

## تأثیر فاکتور رشد پروتئین مورفوژنتیک استخوانی-۶ (BMP-6) بر روند

## تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از چربی به کندروسیت در سیستم کشت Pellet

دکتر بتول هاشمی بنی\*، دکتر شهناز رضوی\*\*، دکتر ابراهیم اسفندیاری\*\*\*،

دکتر منصور صالحی\*\*\*\*، دکتر سعید کرباسی\*\*\*\*\*، دکتر محمد مردانی\*\*،

دکتر فاطمه نادعلی\*\*\*\*\*، فرزانه صادقی\*\*\*\*\*، دکتر عبدالرضا صباحی\*\*،

فاطمه آموزگار\*\*\*\*\*، ویدا همایونی\*\*\*\*\*

\* استادیار علوم تشریحی، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

\*\* دانشیار علوم تشریحی، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

\*\*\* استاد علوم تشریحی، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

\*\*\*\* دانشیار ژنتیک و بیولوژی ملکولی، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

\*\*\*\*\* استادیار بیومتریال و مهندسی بافت، گروه فیزیک و مهندسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

\*\*\*\*\* استادیار آسیب شناسی و همانولوژی، گروه آسیب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

\*\*\*\*\* کارشناس ارشد میکروبی‌شناسی، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

\*\*\*\*\* کارشناس علوم آزمایشگاهی، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

\*\*\*\*\* کارشناس ارشد ایمنی‌شناسی، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۰/۲۵

تاریخ پذیرش: ۸۸/۷/۱

## چکیده

**مقدمه:** به دلیل فقدان عروق خونی و تعداد اندک سلول‌های کندروسیت، آسیب‌های بافت قابل ترمیم نیست. مطالعه‌ی حاضر جهت جداسازی سلول‌های بنیادی از بافت چربی زیر جلدی انسانی و القای عضروف‌سازی طراحی گردید.

**روش‌ها:** بافت چربی زیر جلدی انسانی تحت تأثیر آنزیم کلاژناز تجزیه شد و پس از سانتریفوژ و فیلتر شدن، در مدیوم FBS 10% DMEM کشت داده شد. سپس مارکرهای سطحی سلول‌های جداسازی شده با روش فلوسیتومتری بررسی گردید. تعداد  $10^5 \times 2$  سلول از سلول‌های پاساژ چهارم در سیستم کشت Pellet تحت تأثیر مدیوم کندروژنیک حاوی BMP-6 به مدت ۲۱ روز کشت داده شد.

**یافته‌ها:** سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی مارکرهای CD44، CD90 را بیان نمودند ولی مارکرهای رده‌ی سلول‌های خون‌ساز مانند CD14 و CD45 را بیان نکردند. بررسی ساختارهای حاصل از القای کندروژنیک با رنگ‌آمیزی H-E بافت غضروفی را مشخص نمود. رنگ‌آمیزی با آلسین بلو نیز وجود پروتئوگلیکان‌های سولفات را در ماتریکس خارج سلولی اثبات کرد. بررسی ایمونوهیستوشیمی وجود آگریکان و کلاژن نوع II را در ماتریکس خارج سلولی نشان داد. بررسی با روش RT-PCR نیز نتایج روش‌های دیگر را تأیید کرد.

**نتیجه‌گیری:** سیستم Pellet و فاکتور رشد BMP-6 به عنوان القاکننده‌ی عضروف‌سازی عمل می‌کنند و بدین ترتیب می‌توان از سلول‌های بنیادی مزانشیمی از چربی زیر جلدی بافت غضروف به‌دست آورد.

**واژگان کلیدی:** کندروژنز، سلول‌های بنیادی مشتق از چربی، مهندسی بافت، کلاژن نوع II، BMP-6، سیستم کشت Pellet.

تعداد صفحات: ۱۴

تعداد جدول‌ها: ۱

تعداد نمودارها: ۹

تعداد منابع: ۴۰

دکتر ابراهیم اسفندیاری، استاد علوم تشریحی، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران .

E-mail: esfandiari@med.mui.ac.ir

آدرس نویسنده مسؤؤل:

## مقدمه

بافت غضروفی فاقد عروق خونی و اعصاب است و تغذیه‌ی سلول‌های این بافت تنها از طریق انتشار مواد غذایی به درون بافت انجام می‌شود (۱). از آن جا که ترمیم طبیعی هر بافت با تقسیم سلولی آن بافت و رسیدن فاکتورهای هومورال و سلول‌های بنیادی یا پروژنیاتور به محل آسیب انجام می‌شود و این امر در غضروف ممکن نیست، بنابراین به دلیل فقدان عروق خونی و دانسیته‌ی سلولی پایین، غضروف توانایی محدودی در ترمیم آسیب‌ها و بیماری‌ها دارد (۲-۴). طبق گزارش‌های اخیر، ۲۱ میلیون نفر از مردم آمریکا با استئوآرتریت زانو زندگی می‌کنند (۵). به علاوه بررسی‌ها پیش‌بینی می‌کند که تا سال ۲۰۲۰ بیش از ۶۰ میلیون نفر به این بیماری مبتلا خواهند شد (۶). در کشورهای پیشرفته، استئوآرتریت زانو، مهم‌ترین علت ناتوانی مزمن در سالمندان به شمار می‌رود (۷). بررسی‌ها نشان می‌دهد که به کارگیری روش‌های معالجه‌ی آسیب‌های مفاصل مانند درمان دارویی، دبیریدمان بافت و لاواژ مفصل، آرتروسکوپی، جراحی ارتوپدی و آرتروپلاستی سایشی نه تنها به ترمیم بافت کمک نمی‌کنند، بلکه ممکن است به تشکیل بافت فیبروز، آپوپتوز و تخریب بافت منجر شوند (۸-۹).

طی سال‌های اخیر پیوند کندروسیت‌های اتولوگ جهت درمان آسیب‌های مفاصل مورد توجه قرار گرفته است. در این روش، قطعه‌ای از بافت غضروفی از ناحیه‌ی دنده یا محل‌هایی که وزن بالایی بر آن‌ها وارد نمی‌شود، جدا می‌گردد و سپس در شرایط آزمایشگاهی با تجزیه‌ی آنزیمی، کندروسیت‌ها جداسازی شده و تکثیر می‌یابند. در مرحله‌ی بعد، کندروسیت‌ها به ناحیه‌ی آسیب دیده، پیوند داده

