



# The Best Autologous Cell Sources for Articular Cartilage Regeneration with Critical Size Defects in an Ovine Knee Joints Model

Zarei F<sup>a</sup>, Shafaghi R<sup>b</sup>, Dehghan MM<sup>c</sup>, Mostafae F<sup>d</sup>, Taghiyar L<sup>e,\*</sup>, Baghaban Eslaminejad MR<sup>f,\*</sup>

<sup>a</sup> MSC, Department of Stem Cells, Royan Institute, Tehran, Iran. E-mail: zareii.91.fatemeh@gmail.com

<sup>b</sup> BSC, Department of Biotechnology, Alzahra University, Tehran, Iran. E-mail: raziiehshafaghy2000@gmail.com

<sup>c</sup> Professor, Department of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, Iran. E-mail: mdehghan@ut.ac.ir

<sup>d</sup> MSC, Department of Stem Cells, Royan Institute, Tehran, Iran. E-mail: [farhadm81@yahoo.com](mailto:farhadm81@yahoo.com)

<sup>e</sup> Assistant Professor, Department of Stem Cells, Royan Institute, Tehran, Iran. E-mail: [ltaghiyar@gmail.com](mailto:ltaghiyar@gmail.com), [leilataghiyar@royaninstitute.org](mailto:leilataghiyar@royaninstitute.org)

<sup>f</sup> Professor, Department of Stem Cells, Royan Institute, Tehran, Iran. E-mail: [Eslaminejad@royaninstitute.org](mailto:Eslaminejad@royaninstitute.org)

## Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation: Zarei F, Shafaghi R, Dehghan MM, Mostafae F, Taghiyar L, Baghaban Eslaminejad MR. The Best Autologous Cell Sources for Articular Cartilage Regeneration with Critical Size Defects in an Ovine Knee Joints Model. Journal of Cell and Tissue . 2023; 14(4): 353-372

<https://10.61186/JCT.14.4.353>

## KEYWORDS

Critical-size Defect, Adipose-derived MSCs, Bone Marrow-Derived MSCs, chondrocytes transplantation.

## ABSTRACT

**Aim:** Cartilage defects of the knee such as osteoarthritis disease (OA) are one of the most debilitating and public diseases that are related to high individual and socioeconomic problems. Many recent studies have applied mesenchymal stem cells (MSCs) incorporated with tissue engineering to repair articular cartilage defects or regeneration of OA. So, the choice of the best cell type in this regard is one of the challenging issues of tissue engineering and OA cell therapy. This study aims to find the best cell source for the regeneration of critical size defects of cartilage knee using autologous chondrocytes and bone marrow-derived MSCs (Bm-MSCs), and adipose-derived MSCs (Ad-MSCs) that were isolated, cultured, and expanded in similar in vitro conditions.

**Materials and Methods:** In the current study, Najdi sheep were used at 12 months of age. After standard anesthesia, cartilage was isolated from the hyaline cartilage at the end of the ribs. The Bm-MSCs and Ad-MSCs were isolated from bone marrow and tails' adipose tissue, respectively. Following the enzymatic digestion of cartilage and adipose tissues, using collagenase I enzymes, the chondrocyte, Ad-MSCs, and Bm-MSCs were cultured in growth media at 37° C with similar conditions. Then, MSCs were identified by morphology analysis and also osteogenic/adipose/chondrogenic differentiation, in vitro. In addition, chondrocytes were identified by morphology and analysis of cartilage-related gene expression such as Aggrecan, Col II, and SOX9 genes by Real-time PCR technique. After that, an amount of  $5 \times 10^6$  cells/ml from each cell source was seeded in the type I collagen gel and transplanted into an experimentally created articular cartilage defect in the knee's sheep model. Two months after transplantation, the

\* Corresponding author. Tel: 0212356524

E-mail address: [eslami@royaninstitute.org](mailto:eslami@royaninstitute.org), [leilataghiyar@royaninstitute.org](mailto:leilataghiyar@royaninstitute.org)

DOI: <https://10.61186/JCT.14.4.353>

Received: 8 Nov. 2023; Received in revised form: 28 Jan. 2024; Accepted: 29 Jan. 2024

Original Article

©Author



animals were sacrificed in the standard ways and the implanted tissue was removed. The range of regeneration was investigated by macroscopic scoring and histological staining such as H&E and safranin o/fast green.

