مدت ۱۵ دقیقه جهت هضم آلزینات به پلینت اضافه گردید و در پایان با انجام سانتیفریژ (دور ۲۰۰۰g، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد) سلول‌ها رسوب داده شده و آلزینات و EDTA از محیط حذف شدند. پس از جمع‌آوری و رسوب‌دهی سلول‌ها، به ازای هر ۱ میلیون سلول معادل ۱ میلی‌لیتر محلول RNX به ویال‌های مورد نظر افزوده گردید. سپس ویال‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. لیز بیشتر سلول‌ها، توسط سرنگ ۱ml به همراه سرسرنج درجه ۲۰ صورت گرفت. برای این منظور سوسپانسیون سلولی ۲۰ مرتبه از داخل سرنگ عبور داده شد.

پس از تعیین غلظت RNAهای استخراج شده، از مقدار غلظت یکسان ۱۳۰۰ng RNA، برای ساخت cDNA استفاده شد. ساخت cDNA طبق روش کیت Fermentase با اضافه کردن میزان RNAهای تعیین شده به مواد ارائه شده در کیت، به صورت یک مرحله‌ای در دستگاه PCR انجام گرفت.

پس از سنتز cDNA، واکنش PCR به منظور ردیابی بیان ژن کلاژن تیپ دو (به عنوان ژن اختصاصی سلول‌های کندروسیت) و ژن GAPDH (به عنوان Housekeeping

مهره‌ها به طور آبی در ۵ml محلول CaCl_2 mM ۱۰۲ در پلیت ۶-Well (۲۰مهره در هر خانه، هر مهره به طور تقریبی شامل $10^4 \times 5$) صورت گرفت. سپس مهره‌ها به مدت ۱۵ دقیقه به منظور ژلاسیون بیشتر در داخل محلول CaCl_2 قرار گرفتند. پس از آن مهره‌ها سه بار توسط DMEM-HG (DMEM- NaCl mM ۰/۱۵ و یکبار توسط high glucose) شستشو داده شدند. مهره‌ها سپس به مدت ۱۴ روز در محیط تمایزی شامل DMEM-HG، مکمل (ITS⁺, Roche, insulin- Transferrin- Selenium 1×10^{-8} ، TGF- $\beta 1$ (Roche) ۱۰ ng/ml و ۵۰ μg آسکوربیک اسید کشت داده شدند. محیط ذکر شده هر سه روز یکبار تعویض شد.

تهیه بلوک از مهره‌های آلزینات حاوی سلول‌ها و رنگ-آمیزی Alcian blue: مهره‌های آلزینات حاوی سلول‌های تیمار شده جمع‌آوری و به مدت ۲۴ ساعت در پارافمالدئید ۴٪ در دمای ۴°C تثبیت شدند. سپس سه بار توسط محلول بافر PBS شستشو و مراحل آگیری توسط درجات صعودی الکل صورت گرفت. سپس عمل پارافینه کردن بر اساس روش‌های پارافینه کردن استاندارد صورت گرفت. مهره‌های پارافینه شده حاصل توسط دستگاه میکروتوم به ضخامت ۵ μm برش داده شدند و در نهایت برای شناسایی پروتئوگلیکان‌های سولفاته توسط (Alcian blue (Sigma St.Louis, MO, USA براساس روش کار Steedman رنگ‌آمیزی شدند (۲۱).

برای رنگ‌آمیزی نمونه‌ها در ابتدا عمل آبدهی به ترتیب با قرارگیری نمونه‌های پارافینه شده در Xylene در دو تکرار دقیقه‌ای و سپس با قرارگیری در درجات نزولی الکل شامل الکل‌های ۱۰۰، ۹۰ و ۷۰٪ و هر مرحله به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق، صورت پذیرفت. سپس برای رنگ‌آمیزی، در ابتدا نمونه‌ها و اسیداستیک ۳٪ هر کدام به مدت ۵ دقیقه، سپس به مدت ۳۰ دقیقه در رنگ Alcian blue و پس از شستشو با آب مقطر در رنگ Neutlar fast red به مدت ۱۰

به آنها اشاره شد. در زمان استفاده از آنزیم تریپسین-EDTA، ۹۹٪ سلول‌های جداسازی شده شامل سلول‌های آدیپوسیت بودند و تنها یک درصد سلول‌های جداسازی شده را سلول‌های مزانشیمی تشکیل می‌دادند چرا که این آنزیم به طور کامل، قادر به هضم بافت چربی نمی‌باشد. که این امر، دال بر عدم کارایی موفق این آنزیم جهت جداسازی سلول‌های مزانشیمی از این بافت می‌باشد. در عوض آنزیم کلاژناز تیپ یک، آنزیم مؤثری جهت تفکیک بافت و جداسازی سلول‌ها می‌باشد.

درصد بقای سلولی در تمامی تکرارها بالای ۹۸٪ تعیین شد. شایان ذکر است با توجه به محدوده سنی افرادی که مورد عمل قرار گرفته بودند (۲۵-۳۵ سال)، در مورد تمامی نمونه‌های تهیه شده توان بقای سلولی و ورود سلول‌های بنیادی به حالت فیزیولوژیک فعال، جهت انجام تست‌های بعدی به طور مشابهی یکسان بود.

در جدول ۱ شمارش سلول‌ها بعد از مرحله جداسازی نشان داده شده است، نتایج نشان می‌دهد که صرف نظر از حجم‌های متفاوت از نمونه لیپوآسپییره (۱۰۰-۴۰ ml) داده-ها از نظر تعداد سلول‌های بدست آمده از روند خاصی تبعیت می‌کند نتایج تعداد سلول‌ها در مرحله نهایی تا حد زیادی منطقی است و از یک روند مشخص مطابق با داده-های موجود در مقالات تبعیت می‌کند.