می‌شوند (۱۰-۱۳). لازم به ذکر است که در این روش سلول درمانی محدودیت‌هایی وجود دارد از جمله این که فقط جهت درمان استئوآرتریت تروماتیک و دسیکان کاربرد دارد؛ به علاوه ترمیم ضایعات غضروفی با وسعت بیش از ۲ سانتی‌متر با استفاده از پیوند اتولوگ امکان‌پذیر نیست، چرا که جهت ترمیم ناحیه‌ی آسیب دیده، حدود ۲۰۰-۱۰۰ میلیون سلول لازم است (۱۰)، بنابراین برای دستیابی به این تعداد سلول، به ویژه اگر تجزیه‌ی بافت کامل نباشد، چندین گرم غضروف باید از فرد دهنده برداشته شود که این امر از نظر کلینیکی عملی نیست. همچنین تحقیقات نشان داده است که کندروسیت‌ها در کشت تک لایه‌ای، فنوتیپ تمایز یافته خود را از دست می‌دهند و مورفولوژی فیبروبلاستی کسب می‌کنند، به علاوه تولید ترکیبات ویژه‌ی غضروف مانند آگریکان و کلاژن نوع II توسط این سلول‌ها متوقف شده، کلاژن نوع I ترشح می‌نمایند (۱۴). بررسی‌ها نشان می‌دهد با افزایش تعداد پاساژ سلولی، کیفیت کندروسیت‌های پیوند شده کاهش می‌یابد (۱۵). بنابراین به دلایل محدودیت در پیوند کندروسیت‌های اتولوگ، دستیابی به منابع سلولی دیگر در جهت طراحی بافت غضروفی و درمان بیماری‌های این بافت ضرورت دارد. طی سال‌های اخیر، با کشف سلول‌های بنیادی، روش‌های نوین سلول درمانی و مهندسی بافت چشم انداز روشنی فرا روی درمان انواع آسیب‌ها و بیماری‌ها گشوده است.

طی سال‌های اخیر، سلول‌های بنیادی مزانشیمی تحت عنوان سلول‌های بنیادی مشتق از چربی (Adipose-derived stem cells یا ADSC) از بافت چربی به دست آمده است (۱۶). به دلیل سهولت در

سلولی کندروژنیک ATDC5 افزایش می‌دهد (۲۵). همچنین مشخص شده است که افزودن پروتئین BMP-6 به محیط القاء کننده، در روند تمایز سلول‌های مزانشیمی بنیادی مشتق از مغز استخوان به کندروسیت، تولید پروتئوگلیکان‌های ماتریکس را افزایش می‌دهد (۲۶). با وجود تحقیقات مختلف تأثیر این پروتئین‌ها به خوبی روشن نگردیده است و نیاز به بررسی بیشتر دارد.

مطالعات در زمینه‌ی چگونگی کندروژنز در دوران جنینی نشان داده است که سلول‌های مزانشیمی در مراحل ابتدایی به صورت توده‌ای متراکم تجمع می‌یابند و تعامل بین سلولی همراه با دیگر فاکتورهای مؤثر سرانجام به تشکیل غضروف منجر می‌گردد (۹). به علاوه تحقیقات در جهت حفظ فنوتیپ کندروسیت‌ها در کشت تک‌لایه‌ای، ضرورت کشت سه بعدی در روند کندروژنز را مشخص می‌کند (۱۳). لذا سیستم کشت سه بعدی که تحت عناوین Pellet و Micromass نامیده می‌شود، جهت القای کندروژنز ابداع گردید (۲۷). از این رو در این تحقیق سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی زیرجلدی انسانی جدا گردید و پس از تکثیر، تأثیر فاکتور رشد BMP-6 بر روند تمایز غضروف‌سازی در سیستم کشت Pellet برای نخستین مرتبه مورد ارزیابی قرار گرفت.

### روش‌ها

جداسازی و کشت اولیه‌ی سلول‌های بنیادی از بافت چربی: چربی زیر جلدی از ناحیه‌ی شکم ۵ نفر (۵۰-۲۵ ساله) برداشته شد و پس از توزین و برش، آنزیم کلاژناز نوع IA (Sigma) به میزان ۱/۵ میلی‌گرم به ازای هر گرم بافت چربی جهت تجزیه بافت مورد

دستیابی به بافت چربی زیر جلدی از طریق لیپوساکشن یا اعمال جراحی معمولی دیگر، سلول‌های بنیادی مشتق از چربی یکی از کاندیداهای ارزشمند در سلول درمانی و مهندسی بافت محسوب می‌شوند. این سلول‌ها در کشت تک‌لایه‌ای از نظر مورفولوژی با ظاهر شبه فیروبلستی مشابه دیگر سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشند و توان تمایز به رده‌های مختلف سلولی را دارند (۱۸-۱۶). از ویژگی‌های ارزشمند سلول‌های ADSC عدم بیان آنتی‌ژن لکوسیت انسانی DR است و این ویژگی، سلول‌ها را جهت روش‌های پیوند آلوژنیک به دلیل عدم خطر رد پیوند مناسب می‌سازد (۱۹).

مطالعات نشان داده است که فاکتورهای رشد خانواده‌ی TGF- $\beta$  نقش اصلی و تعیین کننده در تکامل سیستم عضلانی اسکلتی بر عهده دارند و در رشد و تکثیر سلول‌های غضروفی مؤثر هستند (۲۰). در سیستم کشت سه‌بعدی در هیدروژل آلژینات، فاکتورهای رشد BMP-2 و BMP-9 می‌توانند در روند غضروف‌سازی مؤثر باشند (۲۱). از طرف دیگر در بررسی Indrawattana گزارش شده است که BMP-6 به تنهایی قادر به القای کندروژنز نیست (۲۲)، به‌علاوه در تحقیقات دیگر وجود BMP-6 را برای استخوان‌سازی داخل غضروفی، لازم می‌دانند و نقش اساسی این فاکتور را در تشکیل استخوان گزارش کرده‌اند (۲۳-۲۴).

همچنین بررسی‌ها نشان داده است که طی تکامل رویان در مرحله‌ی پیش از هیپرتروفه شدن کندروسیت‌ها، BMP-6 بیان می‌شود. ضمن این که BMP-6 میزان mRNA مربوط به کلاژن نوع X را در کشت تک‌لایه‌ای در کندروسیت‌های نابالغ و رده‌ی

کندروژنیک بدون فاکتور رشد BMP-6 به کار رفت.

**ارزیابی ساختارهای حاصل پس از القای کندروژنیک:**

**بررسی هیستولوژیکی:**

جهت مطالعه‌ی هیستولوژیک روش معمولی هماتوکسیلین اتوزین و رنگ‌آمیزی آلسین بلو به کار رفت. پس از فیکس کردن در فرمالدئید ۱۰ درصد، آب‌گیری، شفاف‌کردن، آغشتگی، قالب‌گیری و برش‌گیری نمونه‌ها انجام شد. سپس با هماتوکسیلین و اتوزین رنگ‌آمیزی صورت گرفت. بررسی مقاطع رنگ شده با میکروسکوپ نوری نیکون انجام گرفت و تصاویر آن تهیه گردید.

جهت رنگ‌آمیزی آلسین بلو، مقاطع پس از شفاف شدن و آب‌دهی در محلول آلسین بلو ۱٪ قرار گرفت و مطالعه با میکروسکوپ نوری نیکون انجام شد.