**Results:** MSCs showed spindle shape of morphology, and skeletal differentiation were confirmed the identity of MSCs and chondrocytes. The macroscopic observation showed that the defects in cell-treated groups of chondrocytes, Bm-MSCs, and Ad-MSCs were filled with hyaline cartilage-like tissue in contrast to the control groups of untreated and sham (without cell) groups. In addition, the surface of new cartilage formed in Bm-MSCs and chondrocyte groups appeared to be smoother than in the Ad-MSCs group and the hyaline cartilage of Bm-MSCs is more clearly than that of the Ad-MSCs group. Although histological scores (ranging from 1 to 4) were evaluated, there was no significant difference among the three experimental groups regarding newly formed cartilage repair tissues. Furthermore, the histological analysis of H&E and safranin O revealed that all defects were filled by chondrocyte-like cells that were enclosed in the secreted matrix (\*P<0.05).

**Conclusion:** We used three prevalent and main autologous cell sources such as chondrocyte, BM-MSCs, and AD-MSCs cells in exactly equal conditions to find the most significant cell sources for critical size defect of cartilage in sheep's knees. The results demonstrated that three cell sources are suitable for this purpose; Although the Ad-MSCs due to ease and more accessibility are further recommended.



## بهترین منبع سلول اتولوگ برای بازسازی نقایص با اندازه بحرانی مفاصل زانو در گوسفند

فاطمه زارعی<sup>۱</sup>، راضیه شفق<sup>۲</sup>، محمدمهدی دهقان<sup>۳</sup>، فرهاد مصطفایی<sup>۱</sup>، لیلا تقی یار<sup>۱\*</sup>، محمدرضا باغبان اسلامی نژاد<sup>۱\*</sup>،

<sup>۱</sup> پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست شناسی تکوینی، تهران، ایران

<sup>۲</sup> دانشگاه الزهراء، دانشکده علوم زیستی، تهران، ایران

<sup>۳</sup> دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، ایران

### چکیده

### واژگان کلیدی

**هدف:** استئوآرتریت (OA) یک بیماری ناتوان کننده با بار روانی و اقتصادی است. امروزه استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) بسیار مورد توجه است. لذا انتخاب منبع سلولی مناسب یکی از چالش‌های درمان OA است. هدف از این مطالعه بازسازی ضایعه غضروفی (اندازه بحرانی) در زانوی گوسفند با استفاده از سلول‌های اتولوگ کندروسیت، MSCs حاصل از بافت مغز استخوان (Bm-MSCs) و MSCs مشتق از بافت چربی (Ad-MSCs) که در شرایط کاملاً یکسان جداسازی و کشت شده است. **مواد و روش‌ها:** در مطالعه حاضر از گوسفند نژاد Najdi ۱۲ ماهه استفاده شد. کندروسیت‌ها از انتهای دنده، Bm-MSC از مغز استخوان و Ad-MSCs از بافت چربی گوسفند جدا شدند. سپس سلول‌های جدا شده در محیط‌های کشت و شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد یکسان کشت شدند. پس از بررسی هویت MSCs و کندروسیت‌ها، مقدار  $5 \times 10^6$  سلول در هر میلی‌لیتر ژل کلاژن نوع I کاشته شد. سپس به ضایعه غضروف در زانوی گوسفند پیوند شد. دو ماه پس از پیوند، میزان ترمیم با روش ماکروسکوپی و رنگ‌آمیزی بافت‌شناسی H&E و fast green/O Safranin بررسی شد. **نتایج:** هویت سلول‌های MSCs کندروسیت تایید شد. بر اساس مشاهدات در گروه‌های درمانی، آسیب توسط بافت غضروف شبه هیالین در مقایسه با گروه‌های کنترل (untreated) و sham پر شده است. همچنین، سطح بافت تشکیل شده در Bm-MSCs و کندروسیت صاف‌تر از گروه Ad-MSCs بود ( $p < 0.05$ ). غضروف هیالین Bm-MSCs واضح‌تر از گروه Ad-MSCs است. ولی تفاوت معنی‌داری نشان داده نشد. **نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد که سه منبع سلولی برای این منظور مناسب هستند. Ad-MSCs به دلیل سهولت دسترسی توصیه می‌شوند.