جدول ۱- درصد نهایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از نمونه لیپوآسپییره

نمونه	تریپسین- (T)EDTA	حجم اولیه نمونه (ml)	حجم نهایی نمونه (پس از حذف بخش خونی (ml)	وزن نهایی نمونه (پس از حذف بخش خونی) (gr)	تعداد کل سلول‌های موجود در بافت* (تعداد سلول‌ها × وزن نهایی بافت)	تعداد سلول‌های مزانشیمی پس از هضم بافت چربی	درصد سلول‌های مزانشیمی جداسازی شده به تعداد کل سلول ها
	کلاژناز تیپ (C) I						
۱	T	۱۰۰	۵۵	۱۰	4×10^9	۰	۰
۲	C	۶۰	۵۰	۱۰۱	$4/04 \times 10^{10}$	$2/04 \times 10^5$	$5/07 \times 10^{-3}$
۳	C	۴۰	۲۳	۵۹	$2/36 \times 10^{10}$	1×10^5	$4/23 \times 10^{-3}$
۴	C	۹۰	۶۵	۸۰	$3/2 \times 10^{10}$	3×10^5	$9/37 \times 10^{-3}$
۵	C	۵۰	۴۲	۷۱/۲	$2/85 \times 10^{10}$	$1/45 \times 10^5$	$5/08 \times 10^{-3}$
۶	C	۵۵	۴۰	۷۰	$2/8 \times 10^{10}$	$1/15 \times 10^5$	$4/1 \times 10^{-3}$
۷	C	۷۵	۶۴	۹۵	$3/8 \times 10^{10}$	$2/1 \times 10^5$	$5/52 \times 10^{-3}$

(gene) صورت پذیرفت. پس از تهیه مخلوط واکنش (ذکر شده در بخش مواد) و ورتکس کردن، مجموعه مذکور به دستگاه Thermal cycler منتقل گردید.

محصولات پس از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز در محلول اتیدیوم بروماید به مدت ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. پس از رنگ‌آمیزی و شستن ژل در آب مقطر، تصویر ژل توسط دستگاه UV Transluminator مشاهده و توسط دستگاه UV tec عکسبرداری گردید. با توجه به پرایمرهای انتخاب شده، طول قطعات سنتز شده مربوط به GAPDH و کلاژن تیپ دو به ترتیب برابر ۵۲۰ و ۳۶۱ bp می‌باشد. باندهای حاصل توسط برنامه Total Lab به صورت کمی در آمدند و سپس عمل نرمال سازی داده‌ها بوسیله داده‌های مربوط به Housekeeping gene صورت گرفت.

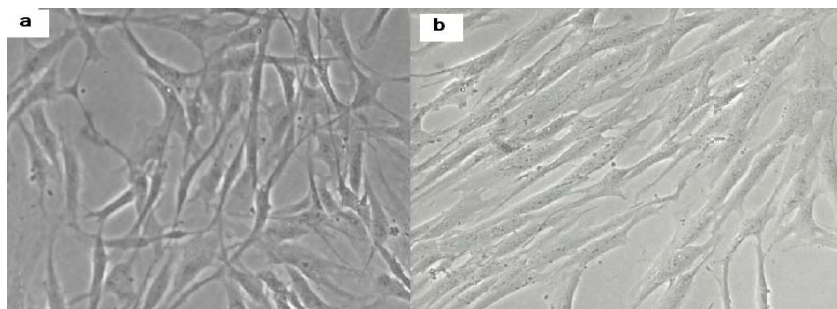
روش‌های آماری: برای آنالیز آماری نتایج به دست آمده از برنامه One way Anova به صورت online استفاده شد.

یافته‌ها

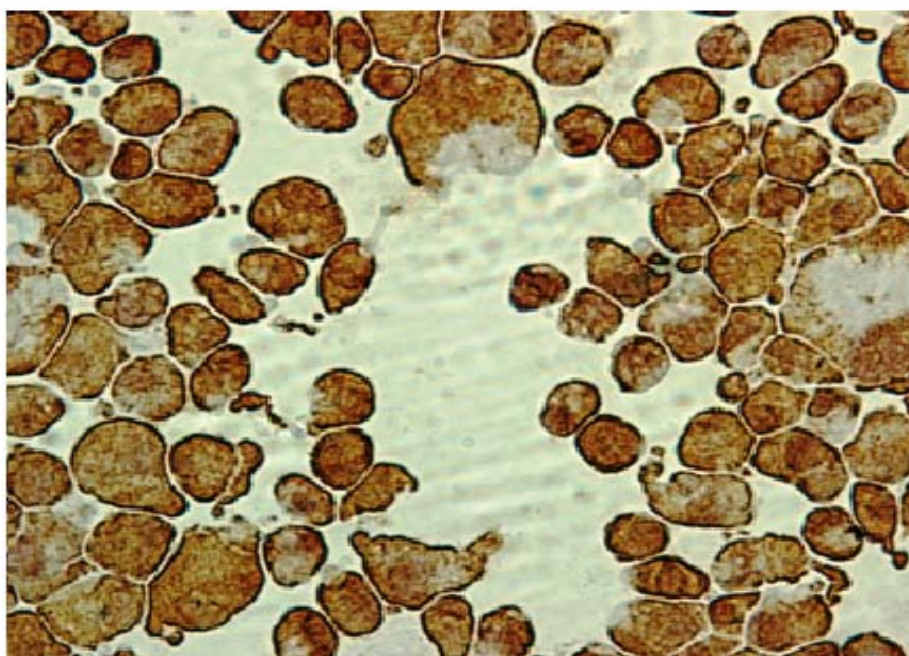
جداسازی و هضم آنزیمی بافت: نمونه‌های لیپوآسپییره تهیه شده دارای حجم تقریبی بین ۴۰-۱۰۰ ml بوده و وزن آن‌ها پس از اندازه‌گیری در حدود ۱۴۰-۸۰ gr برآورد شد. جهت جداسازی سلول‌ها از دو آنزیم تریپسین-EDTA و کلاژناز تیپ یک استفاده به عمل آمد که در بخش مواد و روش‌ها

رطوبت و دمای 37°C نگهداری شدند و با تراکم 5×10^4 سلول در هر سانتی‌متر مربع در ظروف کشت سلولی کشت داده می‌شدند و در نهایت پس از ۸-۷ پاساژ برای انجام تست‌های ذکر شده در بخش روش‌ها استفاده می‌شدند. شایان به ذکر است که سلول‌ها در تمامی پاساژها دارای خصوصیات مرفولوژیک یکسان بوده و تفاوتی در ظاهر و باقی‌مانده آن‌ها مشاهده نشد (شکل ۱).