**بررسی ایمونو هیستوشیمی:**

مقاطع پس از شفاف شدن و آب‌دهی جهت تثبیت به مدت ۵ دقیقه در استن قرار داده شد. جهت خشتی شدن فعالیت پراکسیداز هیدروژن بافت، نمونه‌ها در محلول پراکسید هیدروژن ۳ درصد در اتانل ۷۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. پس از شستشو با بافر فسفات از آنزیم پیسین (Sigma) به میزان ۱ میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر اسید استیک ۰/۵ مولار به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد استفاده گردید. آنتی‌بادی‌های اولیه علیه ملکول‌های کلاژن نوع II (Serotec) و آگریکان (Abcam) انسانی به میزان ۱:۱۰۰ به مقاطع اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از شستشو با بافر PBS، آنتی‌بادی ثانویه متصل به Horse radish peroxidase (DAKO cytometry) به مدت ۶۰ دقیقه به نمونه‌ها افزوده شد و پس از شستشو با بافر PBS، کروموژن دی‌آمینو بنزیدین (DAKO cytometry) به نمونه‌ها

استفاده قرار گرفت. پس از خشتی کردن فعالیت آنزیم و سانتیفرژ محلول بافر لیز کننده جهت تجزیه گلبول‌های قرمز موجود استفاده گردید. پس از فیلتر کردن و سانتیفرژ، سلول‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۵٪ CO<sub>2</sub> و رطوبت نسبی کشت داده شد و با تعویض مدیوم بعد از ۲۴ ساعت سلول‌های اضافی که به کف فلاسک چسبندگی نداشتند، تخلیه شد. هر ۲-۳ روز محیط کشت تعویض گردید (۱۶).

**شناسایی مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی:**

ابتدا ۱ × ۱۰<sup>۵</sup> سلول در میلی‌لیتر با استفاده از پارافرمالدئید ۴ درصد (Merck) در PBS فیکس شد. پس از شستشو، ۲۰ میکرولیتر آنتی‌بادی اولیه علیه مارکرهای سطحی CD44، CD45، CD14، IgG<sub>1,2</sub>، CD90 (IQ product) به مدت ۳۰ دقیقه اضافه شد. سپس توسط دستگاه فلوسایتومتر (FACS Calibur 488 BD) شمارش سلول‌های نشان‌دار به انجام رسید (۱۶).

**تمایز کندروژنیک در سیستم کشت Pellet**

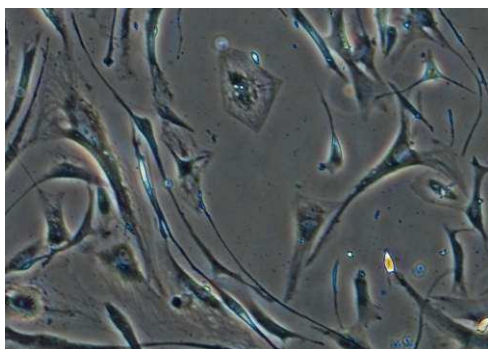
جهت تمایز، ۲ × ۱۰<sup>۵</sup> سلول در میلی‌لیتر به لوله‌ی فالکون پلیروپیلن ۱۵ میلی‌لیتری انتقال یافت و پس از سانتیفرژ با دور ۱۴۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه، مایع رویی تخلیه شد و به رسوب حاصل به آرامی ۰/۵ میلی‌لیتر مدیوم کندروژنیک high glucose (Gibco) DMEM حاوی Penicillin-streptomycin ۱ درصد، Insulin transferrin-selenious sodium ۱ درصد، Ascorbate-2 phosphate (Sigma) ۵۰ μg/ml، Linoleic acid، ۱۰<sup>-۷</sup> M Dexamethason (Sigma) و Bone morphogenetic protein ۵ μg/ml (Sigma) اضافه گردید.

سپس لوله‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵٪ CO<sub>2</sub> درصد انکوبه شد. هر ۲-۳ روز مدیوم تعویض و پس از ۲۱ روز القاء، تصاویر آن تهیه گردید. در گروه شاهد مدیوم

Biometra انجام گرفت. سپس محصول PCR روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شد. توالی پرایمرهای به کار رفته، در جدول ۱ آمده است.

#### یافته‌ها

**جداسازی و کشت اولیه‌ی سلول‌های بنیادی از بافت چربی:**  
پس از تجزیه‌ی بافت چربی زیر جلدی انسانی تحت تأثیر آنزیم کلاژناز، سلول‌های تک هسته‌ای حاصل در فلاسک‌های ۲۵ سانتی متری کشت داده شد. در ابتدا با مشاهده‌ی فلاسک‌ها در زیر میکروسکوپ، سلول‌ها به حالت کروی و شناور بودند ولی با گذشت چند ساعت (حدود ۵ ساعت) به تدریج مرحله‌ی چسبندگی خود را به کف فلاسک آغاز کردند و در این زمان از حالت کروی خارج و با اشکال چندوجهی، ستاره‌ای و دوکی با زواید سیتوپلاسمی کوتاه و اندک مشخص شدند (شکل ۱). به تدریج تحت شرایط مناسب دما (۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد) و دی‌اکسیدکربن ۵ درصد، سلول‌های متصل به کف فلاسک با انجام تقسیم میتوزی متوالی، رشد و تکثیر یافتند؛ با افزایش تعداد سلول‌ها، اشکال ستاره‌ای و چند وجهی کمتر دیده می‌شد و اکثر سلول‌ها دوکی شکل بودند (شکل ۲). زمان دوبلینگ محاسبه شده برای این سلول‌ها به طور متوسط ۷۲ ساعت بود.



شکل ۱. اشکال مختلف سلول‌های جداشده از بافت چربی در کشت اولیه (× ۳۰۰)

اضافه شد. جهت رنگ‌آمیزی زمینه از هماتوکسین (Merck) استفاده گردید. سپس مطالعه با میکروسکوپ نیکون انجام گرفت.

#### تکنیک RT-PCR

**(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)**  
به منظور جداسازی RNA از کیت جداسازی RNA isolation (CinnaGen) RNX plus استفاده شد. غلظت RNA بر اساس جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر معادل ۷۰۰ µg/ml برآورد گردید.