آسیب غضروفی با سبب بحرانی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل از مغز استخوان، سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل از بافت چربی، پیوند کندروسیت، پیوند

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۱۷

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۱۱/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۰۹

## ۱- مقدمه

استئوآرتریت (OA) یا آرتريت دژنراتیو یک بیماری پیش‌رونده، ناتوان‌کننده و مزمن سیستم اسکلتی است که با تخریب بافت غضروف و استخوان مفاصل همراه است (۱). شایع‌ترین نوع آرتريت و علت اصلی ناتوانی افراد در سنین کار یعنی ۱۸ تا ۶۵ سالگی در سراسر جهان است که منجر به تحمیل هزینه‌های اجتماعی، روانی و اقتصادی زیادی به دولت و خانواده‌ها می‌شود (۲). پیش‌بینی می‌شود آمار آرتروز زانو در ۱۰ سال آینده به دلیل نرخ رو به رشد چاقی و میانگین سنی جامعه افزایش یابد. برای مثال، مطالعات اخیر حاکی از آن است که ضخامت و حجم غضروف مفصلی در بیماران با متوسط سنی ۵۰ سال و شاخص توده بدنی (BMI) ۲۵ یا بالاتر، به طور قابل توجهی رابطه عکس دارد که نشان دهنده روند افزایشی آرتروز در افراد است (۳).

بافت غضروف مفصلی، علی‌رغم اینکه بافت ساده‌ای به نظر می‌رسد ولی چالش‌های زیادی برای ترمیم دارد. بافت غضروف هیالین، بدون عروق خونی و لنف بوده و کندروسیت‌ها تنها سلول‌های موجود در این بافت است که دارای تراکم اندک و پتانسیل پایینی برای ترمیم و تکثیر است. در مواقع آسیب این خصوصیات منحصر به فرد و از طرفی تحمل وزن بالای بدن باعث عدم انتقال مواد مغذی و فاکتورهای ترمیمی به محل مورد نظر شده و باعث تحلیل پیش‌رونده بافت می‌شود (۴-۷).

تا کنون درمان قطعی برای OA گزارش نشده است و اغلب ترکیبی از درمان‌های دارویی و غیر دارویی توصیه می‌شوند. درمان‌های دارویی در مراحل اولیه بیماری کاربرد دارند و اصولاً بسته به شدت تخریب مفاصل، شامل انواع تسکین دهنده‌های علائم درد بوده که مزایای بالینی و ترمیمی اندکی دارند. درمان‌های غیردارویی نیز منجر به کاهش درد، سفتی مفاصل و همچنین حفظ عملکرد مفاصل می‌شوند (۸-۱۱). در موارد شدیدتر، روش‌های تهاجمی‌تر مانند انواع عمل‌های جراحی مانند میکروفورکچر، کندروپلاستی و یا آرتروپلاستی زانو (TKA) (است که علاوه بر هزینه‌های بالا، در بسیاری موارد بعد از چندسال برگشت‌پذیر بوده و به جراحی مجدد نیاز دارد (۱۰ و ۱۲)).

علی‌رغم روش‌های درمانی نامبرده، آسیب غیرقابل بازگشت بافت غضروف و به دنبال آن تخریب بافت استخوان زیرغضروفی، از معضلات پزشکی بازساختی است. اخیراً، نقش ارزنده پیوند سلول و یا به عبارتی سلول درمانی در ترمیم و بازسازی ساختار و عملکرد بافت‌های مختلف از جمله غضروف مفصلی مشخص شده است. درمان‌های مبتنی بر سلول علاوه بر شرایط محیطی، عوامل رشد، محرک‌های شیمیایی و مکانیکی، به منبع و نوع سلول‌های استفاده شده نیز بستگی دارد (۱۳-۱۵).

یکی از بهترین و شناخته‌شده‌ترین منابع سلولی برای غضروف آسیب‌دیده، استفاده از سلول کندروسیت اتولوگ (ACI) است (۱۵). اگرچه ACI در بهبود بیماران تا حد زیادی موفق بوده است، ولی مشکلات و چالش‌های متعددی در رابطه با این رویکرد درمانی مطرح است. از جمله این چالش‌ها می‌توان به محدودیت در مقدار بافت غضروف بیمار برای جداسازی کندروسیت‌ها و از طرفی عمل جراحی برای برداشت بافت مورد نیاز که یک روش تهاجمی است، اشاره کرد. از همه مهم‌تر سلول‌های کندروسیت، سلول‌های بالغ و تخصص یافته بوده لذا تکثیر آن‌ها در آزمایشگاه با چالش‌های زیادی همراه است. این سلول‌ها قادر به کشت طولانی مدت *ex vivo* نبوده و پس از چند پاساژ سلولی دچار تمایززدایی یا آپوپتوزیس ناخواسته شده که بر اثربخشی ACI تاثیر به‌سزایی دارد (۱۶).