کشت سلول‌های بنیادین مزانشیمی: سلول‌های بنیادین مزانشیمی سلول‌های چسبیده هستند که از لحاظ مرفولوژیک، بسیار شبیه سلول‌های فیروبیلاست می‌باشند و در محیط کشت سلولی به صورت اشکال دوکی شکل و کشیده، همراه با زوائد سیتوپلاسمی منشعب مشاهده می‌شوند. این سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی ۲۰٪ سرم FBS و در انکوباتور در شرایط CO_2 ۵٪، ۹۵٪



شکل ۱- a- سلول‌های مزانشیمی در پاساژ دوم b- سلول‌های مزانشیمی در پاساژ هشتم (بزرگنمایی 32×10)



شکل ۲- تصویر سلول‌های مزانشیمی در روش ایمونوهیستوشیمی با آنتی‌بادی بر علیه Vimentin میانکنش داده و سپس توسط سوبسترای DAB در طی واکنش آنزیمی رنگ شده‌اند (بزرگنمایی 40×10).

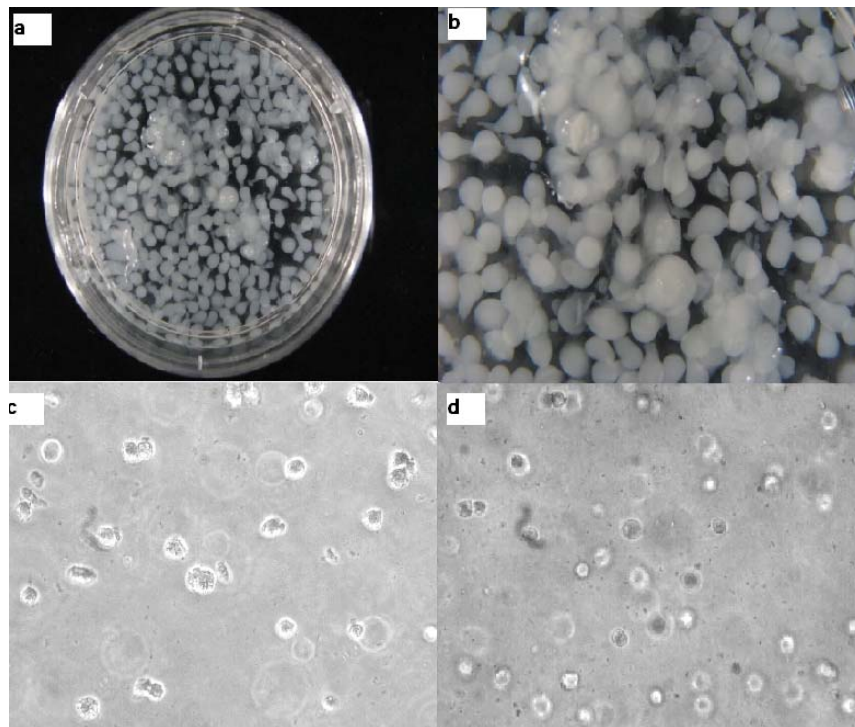
بکارگیری آنتی‌بادی Monoclonal mouse anti-vimentin که قادر به نشانه‌گذاری سلول‌های مزانشیمی استفاده شد. پس از انجام آزمایش و مشاهده سلول‌ها در زیر

شناسایی سلول‌های مزانشیمی جداسازی شده به روش ICC: به منظور تأیید سلول‌های جداسازی شده به عنوان سلول‌های بنیادین مزانشیمی از روش ICC و

کندروسیت در داخل مهره‌های آلژینات و بر روی ظروف کشت سلولی معمول به عنوان کنترل، کشت داده شدند و برای تمایز محیط تمایزی مطرح شده در بخش مواد به آن-ها افزوده گردید و هر سه روز یکبار این محیط تعویض شد. آنچه در رابطه با سلول‌های کشت داده شده در ظروف کشت طبیعی (کنترل) بیشتر سلول‌ها چسبندگی خود را با سطح حفظ کرده، اما در ارتباط با مهره‌های آلژینات سلول‌ها پس از قرارگرفتن در مهره‌های آلژینات سلول‌ها به صورت گرد در داخل مهره‌ها مشاهده شدند (شکل ۳).

میکروسکوپ، ۹۹٪ سلول‌های شمارش شده، توسط این آنتی‌بادی شناسایی شده و در رنگ‌آمیزی نهایی توسط رنگ DAB به رنگ قهوه‌ای درآمده بودند، که این نتایج دال بر خلوص سلول‌های جداسازی شده به عنوان سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشند (شکل ۲).