با استفاده از ۱ میکروگرم RNA و کیت RevertAid™ First strand cDNA synthesis kit Fermentase سنتز cDNA انجام شد و PCR آن مطابق

با پروتکل زیر انجام شد:

۱۰ x Buffer	۲/۵ µl
۱۰ mM dNTP	۰/۵ µl
Prime	۱ µl
R Primer	۱ µl
Taq polymerase enzyme	۰/۵ µl
cDNA	۲/۵ µl
dH <sub>2</sub> O	۲۵ µl تا

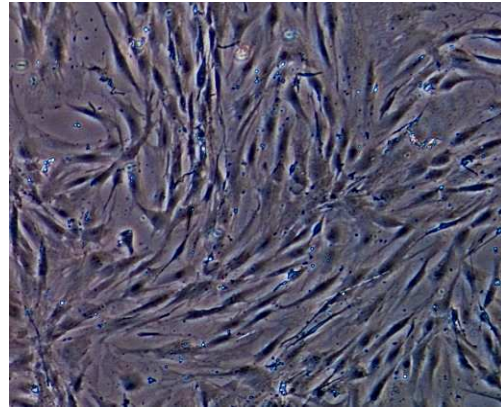
یک سیکل مقدماتی به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای دناتوره کردن، سپس ۳۰ سیکل متوالی شامل ۳۰ دقیقه با دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای denaturation، ۳۰ ثانیه با دمای ۵۶ درجه‌ی سانتی‌گراد برای annealing و ۴۵ ثانیه با دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای extension و در پایان یک سیکل به مدت ۵ دقیقه با دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد با استفاده از ترموسایکلر

جدول ۱. توالی پرایمرهای به کار رفته در پژوهش

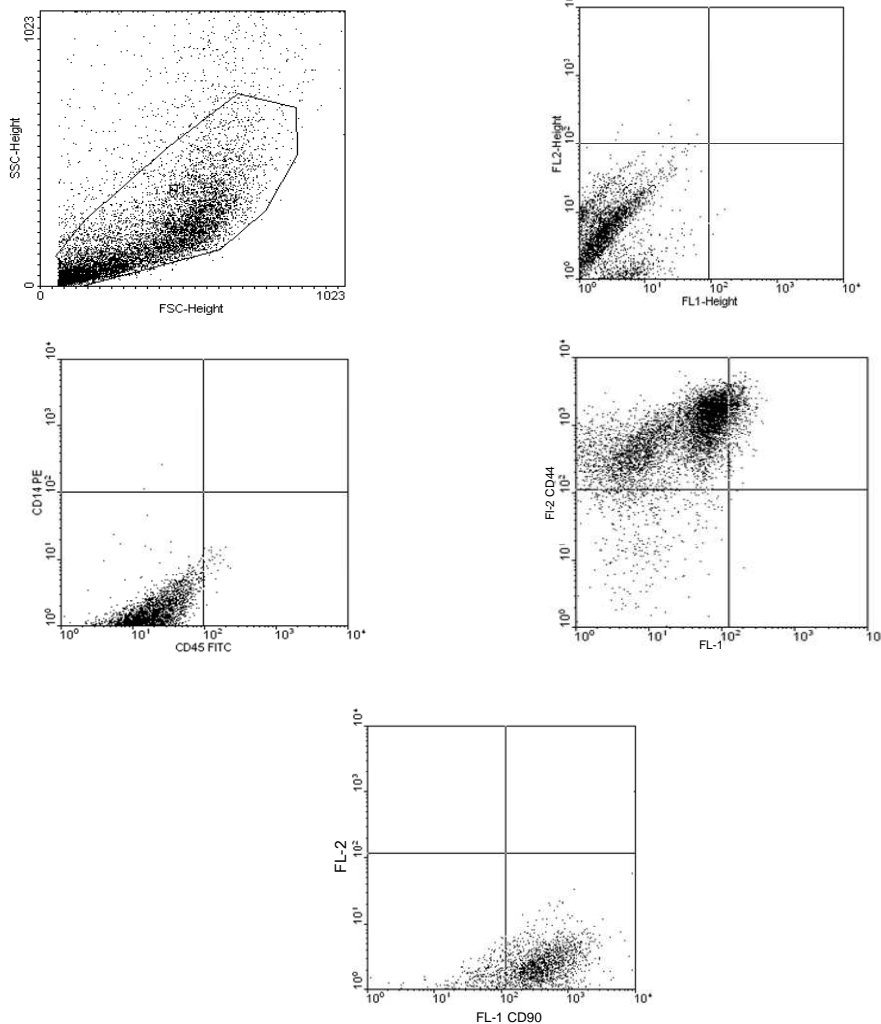
Aggrecan:	F – TGAGGAGGGCTGGAACAAGTACC
	R_ GGAGGTGGTAATCCAGGGAACA
Collagen II:	F_ CAGGTCAAGATGGTC
	R_ TTCAGCACCTGTCTCACCA
GAPDH:	F_ GGGCTGCTTTTAACTCTGGT
	R_ GCAGGTTTTTCTAGACG

## روش فلوسیتومتری:

پس از فیکس کردن و انکوباسیون با آنتی‌بادی مورد نظر و شمارش سلول‌ها توسط دستگاه فلوسیتومتر، حدود ۸۷/۱۴ و ۹۱/۱۸ درصد سلول‌ها به ترتیب دارای مارکرهای CD44 و CD90 بود. همچنین ۹۸/۴۸ درصد سلول‌های جدا شده از بافت چربی فاقد مارکرهای CD14 و CD45 بود (نمودار ۱).



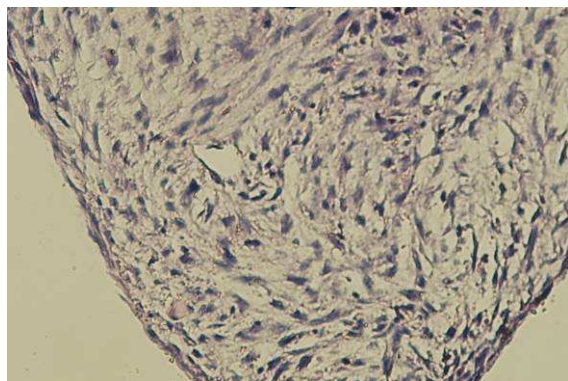
شکل ۲. افزایش سلول‌های بنیادی دوکی شکل در مراحل انتهایی کشت اولیه (۱۰۰×)



نمودار ۱. نتایج فلوسیتومتری جهت شناسایی مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مشتق از چربی. ۹۸/۴۸ درصد سلول‌ها فاقد مارکرهای هماتوپوئیتیک (CD14, CD45)، ۸۷/۱۴ و ۹۱/۱۸ درصد سلول‌ها به ترتیب دارای مارکرهای CD44 و CD90 بودند.

## تمایز کندروژنیک در سیستم کشت Pellet

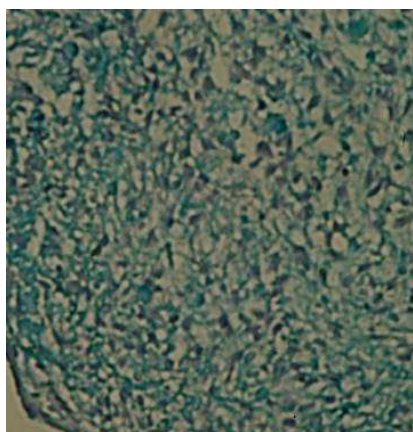
جهت القای کندروژنیک، سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی زیر جلدی انسانی، در پاساژ چهارم تحت تأثیر BMP-6 در سیستم Pellet کشت داده شدند. به دلیل نزدیکی و تعامل بین سلولی در توده‌ی سلولی حاصل از سانتریفیوژ به تدریج تحت تأثیر القای فاکتور رشد، توده‌ی سلولی به حالت متراکم در آمد و پس از ۲۱ روز، قطر نمونه‌ها بیش از ۱ میلی‌متر مشخص گردید (شکل ۳).