با توجه به محدودیت‌های ACI، پیشرفت‌های اخیر درمان‌های مبتنی بر سلول از جمله سلول‌های بنیادی آن را به کاندید ارزشمندی برای درمان OA تبدیل کرده است. از بین انواع سلول‌های بنیادی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) به‌عنوان یکی از بهترین منابع سلولی جایگزین در درمان مبتنی بر سلول OA به شمار می‌رود. سلول‌های MSCs به‌طور گسترده در آزمایشگاه تکثیر شده و ویژگی‌های بنیادی خود را حفظ کرده، قادر به تمایز به یک فنوتیپ غضروفی و یا استخوانی بوده و از همه مهم‌تر تعدیل‌کننده‌ی سیستم ایمنی هستند. لذا به‌دلیل بیان سطحی کم آنتی‌ژن‌های کمپلکس اصلی سازگاری بافتی (MHC)، رد ایمنولوژیک نداشته و پیوند کارآمد و همزیستی طولانی مدت در بدن میزبان از ویژگی‌های اصلی این سلول‌ها است (۱۷، ۱۸). منابع اولیه سلولی و دوز سلول نیز به‌طور قابل توجهی بر اثر بخشی سلول پیوند شده و درمان تاثیرگذار است. شایع‌ترین منبع سلول‌های MSCs، بافت مغز استخوان (BM) و چربی (AT) هستند (۱۶، ۱۹). علاوه بر منبع اولیه MSCs، اطلاعاتی مانند روش جداسازی سلولی، حجم بافت برداشت شده و پتانسیل تمایز نیز باید در نظر گرفته شود. به‌طور مثال حجم سلول‌های بنیادی در مغز استخوان تنها ۰/۰۱ درصد است و عواملی مثل سن اهداکننده و حجم بافت استخراج شده نیز بر تعداد سلول‌های MSCs به‌دست آمده تاثیر به‌سزایی دارد. بنابراین دستیابی به تعداد کافی سلول، به ویژه در بین اهداکنندگان مسن، دشوار است. در مقابل، بافت چربی را می‌توان به راحتی با روش‌های لیپکتومی و لیپوساکشن به‌دست آورد که در مقایسه با اسپیراسیون مغز استخوان خطر کمتری داشته و تعداد سلول تک هسته بیشتری را می‌توان از آن به‌دست آورد (۲۰).

مطالعات بالینی و پیش‌بالینی نشان داده که سلول‌های بنیادی جدا شده از منابع مختلف بافتی چون مغز استخوان، بافت چربی، خون بند ناف و یا پالپ دندان همگی پتانسیل تمایز به غضروف و استخوان را در آزمایشگاه نشان داده و از طرفی در مطالعات پیش‌بالینی انجام شده در آسیب‌هایی با سایز بحرانی در زانو مدل حیوانی رت، خرگوش و غیره... ترمیم قابل قبولی را نشان داده است، اگرچه هر کدام از این منابع سلولی محدودیت‌هایی دارند (۲۵-۲۱). اما تا کنون اثربخشی مقایسه‌ای از ترمیم آسیب مفصلی با استفاده از منابع سلول‌های اتولوگ به‌دست آمده در شرایط کاملاً استاندارد و یکسان جداسازی، کشت، پیوند، مکانیسم انتقال و دوز سلولی و خطر ریسک کم‌تری، طراحی و ارزیابی نشده است تا با حذف حداکثری عوامل متغیر از آزمایش بتوان منبع سلولی کاملاً بهینه را مشخص کرد (۲۰). لذا در مطالعه‌ی حاضر سه منبع سلولی کندروسیت، سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان و بافت چربی، بطور همزمان، در شرایط کاملاً یکسان از مدل حیوانی گوسفند جداسازی و در شرایط کشت آزمایشگاهی کاملاً یکسان کشت و تکثیر شده و در ضایعه غضروف تجربی با سایز بحرانی که به‌صورت تجربی در زانوی گوسفند ایجاد شد، پیوند و اثرات درمانی آن با هم مقایسه و بهترین منبع سلولی انتخاب شد.