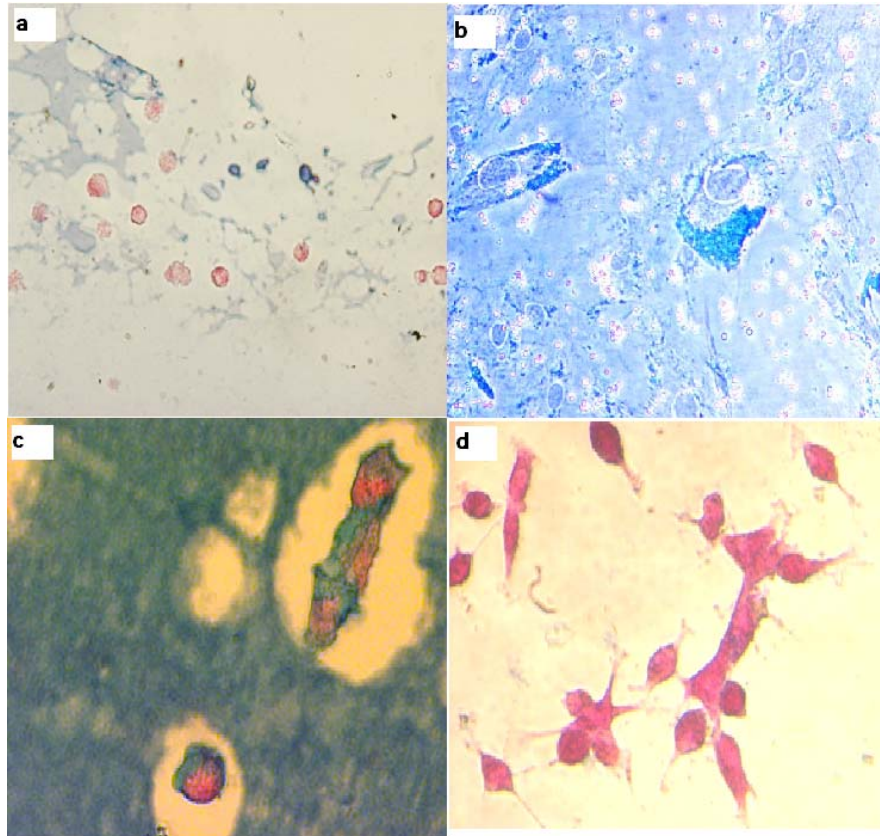
تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های کندروسیت با بکارگیری داربست‌های آلژینات: پس از تأیید سلول‌های جداسازی شده، به عنوان سلول‌های مزانشیمی و تکثیر آن-ها، در نهایت این سلول‌ها جهت تمایز به سلول‌های



شکل ۳- تصویر مهره‌های آلژینات تهیه شده به روش قطره ای a- بزرگنمایی 1×10 -b بزرگنمایی 5×10 -c,d - تصویر سلول‌ها درون مهره‌های آلژینات بزرگنمایی 10×32

و ۱۴ توسط آلشین بلو رنگ‌آمیزی شدند و در هر بار ۲۰۰ سلول جهت تعیین سلول‌های مثبت (سلول‌های رنگ شده) و سلول‌های منفی (سلول‌های رنگ نشده)، شمارش گردید. در اثر سلول رنگ‌آمیزی سلول‌ها توسط آلشین بلو بخش‌های رنگ شده به رنگ آبی و هسته و سیتوپلاسم در نتیجه رنگ‌آمیزی بوسیله رنگ Neutar fast red به رنگ صورتی در می‌آیند (شکل ۴).

رنگ آمیزی Alcian blue: رنگ‌آمیزی فوق به منظور شناسایی گلیکوزآمینوگلیکان‌های سولفاته (GAG_s) (که به طور فراوان در ماتریکس خارج سلولی کندروسیت‌ها وجود دارند) و جهت تأیید تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های کندروسیت، انجام شد. برای این منظور سلول‌های کنترل و سلول‌های درون مهره‌های آلژینات به روش-های شرح داده شده در بخش روش‌ها در روزهای ۳، ۵، ۷

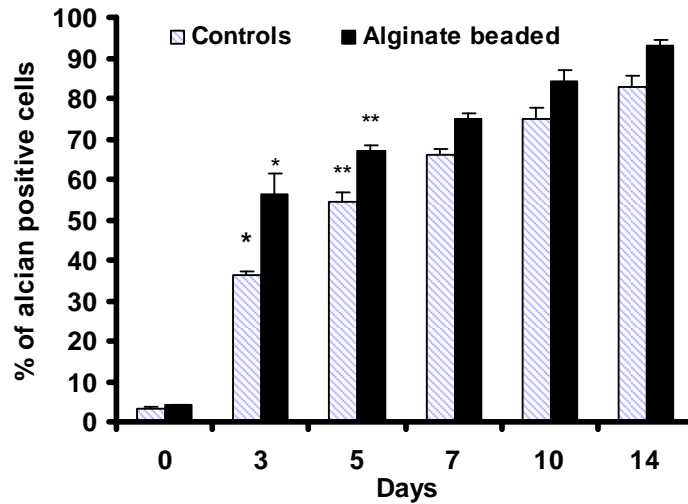


شکل ۴- تصویر سلول های مزانشیمی تمایز یافته به سلولهای کندروسیت در بستر آلژینات که با رنگ آمیزی آلبین بلو رنگ شده اند a - بزرگنمایی ۱۰× ۱۰- b بزرگنمایی ۴۰× ۱۰- c تصویر سلول ها درون مهره های آلژینات بزرگنمایی ۱۰× ۳۲- d سلولهای کنترل بزرگنمایی ۱۰× ۴۰

بیان کلاژن نوع II به روش RT-PCR: استخراج RNA-
 ی کل از نمونه‌های کنترل و نمونه‌های مربوط به آلژینات در روزهای ۳، ۵، ۷، ۱۰ و ۱۴ به منظور استفاده در RT-PCR انجام گرفت. میزان خلوص RNA استخراج شده از نمونه‌ها، بوسیله اندازه‌گیری نسبت جذب $260/280$ نانومتر تعیین گردید. پس از تعیین غلظت‌های استخراج شده، با توجه به کمترین غلظت استخراج شده میزان یکسان 1300 نانوگرم RNA از تمامی نمونه‌ها جهت ساخت cDNA استفاده شد و در نهایت مطابق آنچه در بخش روش‌ها ارائه شد، واکنش PCR برای ژن‌های کلاژن تیپ دو (به عنوان مارکر سلول‌های کندروسیت) و ژن GAPDH (به عنوان Housekeeping gene) انجام شد و در پایان محصولات PCR بر روی ژل آگارز 2% برده شد که در شکل ۶ قابل مشاهده می‌باشد. با توجه به پرایمرهای انتخاب شده، طول