شکل ۴. مقطع بافت به دست آمده از روند کندروژنز سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی (H-E, ۳۰۰×)

## بررسی ماتریکس بافت حاصل از تمایز با آلسین بلو:

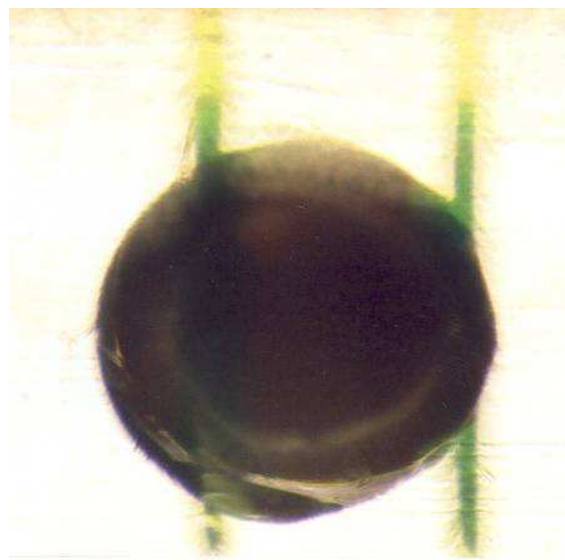
از آن جا که بافت غضروفی به دلیل داشتن پروتئوگلیکان‌های سولفات‌دار در ماتریکس خود ویژگی متاکرومازی دارد، مقاطع تهیه شده با آلسین بلو رنگ آمیزی شد. نتایج رنگ آمیزی، وجود ماتریکس خارج سلولی آبی رنگ را در نمونه‌ها نشان داد که مؤید تشکیل بافت غضروفی از سلول‌های بنیادی مشتق از چربی بود (شکل ۵).



شکل ۵. برش بافت حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی با رنگ آمیزی آلسین بلو که وجود ماتریکس متاکروماتیک را نشان می‌دهد (۱۰۰×)

## بررسی ایمونوهیستوشیمی:

بررسی مقاطع تهیه شده پس از انکوباسیون با



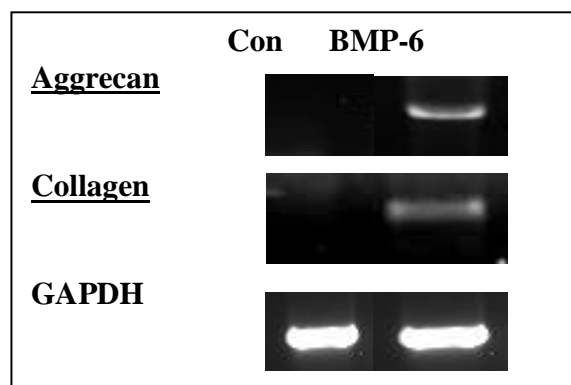
شکل ۳. ساختار کروی شکل حاصل از تمایز کندروژنیک در سیستم Pellet با قطر بیش از ۱ میلی‌متر (۴۰×)

## بررسی مورفولوژیک نمونه‌های حاصل پس از تمایز:

بررسی مقاطع رنگ آمیزی شده با هماتوکسیلین اتوزین وجود بافت غضروفی را آشکار نمود. در این مقاطع سلول‌های شبه کندروسیت درون لاکوناها همراه با ماتریکس خارج سلولی در فواصل سلول‌ها مشاهده شد (شکل ۴). در بین سلول‌ها ماتریکس خارج سلولی بازوفیل مشاهده گردید. میزان ماتریکس در نواحی مرکزی تر نسبت به قسمت‌های محیطی بیشتر بود؛ این حالت نشان داد تمایز کندروژنیک و تشکیل بافت

**روش RT-PCR:**

علاوه بر روش‌های هیستولوژیک و ایمونوهیستوشیمی برای تأیید نتایج، بیان ژن‌های ویژه‌ی غضروف در نمونه‌ها طی فرآیند کندروژنز از سلول‌های بنیادی ارزیابی گردید. از آن جا که هنگام تمایز سلول‌ها، ژن‌های اختصاصی بافت غضروف نسخه‌برداری می‌شوند، می‌توان بیان ژن‌های آگریکان و کلاژن نوع II را از طریق RT-PCR مورد بررسی قرار داد. پس از این که محصول PCR بر روی ژل آگاروز برده شد، بیان ژن‌های آگریکان و کلاژن نوع II همراه با ژن گلیسرآلدئید فسفات دهیدروژناز (GAPDH) مشخص گردید. لازم به ذکر است در گروه شاهد تنها ژن GAPDH بیان شد و ژن‌های ویژه‌ی بافت غضروفی فعال نبود (شکل ۸).

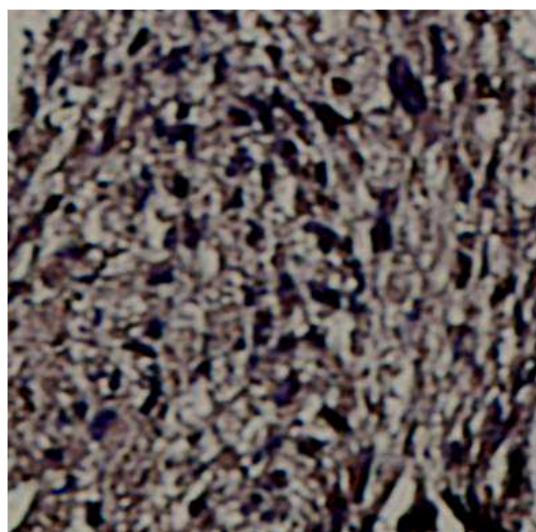


شکل ۸. نتایج RT-PCR مربوط به نمونه‌های کشت یافته در سیستم Pellet در گروه شاهد ژن‌های ویژه‌ی غضروف مانند آگریکان و کلاژن نوع II بیان نشده و در گروه دارای BMP-6 این ژن‌ها بیان گردیده است.