## ۲- مواد و روش‌ها

**حیوانات آزمایشگاهی و جداسازی نمونه مغز استخوان، بافت چربی و غضروف:** مطالعه حاضر یک مطالعه آزمایشگاهی بوده و به تصویب کمیته اخلاق پژوهشگاه رویان رسیده است. در مطالعه حاضر تعداد ۸ راس گوسفند نژاد Najdi و با سن تقریبی ۱۲ ماه مورد استفاده قرار گرفت. حیوانات در مزرعه حیوانات بزرگ پژوهشگاه رویان در منطقه هلیجرده استان کرج در شرایط استاندارد، نگهداری شدند. برای جداسازی بافت‌های چربی، مغز استخوان و غضروف دنده‌ای ابتدا حیوانات با ۲۲ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن کتامین و ۰/۲ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن زایلزین بی‌هوش شدند، سپس محل مورد نظر ابتدا به روش استریلاسیون عمومی با بتادین به‌طور کامل استریل و شویو شد. پس از استریلاسیون مجدد، بیوپسی مغز استخوان تحت بی‌هوشی کامل از استخوان تیپا انجام شده و حدود ۴-۵ میلی‌لیتر مغز استخوان در سرنگ حاوی ۱۵۰۰۰ واحد هپارین (۷۵۰ واحد به

ازاء هر میلی لیتر مغز استخوان) جمع آوری شد. برای بافت غضروف مشابه جداسازی مغز استخوان محل استریل و سپس نمونه غضروف از انتهای دنده حیوان به حجم ۱۰-۵ گرم جداسازی شد. مشابه موارد قبل پس از استریل کردن محل مورد نظر، ۱۰ میلی لیتر چربی از بافت چربی زیر پوستی در ناحیه شکم جداسازی و نمونه‌ها به‌طور جداگانه در ظروف استریل و بر روی یخ نگهداری و بلافاصله به آزمایشگاه کشت سلول‌های بنیادی پژوهشگاه رویان ارسال شدند.

**جداسازی، کشت و تکثیر سلول‌های MSCs مشتق از مغز استخوان:** کشت و جداسازی سلول‌های MSCs از نمونه مغز استخوان مشابه تحقیقات پیشین گروه حاضر انجام شد (۲۶، ۲۷). به‌طور خلاصه، هر ۱ میلی لیتر از خون مغز استخوان به ظروف کشت ۱۵۰ سانتی متر مربع منتقل شده و ۱۰ میلی لیتر محیط کشت DMEM (Dubleco's Modified sigma؛ UAD) و ۱۰ واحد آنتی بیوتیک پنی سیلین و (Eagles Medium، Gibco؛ USA) FBS (Fetal Bovine Serum، Gibco؛ USA) و ۱۰ واحد آنتی بیوتیک پنی سیلین و استرپتومایسین اضافه گردید و به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی متر منتقل گردید. ۳ تا ۴ روز پس از آغاز CO<sub>2</sub> گراد و ۵ درصد کشت، محیط رویی به آرامی تخلیه و پس از یکبار شستشو با محلول PBS (Gibco؛ USA) ۱۰ میلی لیتر محیط کشت تازه اضافه شد. با این عمل سلول‌های خونی و غیرچسبیده از محیط کشت حذف شدند. محیط کشت هر ۳-۴ روز یک‌بار تعویض شد تا زمانی که سلول‌ها ۶۰ الی ۷۰ درصد ظرف کشت را پر کردند. سپس پاساژ اول صورت گرفت به این ترتیب که محیط رویی سلول‌ها تخلیه و پس از شستشو سلول‌های چسبیده با بافر PBS (آمریکا؛ Gibco)، ۵ میلی لیتر آنزیم Trypsin/ EDTA (Gibco؛ USA) ۲ درصد به سلول‌ها اضافه و به‌مدت ۳-۴ دقیقه در انکوباتور قرار داده شده تا سلول‌ها از کف ظرف جدا گردد. سپس آنزیم با ۳ میلی لیتر محیط DMEM خنثی شد. سلول‌ها به لوله ۱۵ میلی لیتر منتقل و با دور ۱۲۰۰g به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محیط رویی سلول‌ها تخلیه و پلت سلولی در ۱ میلی لیتر محیط DMEM سوسپانسیس گردید و به نسبت ۱ به ۳ به فلاسک کشت ۱۵۰ سانتی متر مربع منتقل شدند. در ادامه با انجام چند پاساژ سلولی، تعداد کافی سلول MSCs تکثیر و برای انجام آزمایشات بعدی در تانک ازت دارای دمای منهای ۱۹۵ منجمد و نگهداری شدند.