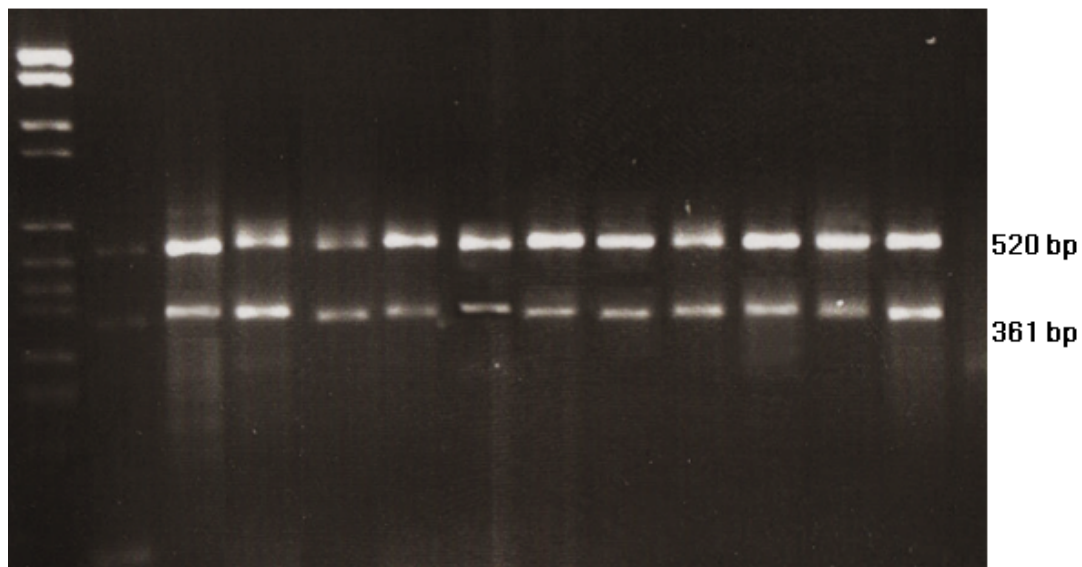
در رنگ‌آمیزی Alcian blue سلول‌های درون مهره‌های آلژینات به همراه محیط تمایزی در مقایسه با سلول‌های درون مهره‌ها در شرایط کنترل نشان دهنده بیان گلیکوپروتئوگلیکان‌های سولفاته و در نهایت تمایز این سلول‌ها به سلول‌های کندروسیت می‌باشد. لازم به ذکر است که آزمایش فوق سه بار تکرار گردید و نتایج حاصل از شمارش در شکل ۵ به صورت درصد میانگین سلول‌های مثبت در هر روز، قابل مشاهده می‌باشند. درصد سلول‌های رنگ شده در سلول‌های کنترل و سلول‌های کشت داده شده در بستر آلژینات به ترتیب در روز سوم $(4,9 \pm 56,5)$ و $(0,7 \pm 36,5)$ و در روز چهاردهم $(2,8 \pm 93)$ و $(2,8 \pm 83)$ نسبت به کل سلول‌های شمارش شده می‌باشد. این یافته‌ها و نسبتها در روزهای سوم و پنجم از نظر آماری اختلاف معنی‌دار با هم داشتند.

قطعات سنتز شده مربوط به GAPDH و کلاژن تیپ دو به ترتیب برابر ۵۲۰ و ۳۶۱ bp می باشد.



شکل ۵- نمودار درصد سلول های کنترل و کشت شده در بستر آلژینات رنگ شده توسط آئشین بلو در روز های ۳، ۵، ۷، ۱۰ و ۱۴.

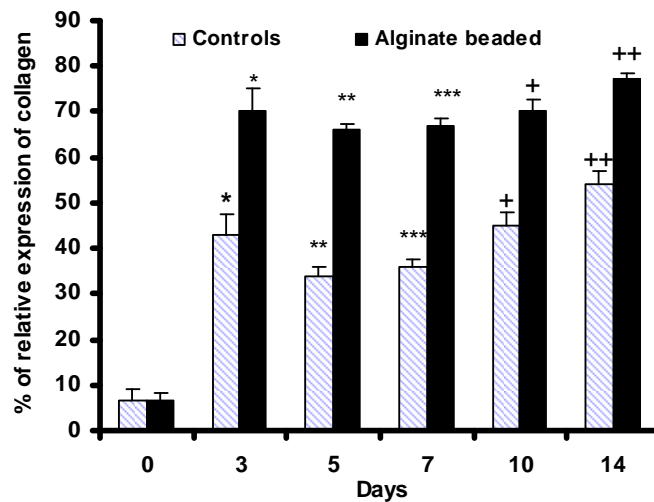
MW Neg Pos Pos C3 C5 C7 C14 Alg3 Alg5 Alg7 Alg10 Alg14



شکل ۶- تصویر الکتروفورز محصولات PCR مربوط به تکثیر توالی کلاژن تیپ دو و GAPDH بر روی ژل آگارز. MW- مارکر مولکولی DNA، Neg، Pos نمونه های کنترل مثبت و کنترل منفی. C3-5- نمونه های کنترل (به ترتیب روزهای ۳، ۵، ۷ و ۱۴). Alg3-14- نمونه های آلژینات (به ترتیب روزهای ۳، ۵، ۷ و ۱۰ و ۱۴).

نوع II در سلول های درون مهره های آلژینات مشاهده می شود. بطوریکه درصد بیان کلاژن نوع II سلولهای کنترل و کشت داده شده در بستر آلژینات به ترتیب در روز سوم (۷۰ ± ۴،۵ و ۴۳ ± ۱،۴) و در روز چهاردهم (۷۷ ± ۱،۴ و ۲،۸ ± ۵۴) نسبت به بیان ژن GAPDH می باشد.

باندهای حاصل توسط برنامه Total Lab به صورت کمی در آمدند و سپس عمل نرمال سازی داده ها بوسیله داده های مربوط به Housekeeping gene صورت گرفته و نتایج حاصل بر اساس داده های بدست آمده در شکل ۷ نشان داده شده است. با توجه به نمودار فوق، بیشترین بیان کلاژن



شکل ۷- درصد بیان کلاژن نوع دو در سلول‌های کنترل و آلژینات در روزهای ۳، ۵، ۷، ۱۰ و ۱۴

بحث

مناسب و امید بخش برای درمان آسیب‌های غضروفی می‌باشد (۷).