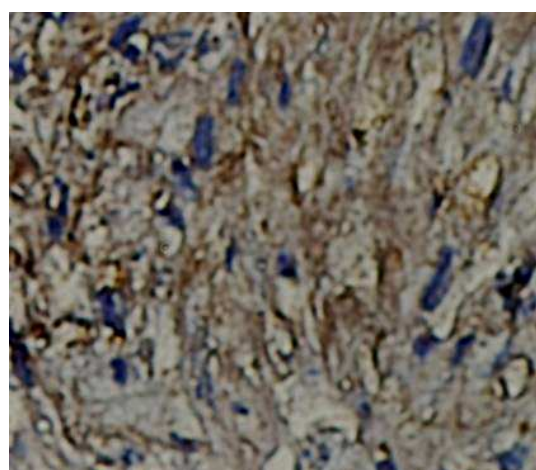
**بحث**

پس از دستیابی محققین به سلول‌های بنیادی، استفاده از انواع سلول‌های بنیادی در جهت سلول درمانی و مهندسی بافت به‌طور روزافزون رو به گسترش است. گرچه سلول‌های بنیادی رویانی، پتانسیل تمایز به انواع سلول‌های مشتق از سه لایه‌ی اکتودرم، اندودرم و

آنتی‌بادی‌های آگریکان، وجود ترکیبات ویژه‌ی غضروف (آگریکان و کلاژن نوع II) را مشخص نمود. از آن جا که ماده‌ی دی‌آمینوبنزیدین تحت تأثیر آنزیم پراکسیداز متصل به آنتی‌بادی ثانویه به رسوب قهوه‌ای رنگ تبدیل می‌گردد، این رنگ دلیل بر اتصال آنتی‌بادی اولیه و ثانویه به ملکول‌های آگریکان و کلاژن نوع II می‌باشد (شکل ۶ و ۷).



شکل ۶. مقطع حاصل از تمایز در سیستم کشت Pellet جهت بررسی وجود آگریکان با تکنیک ایمونوهیستوشیمی (۳۰۰×). رنگ قهوه‌ای در ماتریکس خارج سلول‌ها نشان دهنده‌ی وجود آگریکان است.



شکل ۷. مقطع حاصل از تمایز در سیستم کشت Pellet جهت بررسی وجود کلاژن نوع II با تکنیک ایمونوهیستوشیمی (۴۰۰×). رنگ قهوه‌ای در ماتریکس خارج سلول‌ها نشان دهنده‌ی وجود کلاژن نوع II است.



تحقیق جهت جداسازی این سلول‌ها از سلول‌های دیگر فاقد این ویژگی، مانند سلول‌های خونی، استفاده شد.

تحقیقات پیشین نشان داده است که سلول‌های مزانشیمی بنیادی، مارکرهای سلول‌های رده‌ی خون‌ساز را بیان نمی‌کنند. بر این اساس مارکرهایی چون CD14، مارکر سلول ماکروفاژ، یا گیرنده‌ی لیپوبلی ساکارید و CD45، آنتی‌ژن مشترک لکوسیت مورد بررسی قرار گرفت. عدم بیان این مارکرها توسط سلول‌های به دست آمده از بافت چربی نشان داد که این سلول‌ها به رده‌ی سلول‌های خون‌ساز تعلق نداشتند؛ این یافته با گزارش‌های دیگر در زمینه‌ی بررسی مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مطابقت داشت (۳۲-۳۰، ۱۶). به علاوه وجود مارکر CD44 یا گیرنده‌ی هیالورونان و آنتی‌ژن تیموسیتی، CD90 نیز در سطح سلول‌های به دست آمده از بافت چربی همانند دیگر تحقیقات که این مارکرها جهت شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کار می‌برند، مشخص گردید (۳۲-۳۰، ۱۶). در این تحقیق نتایج فلوسیتومتری نشان داد که حدود ۹۱/۱۸ درصد سلول‌ها، مارکر CD44 و ۸۷/۱۴ درصد سلول‌ها، مارکر CD90 را در سطح خود دارند.

از آن جا که در بافت غضروفی عروق خونی و اعصاب وارد نمی‌شود و تعداد سلول‌های کندروسیت نیز در این بافت محدود است و آسیب‌های این بافت قابل ترمیم نیست، از طریق مهندسی بافت می‌توان با استفاده از سلول‌های بنیادی به بافت غضروفی دست یافت، که البته این امر به بررسی‌های وسیع و تحت شرایط مختلف نیاز دارد.

تحقیقات نشان داده است که جهت طراحی بافت غضروف وجود چند عامل ضروری است:

مزودرم را دارند، اما به وجود آمدن تراوما در مدل‌های پیوندی و هتک موازین اخلاقی در به دست آوردن اولیه این سلول‌ها از بلاستوسیت، به کارگیری سلول‌های بنیادی رویانی را در جهت ترمیم آسیب‌ها و معالجه‌ی بیماری‌ها محدود نموده است (۲۸).

سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان از جمله سلول‌های بنیادی دارای کاربرد در سلول درمانی و مهندسی بافت می‌باشند. با وجود تحقیقات وسیع در جهت تمایز دادن این سلول‌ها به انواع سلول‌های استخوانی، غضروفی، چربی و عصبی در *In vivo* و *In vitro* و نتایج رضایت‌بخش به دست آمده، دستیابی به این سلول‌ها با روش تهاجمی و ایجاد سائیدگی و خراش همراه است. به علاوه با افزایش سن فرد، تعداد و توان تمایز سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان کاهش می‌یابد (۳۰-۲۹). طی سال‌های اخیر سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی جدا و شناسایی گردیده و به دلایل مختلف مورد توجه محققین قرار گرفته است. بافت چربی زیر پوستی به راحتی قابل دسترسی است و سلول‌های بنیادی به تعداد فراوان از این بافت جدا می‌گردد. سلول‌های بنیادی مشتق از چربی نیاز به نگهداری طولانی مدت در بانک‌های سلولی همراه با صرف هزینه‌های بالا ندارد. نه تنها پیوند اتوگرافت که به دلیل نداشتن آنتی‌ژن HLA-DR، پیوند آلوگرافت سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی نیز بدون خطر رد پیوند و انتقال بیماری‌های واگیردار امکان‌پذیر است (۱۹). از این جهت در تحقیق حاضر از بافت چربی زیر جلدی ناحیه‌ی شکم، سلول‌های بنیادی تک هسته‌ای جدا و کشت داده شد. لازم به ذکر است که از مهم‌ترین ویژگی‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی، توانایی چسبندگی به سطوح پلاستیکی است. در این

از این شیوه بهره گرفته‌اند (۳۹-۴۰).

در حالی که برخی محققین وجود یکی از اعضای TGF- $\beta$  را برای القای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به غضروف ضروری و کافی می‌دانند، گروهی دیگر وجود این فاکتور را به‌تنهایی القاءکننده‌ی تمایز کندروژنیک نمی‌دانند و برخی دیگر ترکیبی از فاکتورهای رشد گوناگون را به‌کار گرفته‌اند تا بهترین و مناسب‌ترین شرایط جهت طراحی بافت غضروف را شناسایی نمایند.

از طرف دیگر در بررسی Indrawattana گزارش شده است که BMP-6 به‌تنهایی قادر به القای کندروژن نیست (۲۲) به‌علاوه در تحقیقات دیگر وجود BMP-6 را برای استخوان‌سازی داخل غضروفی لازم دانسته و نقش اساسی این فاکتور را در تشکیل استخوان گزارش کرده‌اند (۲۳-۲۴).