**جداسازی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی:** سلول‌های AD-MSCs مطابق روش Ejaz و همکاران جداسازی و کشت شد (۳۵). به این ترتیب که نمونه چربی تحت شرایط استریل و در محلول سرم فیزیولوژی حاوی ۱ درصد آنتی بیوتیک به پژوهشگاه رویان منتقل شد. بافت چربی ۳-۴ بار با محلول PBS شستشو شد تا خون و آلودگی‌های احتمالی از نمونه جدا شود. سپس بافت چربی به کمک تیغ اسکالپل تا حد امکان تکه تکه شد. سپس ترکیب به‌دست آمده به محلول کلاژناز (sigma؛ USA) ۰/۲ درصد منتقل و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور نگهداری شد. در طی این مدت هر ۵ دقیقه یکبار نمونه‌ها بر روی ورتکس به‌مدت ۱۰-۲۰ ثانیه لیز شد تا زمانی که بافت به حالت محلول کاملاً بی‌شکل و یکدست تبدیل شد. سپس آنزیم کلاژناز با ۴ میلی لیتر محیط کشت حاوی سرم خنثی شد و سپس در دور ۱۵۰۰g به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سلول‌های تک هسته که به‌صورت پلت سلولی در کف لوله سانتریفیوژ ته‌نشین شده بودند، به آهستگی و به کمک پیپت ۵ میلی لیتر جمع آوری شدند. سپس به لوله ۱۵ میلی لیتر منتقل و به‌کمک ۵ میلی لیتر محیط کشت سوسپانسیس شدند. سلول‌ها در نهایت به‌کمک سانتریفیوژ جداسازی و به ظرف کشت ۷۵ سانتی متر مربع منتقل شدند و محیط کشت DMEM حاوی ۱۵ درصد سرم گاوی به سلول‌ها اضافه و به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد منتقل شد.

**بررسی مورفولوژی و پتانسیل تمایز سلول‌های *Bm-MSCs* و *Ad-MSCs* به دودمان‌های اسکلتی:** به منظور اثبات مزانشیمی بودن سلول‌های جدا شده از مغز استخوان و بافت چربی، ابتدا مورفولوژی آن‌ها بررسی و سپس پتانسیل تمایز آن‌ها به دودمان‌های اسکلتی بررسی شد. سلول‌های *Bm-MSCs* و *Ad-MSCs* هر دو مورفولوژی دوکی شکل و فیبروبلاستی کشیده داشته و با ایجاد کلنی‌های سلولی تکثیر شده و جمعیت همگن و یکدست را تولید کردند. برای بررسی تمایز این سلول‌ها به غضروف از روش کشت پلت (Micro mass) به این ترتیب استفاده شد که  $2 \times 10^5 - 3$  سلول حاصل از پاساژ ۳ بوسیله لام نئوبار شمارش شد و در لوله ۱۵ میلی‌لیتر سانتیفریوژ شد تا پلت سلولی تشکیل شد، سپس محیط رویی تخلیه شده و محیط تمایز کندروژنیک شامل محیط DMEM حاوی ۱۰۰ میکروگرم پیرووات، ۶/۲۵ میلی‌گرم انسولین (ایران؛ SUPA)، ۱۰ نانوگرم فاکتور رشد TGF- $\beta 3$  (Transforming Growth Factor Beta 3)، ۱۰ مولار دگزامتازون (آمریکا؛ sigma)، ۶/۲۵ میلی‌گرم ترانسفرین، ۶/۲۵ میلی‌گرم سلنیوس اسید، ۵۰ میکروگرم اسکوربیک ۲-فسفات، ۳/۳۵ میلی‌گرم لینولئیک اسید و ۱۰ نانوگرم BMP-6 و ۱ درصد سرم گاوی اضافه شد. محیط تمایز هر ۳-۴ روز یکبار به مدت ۳ هفته تعویض شد. برای ارزیابی تمایز به غضروف از روش رنگ‌آمیزی اختصاصی تولوئیدین بلو استفاده شد. برای این منظور، نمونه‌ها به روش روتین بافتی پردازش و برش‌های ۵ میکرومتری از آن‌ها تهیه شد. به‌طور خلاصه، سلول‌ها به مدت ۲ ساعت در پارا فرمالدهید ۴ درصد فیکس شدند. سپس به ترتیب با استفاده از الکل و زایلول آب‌گیری و شفاف‌سازی و در انتها در پارافین قالب‌گیری شدند و با استفاده از میکروتوم، برش‌های ۵ میکرومتری تهیه شد. به‌منظور رنگ‌آمیزی، رنگ تولوئیدین بلو به مدت ۳۰ ثانیه در دمای اتاق به سلول‌ها اضافه و در انتها رنگ اضافی با آب مقطر شسته شد. برش‌های رنگ شده با استفاده از میکروسکوپ نوری مشاهده شدند.