توانایی سلول‌های بنیادی مزانشیمال چه از منابع مغز استخوان و چه از بافت چربی در تمایز به سلول‌های غضروفی این سلول‌ها را منبع مناسبی برای ایجاد غضروف می‌سازد و فنوتیپ غضروفی و بقا آن در این سلول‌ها توسط $TGF-\beta_1$ القا می‌شود (۲۵).

در مطالعه صورت گرفته، نشان داده شد که بافت چربی انسانی، منبع بافتی مناسبی برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمال می‌باشد چرا که این بافت به راحتی و به طور روتین در مقادیر لیتری از جراحی‌های لیپوساکشن در دسترس می‌باشد و بازده سلولی آن (۵٪-۱) نسبت به منبع بافتی مغز استخوان (۰/۰۱-۰/۰۱٪) بسیار بالاتر می‌باشد (۱۵). سلول‌های بنیادی بدست آمده از بافت چربی hASC سلول‌هایی چندتوانه بوده و قادر به بیان خصوصیات بیوشیمیایی آدیپوسیت‌ها، استئوبلاست‌ها، کندروسیت‌ها و مایوسیت‌ها تحت شرایط کشت مناسب می‌باشند. همچنین نشان داده‌اند که قادر به برآورده ساختن بسیاری از انتظارات نظیر آنچه در بالا مطرح شد می‌باشند و توانایی تولید تعداد کافی سلول جهت کاربردهای مهندسی بافت را

تحقیقات جهت تولید بافت‌ها در محیط آزمایشگاهی قبل از کاشت در درون بدن، یک حوزه تحقیقاتی بسیار گسترده می‌باشد. این تحقیقات بیشتر تکیه بر کشت جمعیت‌های ویژه سلولی در Ex vivo در سطح و یا در داخل داربست‌های سنتزی و یا طبیعی که مناسب انتقال به بدن و پیوند عضو دارد. کنترل رفتار جمعیت سلولی در محیط Ex vivo و همچنین توجه به پاسخ آن‌ها در محیط میزبان بسیار مهم می‌باشد. ظرفیت محدود غضروف مفصلی در ترمیم و بازسازی ذاتی خود، به فقدان سیستم عروقی و همچنین به میزان کم و پراکنده سلول‌های کندروسیت در ماتریکس خارج سلولی در این بافت نسبت داده می‌شود و در پی این محدودیت، یک جراحی و آسیب کوچک منجر به صدمه و تخریب مفصل می‌شود. گرچه متدهای بی‌شماری نظیر Osteochondral allografting، Subchondral drilling و... در جهت ترمیم ضایعات غضروفی انجام گرفته‌اند اما این تکنیک‌ها، قادر به باز تولیدی خصوصیات بافت غضروف نمی‌باشند. اما امروزه ثابت شده است که تکنیک مهندسی بافت بر پایه سلول‌های بنیادی، یکی از مهمترین درمان‌های

مطالعات قبلی در رابطه با این سایتوکاین، می‌باشد. برخی از محققین نشان داده‌اند که سلول‌ها قابلیت تمایز در بستریهایی مانند آگار، آلژینات، ژلاتین و حتی محیط‌های سوسپانسیون که توانایی حفظ شکل گرد شده کندروسیتی را داشته باشند، دارند و به نظر می‌رسد وجود این بسترها برای حفظ فنوتیپ سلول‌ها ضروری می‌باشد (۲۴).

در مقایسه با سیستم‌های کشت شرح داده شده به صورت سیستم‌های کشت تک لایه دو بعدی برای کشت سلول‌های غضروفی، امروزه تکنیک‌های کشت سلول سه بعدی با هدف تولید داربست‌های متخلخل که موجب تسهیل اتصال سلول و رشد آن‌ها می‌شوند، با بکارگیری انواع گسترده‌ای از بیومواد شامل پلیمرهای سنتزی تا پلیمرهای طبیعی، بسیار توسعه یافته‌اند و در این میان بیشترین استفاده از سیستم‌های کشت مربوط به ژل آگارز که موجب تحریک شبکه‌های سه بعدی پروتئوگلیکان‌ها در طی کشت می‌شود، به عمل آمده است (۱).

در رابطه با مرفولوژی سلول‌ها همان‌طور که بیان شد با انتقال سلول‌های مزانشیمال به درون مهره‌های آلژینات و تمایز این سلول‌ها به سلول‌های کندروسیت، سلول‌ها فنوتیپ ویژه کندروسیتی را از خود نشان داده و به شکل گرد در آمدند. در حالیکه سلول‌ها در شرایط کنترل و بر روی ظروف کشت معمولی (پلاستیک) پس از تمایز نیز مرفولوژی فیبروبلاستی شکل خود را حفظ کرده و به صورت چسبیده به سطح باقی می‌مانند و تنها تعداد محدودی از سلول‌ها (کمتر از ۱٪) فنوتیپ ویژه کندروسیتی را از خود نشان دادند. پایداری فنوتیپ کندروسیتی مشکل اصلی و اساسی در مطالعات *In vitro* در رابطه با مهندسی بافت غضروف می‌باشد. نکته قابل توجه این است که بقاء فنوتیپ ویژه غضروفی برای حفظ ساختار و خصوصیات بیومکانیکی غضروف بسیار مهم می‌باشد (۲۲).

همان‌طور که در بخش نتایج نشان داده شد در رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی توسط آلشین بلو، سلول‌های مزانشیمال پس

دارا می‌باشند (۱۱). همچنین در طی این مطالعه نشان داده شده که سلول‌های مزانشیمال جداسازی شده از بافت چربی بدون از دست دادن خصوصیات مرفولوژیک خود دارای توانایی تکثیر بالایی در محیط کشت می‌باشند.

بسیاری از تحقیقات تاکنون شرایط ضروری جهت غضروف‌زایی برای سلول‌های مزانشیمی انسانی نظیر محیط‌های کشت سه بعدی، فاکتورهای رشد، محیط‌های رشد با میزان کم سرم و یا فاقد سرم را نشان داده‌اند (۲۴).