همچنین بررسی‌ها نشان داده است که طی تکامل رویان در مرحله‌ی پیش از هیپرتروفه شدن کندروسیت‌ها، BMP-6 بیان می‌شود. به‌علاوه BMP-6 میزان mRNA مربوط به کلاژن نوع X را در کشت تک‌لایه‌ای در کندروسیت‌های نابالغ و رده‌ی سلولی کندروژنیک ATDC5 افزایش می‌دهد (۲۵).

در تحقیق Sekiya و همکاران، سلول‌های استرومایی مغز استخوان انسانی در کشت میکروماس، بدون وجود سرم و در حضور TGF- $\beta$ 3 و دگزامتازون به سمت تمایز کندروژنیک پیش برده شد و با افزودن BMP-6 وزن توده پس از تمایز چندین برابر افزایش یافت. در بررسی وی بیان کلاژن نوع X و II پس از یک هفته مشخص گردید. وی نشان داد که BMP-6 می‌تواند تأثیر TGF- $\beta$ 3 را در کندروژن با تولید گلیکوزآمینوگلیکان‌ها بیشتر نماید (۲۶). با توجه به

بر اساس تعامل بین سلولی، به ترتیب از طریق سیستم کشت میکروماس یا Pellet culture و کشت بر روی داربست‌های سه بعدی می‌توان تعامل بین سلولی مناسب، جهت القای کندروژن فراهم کرد (۳۳-۳۴، ۲۷، ۱۶). مدیوم کندروژنیک دارای فاکتورهای رشد و سیتوکین‌های مناسب و عدم وجود سرم از ضروریات القای غضروف سازی محسوب می‌شود (۳۴-۳۵، ۲۷، ۱۶). از این رو در تحقیق حاضر سیستم کشت Pellet، جهت تمایز کندروژنیک به کار رفت. سیستم کشت Pellet برای اولین مرتبه جهت کشت کندروسیت‌ها در شرایطی که فنوتیپ تمایز یافته‌ی خود را حفظ نمایند، توسط Holtzer در سال ۱۹۶۰ شرح داده شد (۹). سپس Johnstone و همکاران در سال ۱۹۹۸ از روش کشت توده‌ای (Aggregate) جهت تمایز کندروژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان خرگوش استفاده نمودند. ایشان در مطالعه‌ی خود  $2 \times 10^5$  سلول را پس از سانتریفوژ در محیط کندروژنیک کشت دادند و فاکتور رشد TGF- $\beta$ 1 با غلظت‌های مختلف و دگزامتازون به طور مجزا یا توأم جهت القای غضروف‌سازی به کار بردند (۲۷).

از آن زمان تا کنون محققین جهت دستیابی به اهداف گوناگون از این شیوه‌ی کشت Pellet استفاده نموده‌اند. برخی محققین برای بررسی تأثیر فاکتورهای رشد مختلف بر روند تمایز کندروژنیک (۳۷-۳۵، ۲۵)، گروهی جهت مقایسه‌ی ویژگی‌های سلول‌های مزانشیمی بنیادی مشتق از بافت‌های مختلف و یا گونه‌های متفاوت (۳۸، ۱۹) و برخی دیگر برای مطالعه‌ی حوادث ملکولی و ژنی طی روند غضروف‌سازی و بررسی دقیق ساختار حاصل از تمایز

مبنی بر تأثیر فاکتور رشد BMP-6 در سیستم Pellet جهت القای کندروژنز سلول‌های بنیادی مشتق از چربی به دست نیامده است و در تحقیق حاضر برای نخستین مرتبه القای غضروف‌سازی سلول‌های ADSCs در سیستم Pellet انجام شده است؛ اگرچه استفاده از این فاکتور رشد در روند کندروژنیک سلول‌های بنیادی مشتق از مغزاستخوان انجام گرفته است (۲۲).

به طور خلاصه از تحقیق حاضر می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی زیرجلدی انسانی تحت تأثیر فاکتور رشد BMP-6 در سیستم کشت Pellet قابلیت تمایز به بافت غضروفی را دارند و می‌توان از این سلول‌ها جهت طراحی بافت غضروفی استفاده نمود.

گزارش‌های مختلف که تأثیر عوامل رشد گوناگون را در روند کندروژنز بسته به نوع سلول بنیادی مزانشیمی، روش کشت به کار رفته، گونه‌ی حیوانی، شرایط کشت، دانستنی‌های سلولی به طور متفاوت بیان کرده‌اند، تناقض‌های مختلف در این زمینه همچنان وجود دارد. جهت به دست آوردن شرایط مطلوب و استاندارد در روش کندروژنز از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، شناسایی روش‌های مطمئن کاربردی و پیوند بافت طراحی شده حاصل، تحقیقات بسیاری لازم است. از این رو در تحقیق حاضر سلول‌های بنیادی از بافت چربی جداسازی، تکثیر و شناسایی گردید و تمایز کندروژنیک در سیستم Pellet تحت تأثیر فاکتور رشد BMP-6 مورد مطالعه قرار گرفت. لازم به ذکر است که تا کنون هیچ‌گونه گزارشی

## References

- Mansour JM, Mow VC. The permeability of articular cartilage under compressive strain and at high pressures. *J Bone Joint Surg Am* 1976; 58(4): 509-16.
- Junqueira L, Carneiro J. Basic histology: text & atlas. 11<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2005. p. 120-33.
- Hardingham T, Tew S, Murdoch A. Tissue engineering: chondrocytes and cartilage. *Arthritis Res* 2002; 4(Suppl 3): S63-S68.
- Mitchell N, Shepard N. The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone. *J Bone Joint Surg Am* 1976; 58(2): 230-3.
- Fautrel B, Hilliquin P, Rozenberg S, Allaert FA, Coste P, Leclerc A, et al. Impact of osteoarthritis: results of a nationwide survey of 10,000 patients consulting for OA. *Joint Bone Spine* 2005; 72(3): 235-40.
- Anonymous prevalence and impact of arthritis by race and ethnicity-US, 1989-1991. *Morb Mortal Wkly Rep* 1996; 10: 373-8.
- Kuo CK, Li WJ, Mauck RL, Tuan RS. Cartilage tissue engineering: its potential and uses. *Curr Opin Rheumatol* 2006; 18(1): 64-73.
- Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, et al. Harrison's principles of internal medicine. 17<sup>th</sup> ed. Philadelphia: McGraw-Hill Professional; 2008.
- Tew SR, Kwan AP, Hann A, Thomson BM, Archer CW. The reactions of articular cartilage to experimental wounding: role of apoptosis. *Arthritis Rheum* 2000; 43(1): 215-25.
- Holtzer H, Abbott J, Lash J, Holtzer S. The loss of phenotypic traits by differentiated cells in vitro. I. differentiation of cartilage cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1960; 46(12): 1533-42.
- Homicz MR, Chia SH, Schumacher BL, Masuda K, Thonar EJ, Sah RL, et al. Human septal chondrocyte redifferentiation in alginate, polyglycolic acid scaffold, and monolayer culture. *Laryngoscope* 2003; 113(1): 25-32.
- Karbaci S. The evaluation of physicochemical factors on articular chondrocytes metabolism in biodegradable polyurethane scaffold for cartilage tissue engineering. [Ph.D thesis]. Tehran: Amir Kabir Industry University; 2005. [in Persian].
- Esfandiary E, Amirpour N, Fesharaki M, Nasr Esfahani MH, Molavi F, Molavi F, et al. Access to chondrocyte culture, with alginate, In Iran. *Yakhteh Med J* 2008; 10(1): 73-5.
- Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose

