

بررسی تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان موش به غضروف در کشت سه بعدی با استفاده از ژل آلژینت

محمد رضا باغبان اسلامی نژاد^ک، Ph.D.، لیلا تقی یار*، M.Sc.

چکیده

هدف: هدف از انجام این مطالعه کشت سه بعدی سلولهای بنیادی مزانشیمی موشی در داخل ژل آلژینت و بررسی تمایز به غضروف آن می باشد.

روش بررسی: موشهای NMRI با سن تقریبی ۴-۶ هفته قربانی شدند و سلولهای مغز استخوان آنها با تراکم کم (به تعداد ۵۰۰ سلول در هر خانه از ظروف ۶ خانه‌ای) کشت شد. با انجام دو پاساژ متوالی، جمعیت خالصی از سلولهای فیبروبلاستی ظاهر شد. به منظور کشت سه بعدی و تمایز به غضروف، ده میلیون سلول حاصل از پاساژ دو، در ده میلی لیتر محلول آلژینت معلق شد و سوسپانسیون حاصل به ده قسمت مساوی تقسیم شد و در ظروف ۱۲ خانه‌ای توزیع گردید. با استفاده از محلول کلرید کلسیم، سوسپانسیون سلولهای مزانشیمی به حالت ژل در آمد. به منظور تمایز به غضروف، محیط کندروژنیک حاوی ۱۰ نانو گرم فاکتور رشد TGF- β 3 و ۱۰ نانوگرم BMP-6 به ژل حاوی سلولهای مزانشیمی اضافه شد. در پایان مدت کشت (۳ هفته)، وقوع تمایز با بهره‌گیری از روشهای رنگ آمیزی اختصاصی تولوئیدین بلو، تکنیک RT-PCR و فراساختار مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: در کشت اولیه سلولهایی با مورفولوژی چند ضلعی، کشیده، پهن و دوکی مشاهده شد. با انجام اولین پاساژ، جمعیت نسبتاً خالصی از سلولهای دوکی ظاهر شد و دومین پاساژ سبب شد تا به اندازه کافی سلول برای مرحله بعدی مطالعه فراهم شود. نتایج رنگ آمیزی تولوئیدین بلو نشان داد که سلولها در درون ژل در داخل ساختارهای شبه لاکونایی قرار گرفته‌اند و اطراف آنها، با مناطق متاکروماتیک احاطه شده است. ژل آلژینت خود به حالت متاکروماتیک ظاهر شد. همچنین نتایج RT-PCR نشان داد که mRNA کلاژن تایپ II، X و aggrecan به میزان زیادی در سلولهای تمایز یافته تولید شده است. از طرفی بررسی برشهای ظریف حاکی از این بود که سلولهای تمایز یافته در مرکز کشت سه بعدی، دارای دستگاههای ترشحی رشد کرده بودند که بیانگر وضعیت نسبتاً فعال آنها بود.

نتیجه‌گیری: سلولهای مزانشیمی موشی، در کشت سه بعدی در داخل ژل آلژینت، به راحتی فنوتیپ غضروف را کسب می‌نمایند. نکته جالب توجه این است که در پایان دوره تمایز، سلولها از لحاظ فراساختاری فعال به نظر می‌رسند.

واژه‌های کلیدی: سلولهای بنیادی مزانشیمی، ژل آلژینت، کشت سه بعدی.