Ballock و همکارانش نشان دادند که دستکاری و تغییرات غلظت سرم به سطوح مطلوب کمتر از ۰/۱ و ۰/۰۱ درصد در محیط کشت تمایزی ایجاد غضروف منجر به تشکیل جنبه‌های ایجاد توسعه در معماری غضروف می‌شود (۲).

در مطالعات صورت گرفته، چندین سیتوکاین گزارش شده‌اند که در تبدیل سلول‌های مزانشیمال به سلول‌های کندروسیت مؤثر می‌باشند. در این میان **TGF- β** در استخوان بسیار متراکم می‌باشد و مقدار آن متجاوز از **۲۰۰ $\mu\text{g}/\text{kg}$** در بافت می‌باشد. این فراوانی در میزان **TGF- β** بیان کننده نقش مهم این سیتوکاین در این بافت می‌باشد (۱۳). برخی دیگر از محققین نشان داده‌اند که چندین عضو از خانواده **TGF- β** ، نقش مهمی را در تمایز غضروفی ایفا می‌کنند (۲۴).

در مطالعه انجام شده، ما از **TGF- β_1** به منظور تمایز سلول‌های مزانشیمال به سلول‌های کندروسیت استفاده کردیم و با توجه به نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی هیستوشیمی صورت گرفته توسط آلشین بلو و بیان پروتئوگلیکان‌های سولفات‌ها و نتایج حاصل از تست **RT-PCR** و بیان ژن کلاژن تیپ دو به عنوان مارکر سلول‌های کندروسیت در شرایط کشت کنترل و آلژینات و در مقایسه با کنترل منفی مربوط به سلول‌های مزانشیمی در روز صفر، نشان داده شد که **TGF- β_1** فاکتور رشد مؤثری در تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های کندروسیت و القاء فنوتیپ ویژه غضروفی در این سلول‌ها در جهت تأیید

ژن کلاژن تیپ دو به عنوان یک ژن مشخص در سلول‌های کندروسیت به روش RT-PCR می‌توان اشاره کرد. پس از نرمال سازی داده‌های بدست آمده از محصولات PCR مربوط به تکثیر توالی کلاژن تیپ دو نسبت به *Housekeeping gene (GAPDH)*، مشخص شد که بیان این ژن در روزهای مختلف تمایز در ارتباط با سلول‌های درون آلژینات بیشتر از دو شرایط دیگر می‌باشد و بیشترین میزان بیان در روز چهاردهم از تمایز مشاهده گردید. این نتایج نیز در تأیید نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی توسط آلتین بلو، نشانه آن است که سلول‌های مزانشیمال بیشتری درون مهره‌های آلژینات به سلول‌های کندروسیت تمایز می‌یابند و بیان قویتری برای این سلول‌ها در رابطه با کلاژن تیپ دو در شرایط آلژینات نسبت به کنترل تفاوت معنی‌داری در میزان بیان این ژن در آن‌ها مشاهده می‌شود.

با توجه به نتایج و بحث‌های ارائه شده می‌توان نتیجه‌گیری کرد که زیست پلیمر و مهره‌های آلژینات می‌تواند یک سیستم *In vitro* مناسب جهت کاربری در تولید و مهندسی بافت غضروف انسانی باشند.

از تمایز به سلول‌های کندروسیت در شرایط ذکر شده آلژینات پروتئوگلیکان‌های سولفاته را که به طور فراوان در سلول‌های کندروسیت یافت می‌شود، را بیان کردند. که این رنگ‌آمیزی مثبت خود، تأیید کننده تمایز سلول‌های مزانشیمال جداسازی شده به سلول‌های کندروسیت می‌باشد. اما تفاوت، در میزان سلول‌های بیان کننده این ماکرو مولکول‌ها در شرایط مطرح شده می‌باشد. با گذشت زمان در بررسی بیان پروتئوگلیکان‌های سولفاته از روز صفر تا روز چهاردهم از تمایز، افزایش تعداد سلول‌های بیان کننده این ماکرو مولکول‌ها در شرایطی که سلول‌ها درون مهره‌های آلژینات قرار داشتند نسبت به سلول‌های کنترل کشت داده شده، گویای این مطلب است که سلول‌های مزانشیمال بیشتری درون مهره‌های آلژینات به سلول‌های کندروسیت تمایز می‌یابند. بنابراین می‌توان این گونه نتیجه گرفت که مهره‌های آلژینات شرایط مطلوب‌تری را برای تمایز سلول‌های مزانشیمال به سلول‌های کندروسیت نسبت به کنترل مهیا می‌کنند.

از تست‌های انجام شده در رابطه با تأیید و چگونگی تمایز سلول‌های مزانشیمال به سلول‌های کندروسیت، بررسی بیان

منابع

- Bahrami, S., Stratmann, U., Wiesmann, h., Mokrys, K., Bruckner, P., and Szuwart, T., 2000. Periosteally derived osteoblast-like cells differentiate into chondrocytes in suspension culture in agarose. *Journal of The Anatomical record*. 259, PP: 124-130.
- Ballock, R. T., and Reddi, A. H., 1994. Thyroxine is the serum factor that regulates morphogenesis of columnar cartilage from isolated chondrocytes in chemically defined medium. *Journal of Cell biology*. 126, PP: 1311-1318.
- Barry, F. P., and Murphy, J. M., 2004. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 36, PP: 568-584.
- Bianco, P., and Robey, P. G., 2001. Stem cells in tissue engineering. *Journal of Nature*. 414: 6859, PP: 118-121.
- Bochev, I., Elmadjian, G., Kyurkchiev, D., Tzvetanov, L., Altankova, I., Tivchev, P., and Kyurkchiev, S., 2008. Mesenchymal stem cells from human bone marrow or adipose tissue differently modulate mitogen-stimulated B-cell immunoglobulin production in vitro. *Journal of Cell Biology International*. 32, PP: 384-393.
- Bucco, M., Ghidoni, I., et al., 2008. Alginate cell encapsulation: new advances in reproduction and cartilage regenerative medicine. *Cytotechnology*. 58, PP: 49-56.
- Chen, G., Liu, D., Tadokoro, M., Hirochika, R., Ohgushi, H., Tanaka, J., and Tateish, T., 2004. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells cultured in a cobweb-like biodegradable scaffold. *Journal of Biochemical and Biophysical Research Communications*. 322, PP: 50-55
- Chen, Y., Shao, J., Xiang, L., Dong, X., and Zhan, G., 2008. Mesenchymal stem cells: A promising