- gels. *Cell* 1982; 30(1): 215-24.
15. Vacanti CA, Upton J. Tissue-engineered morphogenesis of cartilage and bone by means of cell transplantation using synthetic biodegradable polymer matrices. *Clin Plast Surg* 1994; 21(3): 445-62.
  16. 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): 4279-95.
  17. Xu Y, Malladi P, Wagner DR, Longaker MT. Adipose-derived mesenchymal cells as a potential cell source for skeletal regeneration. *Curr Opin Mol Ther* 2005; 7(4): 300-5.
  18. Dicker A, Götherström C, Aström G, Tammik C, Arner P, Le Blanc K. Functional characterization of human mesenchymal stem cell-derived adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 311(2): 391-7.
  19. 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): 118-29.
  20. O'connor WJ, Botti T, Khan SN, Lane JM. The use of growth factors in cartilage repair. *Orthop Clinics North Am* 2000; 31(3): 399-409.
  21. Majumdar MK, Wang E, Morris EA. BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1. *J Cell Physiol* 2001; 189(3): 275-84.
  22. Indrawattana N, Chen G, Tadokoro M, Shann LH, Ohgushi H, Tateishi T, et al. Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320(3): 914-9.
  23. Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85-A(8): 1544-52.
  24. Li WJ, Tuli R, Huang X, Laquerriere P, Tuan RS. Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold. *Biomaterials* 2005; 26(25): 5158-66.
  25. Denker AE, Haas AR, Nicoll SB, Tuan RS. Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: I. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 in high-density micromass cultures. *Differentiation* 1999; 64(2): 67-76.
  26. Sekiya I, Colter DC, Prockop DJ. BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284(2): 411-8.
  27. 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): 265-72.
  28. Erdo F, Buhrle C, Blunk J, Hoehn M, Xia Y, Fleischmann B, et al. Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23(7): 780-5.
  29. Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, Cho H, Matsumoto N, Itokazu Y, et al. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest* 2004; 113(12): 1701-10.
  30. Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004; 95(5): 209-14.
  31. Kassem M, Mosekilde L, Eriksen EF. 1,25-dihydroxyvitamin D3 potentiates fluoride-stimulated collagen type I production in cultures of human bone marrow stromal osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 1993; 8(12): 1453-8.
  32. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411): 143-7.
  33. Estes BT, Wu AW, Guilak F. Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6. *Arthritis Rheum* 2006; 54(4): 1222-32.
  34. Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, Gimble JM, Guilak F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials* 2004; 25(16): 3211-22.
  35. Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Reger RL, Prockop DJ. Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell Tissue Res* 2005; 320(2): 269-76.
  36. Mehlhorn AT, Niemeyer P, Kaschte K, Muller L, Finkenzeller G, Hartl D, et al. Differential effects of BMP-2 and TGF-beta1 on chondrogenic differentiation of adipose derived stem cells. *Cell Prolif* 2007; 40(6): 809-23.
  37. Hashemibeni B, Razavi SH, Esfandiary E, Karbasi S, Mardani M, Nasresfahani M. Induction of chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells with TGF- $\beta$ 3 in Pellet culture system. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 2008; 11(1): 10-7.
  38. Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, Ishiguro T, Okumura M, Iwanaga T, et al. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells in Pellet cultural system. *Exp Hematol* 2004; 32(5): 502-9.
  39. 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. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99(7): 4397-402.

40. Lee SJ, Jeon HB, Lee JH, Yoo JS, Chun JS, Yoo YJ. Identification of proteins differentially expressed during chondrogenesis of mesenchymal cells. FEBS Lett 2004; 563(1-3): 35-40.

Received: 2009.1. 14

Accepted: 2009.9. 23

**The Effect of BMP-6 Growth Factor on Differentiation of Adipose-derived Stem Cells into Chondrocyte in Pellet Culture System****Batool Hashemibeni PhD\***, **Shahnaz Razavi PhD\*\***, **Ebrahim Esfandiary MD, PhD\*\*\***, **Mansour Salehi PhD\*\*\*\***, **Saeed Karbasi PhD\*\*\*\*\***, **Mohammad Mardani PhD\*\***, **Fateme Nadali PhD\*\*\*\*\***, **Farzaneh Sadeghi MSc\*\*\*\*\***, **Abdolreza Sabahi PhD\*\***, **Fatemeh Amuzegar\*\*\*\*\***, **Vida Homayuni MSc\*\*\*\*\***

\* Assistant Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

\*\* Associate Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

\*\*\* Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

\*\*\*\* Associate Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

\*\*\*\*\* Assistant Professor, Department of Physics and Medical Engineering, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

\*\*\*\*\* Assistant Professor, Department of Pathology and Hematology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

\*\*\*\*\* Department of Anatomy, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

\*\*\*\*\* Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

**Background:****Abstract**

Cartilage damaged by trauma or degenerative arthritis has a limited capacity for regeneration most likely because of its avascularity and low cellularity. In this study, adipose-derived stem cells were cultured in chondrogenic medium supplemented isolated from adipose tissue then were induced for chondrogenesis with BMP-6 in Pellet culture system.

**Methods:**

Human adipose tissues obtained from cesarean section and ADSCs were isolated and characterized by flowcytometry techniques for CD14, CD44, CD45, and CD90 markers. To induct of chondrogenesis ADSCs were cultured in Pellet culture for 21 days in chondrogenic medium supplemented with BMP-6. Resulted constructs were investigated by histological, immunohistochemical and RT-PCR methods.

**Findings:**

ADSCs were expressed CD44, CD90 and not CD14 or CD45. ADSCs chondrogenesis was occurred successfully. Stained-sections in H-E and alcian blue were showed chondrocytes in lacuna with sulfated proteoglycans extracellular matrix. Existence of collagen type-II and aggrecan was proved in constructs by immunohistochemical study. RT-PCR method was exhibited collagen type-II and aggrecan genes expression in differentiated cells.

**Conclusion:**

Human adipose-derived stem cells are excellent candidate for cartilage tissue engineering. In Pellet culture ADSCs in presence of BMP-6 were induced for chondrogenesis.

**Key words:**

**Chondrogenesis, Adipose-derived stem cells, Tissue engineering, Collagen type II, BMP-6, Pellet culture system**

**Page count:**

14

**Tables:**

1

**Figures:**

9

**References:**

40

**Address of Correspondence:**

Ebrahim Esfandiary MD, PhD, Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.  
E-mail: esfandiari@med.mui.ac.ir