- candidate in regenerative medicine. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 40, PP: 815–820.
9. Dawson, E., Mapili, G., Erickson, K., Taqvi, S., and Roy, K., 2008. Biomaterials for stem cell differentiation. *Journal of Advanced Drug Delivery Reviews*. 60, PP: 215–228.
 10. Drury, J. L., and Mooney, D. J., 2003. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Journal of Biomaterials*, 24, PP: 4337–4351.
 11. Gimble, J., and Guilak, F., 2003. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Journal of Cytotherapy*, 5, PP: 362–9.
 12. Gomillion, C. T., and Burg, K. J. L., 2006. Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials*. 27, PP: 6052-6063.
 13. Iwasaki, M., Nakata, K., Nakahara, H., Nakase, T., Kimura, T., Kimata, K., Capla, N. A. I., and Ono, K., 1993. Transforming Growth Factor- β 1 Stimulates Chondrogenesis and Inhibits Osteogenesis in High Density Culture of Periosteum-Derived Cells. *Journal of Endocrinology*. 132, PP: 1603-1608.
 14. Liao, S., Chan, C. K., and Ramakrishna, S., 2008. Stem cells and biomimetic materials strategies for tissue engineering. *Journal of Materials Science and Engineering C*. 28, PP: 1189–1202.
 15. Merceron, C., Vinatier, C., Clouet, J., Collic-Jouault, S., Weiss, P., and Guicheux, J., 2008. Adipose-derived mesenchymal stem cells and biomaterials for cartilage tissue engineering. *Joint Bone Spine*. 75:6, PP: 672-674.
 16. Nair, L. S., and Laurencin, C. T., 2007. Biodegradable polymers as biomaterials *Journal of Progress in Polymer Science*. 32, PP: 762–798.
 17. Nardi, N. Beyer, and da Silva Meirelles, L., 2006. "Mesenchymal Stem Cells: Isolation, In Vitro Expansion and Characterization". Anna M., Boheler, Kenneth. *Stem Cells. Handbook of experimental pharmacology*. 174, PP: 249–82.
 18. Sachlos, E., and Czernuszka, J. T., 2003. Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Journal of European Cells and Materials*. 5, PP: 29-40.
 19. Sethe, S., Scutt, A., and Stolzing, A., 2006. Aging of mesenchymal stem cells. *Journal of Ageing Research Reviews*. 5, PP: 91–116.
 20. Shin, H., Jo, S., and Mikos, A. G., 2003. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials*, 24, PP: 4353-4364.
 21. Steedman, H. F., 1950. Alcian blue 8GS, A new stain for mucin. *Quarterly Journal of Microscopic Science*. 91, PP: 477-479.
 22. Stokes, D. G., Liu, G., Dharmavaram, R., Hawkins, D., Piera-velazquez, S., and Jimenez, A., 2001. Regulation of type II collagen gene expression during human chondrocyte de-differentiation and recovery of chondrocyte-specific phenotype in culture involves Sry-type high-mobility-group (SOX) transcription factors. *Journal of Biochemical*. 360, PP: 461-470.
 23. Tae, S., Lee, S., Park, J., and Im, G., 2006. Mesenchymal stem cells for tissue engineering and regenerative medicine, *Biomed. Mater.* 1, PP: 63–71.
 24. Yang, I. H., Kim, S., Kim, Y. H., Sun, H. J., Kim, S. J., and Lee, j. W., 2004. Comparison of phenotypic characterization between Alginate bead and pellet culture systems as chondrogenic differentiation models for human mesenchymal stem cells. *Journal of Yonsei Medical Journal*, 45, PP: 891-900.
 25. Zeiter, S., Lezuo, P., Ito, K., 2009. Effect of TGF beta1, BMP-2 and hydraulic pressure on chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stromal cells. *Biorheology*. 46(1), PP: 45-55.

Alginate biopolymer as a 3-dimensional microenvironment for differentiation of human mesenchymal stem cells to chondrocytes

Deezagi A.Kh., Hodaie L. and Soheili Z.S.

Biochemistry and Basic Science Dept., National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

The aim of this research was to study the potency of Alginate biopolymer as a microenvironment for differentiation of human adipose tissue derived mesenchymal stem cells (hAMSCs) to chondrocytes. For this purpose human adipose tissue was prepared from health voluntary donors with liposuction and digested by collagenase type. The mesenchymal stem cells cultured in alginate beads in presence of TGF- β 1 and ascorbic acid. Alcian blue staining was done to show the differentiation of mesenchymal stem cell to chondrocytes. RT-PCR was done for the evaluation of collagen type II gene expression as a chondrocytic molecular marker. Immunocytochemical staining of isolated cells by anti human Vimentin antibody indicated to more than 95% of positive cells as hAMSCs. After induction of chondrogenic differentiation in alginate beads, alcian blue staining showed expression of sulphated proteoglycans in chondrocytes. Positive stained cells in controls and alginate beaded cultured cells indicated to (36.5% \pm 0.7 and 56.5 \pm 4.9 at day 3) and (83% \pm 2.8 and 93 \pm 2.8 at day 14) respectively. RT-PCR results indicated to the expression of collagen type II in alginate bead cultured cells and the comparison of results by controls indicated to significant increased expression in alginate bead cultured cells. (43% \pm 4.5 and 70 \pm 5 at day 3) and (54% \pm 2.8 and 77 \pm 1.4 at day 14) respectively. In conclusion, our result indicated and supported the using of alginate beads as 3 dimensional culture system in tissue engineering for chondrogenic culture system.

Key words: Adipose Tissues Derived Mesenchymal Stem cells, Alginate Scaffold, Chondrogenic differentiation.