برای بررسی تمایز به استخوان و چربی سلول‌های حاصل از پاساژ دوم، پس از ذوب، در ظرف کشت ۶ خانه‌ای کشت شدند. پس از پر شدن ۷۰-۸۰ درصد ظرف کشت، محیط تمایز استخوان و چربی، به صورت مجزا جایگزین محیط کشت سلولی شد. محیط استئوژنیک شامل محیط DMEM، ۱۰ درصد سرم FBS، ۲/۱۶ گرم در لیتر ۶-گلیسرول فسفات و ۱۹۶۰ میکرولیتر دگزامتازون و محیط آدیپوژنیک شامل محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی و ۰/۰۵۰ میلی‌گرم اسکوربیک اسید، ۱۹۶۰ میکرولیتر دگزامتازون، ۰/۰۵۰ میلی‌گرم ایندومتاسین استفاده شد. محیط هر ۳-۴ روز یکبار به مدت ۲۱ روز تعویض شد. در پایان هفته سوم، تمایز سلول‌ها به استخوان با استفاده از رنگ‌آمیزی اختصاصی آلیزارین رد (Alizarin red) و تمایز به چربی با رنگ‌آمیزی اوایل رد (Oil red) ارزیابی شد. به این ترتیب که ابتدا سلول‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با فرمالین ۱۰ درصد در دمای اتاق فیکس شدند. سپس سلول‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با رنگ آلیزارین رد، برای بررسی تمایز به استخوان و با رنگ ۰/۵ درصد اوایل رد در متانل، برای بررسی تمایز به چربی رنگ‌آمیزی شدند. در آخر نیز شستشو با آب مقطر انجام شد تا رنگ اضافی خارج شد. تشکیل مواد معدنی استخوانی و یا قطرات چربی با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شد.

**بررسی بیان ژنی با استفاده از تکنیک *RT-PCR*** بررسی بیان ژن‌های اختصاصی بافت‌های استخوانی، چربی و غضروفی مشابه مطالعه پیشین گروه حاضر انجام شد (۲۶). در ابتدا با استفاده از کیت Nucleospin RNA II kit (740955; Macherey-Nagel, Germany) کل RNA سلول‌های تمایز یافته به استخوان، چربی و غضروف استخراج شد. نمونه‌های RNA استخراج شده با Dnase I (104132.Roch) تحت تیمار قرار گرفتند تا آلودگی‌های احتمالی مربوط به DNA ژنومیک از نمونه‌های RNA حذف شود. سپس خلوص و غلظت RNA استخراج شده با روش اسپکتروفوتومتری تعیین شد. در ادامه یک میکروگرم از RNA استخراج شده با استفاده از پرایمر Random Hexamer و کیت Revert AidTMH Minus First Strand (K Fermentas) cDNA Synthesis نسخه‌برداری معکوس شد. سپس از cDNA تولیدشده به‌عنوان الگو برای PCR استفاده شد. برای این

منظور حجم 2  $\mu\text{l}$  cDNA(100ng/ $\mu\text{l}$ ) 2/5  $\mu\text{l}$  PCR Buffer (AMS) 2/5  $\mu\text{l}$   $\mu\text{MgCl}_2$  0/75 (10x)  $\mu\text{l}$  و 0/5dNTPmix (50mM)  $\mu\text{l}$  (10mM) از هر پرایمر 1 (5  $\mu\text{M}$ )  $\mu\text{l}$ ، 0/5Smar Taq (5unit/1  $\mu\text{l}$ )  $\mu\text{l}$  (سیناژن، TA8110C) در یک لوله PCR با هم ترکیب شده و در نهایت با استفاده از آب دوبر تقطیر به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. برای پی بردن به بیان ژن های مورد مطالعه در این تحقیق از پرایمرهای جدول ۱ استفاده شد.

جدول ۱: لیست پرایمرهای استفاده شده در مطالعه حاضر

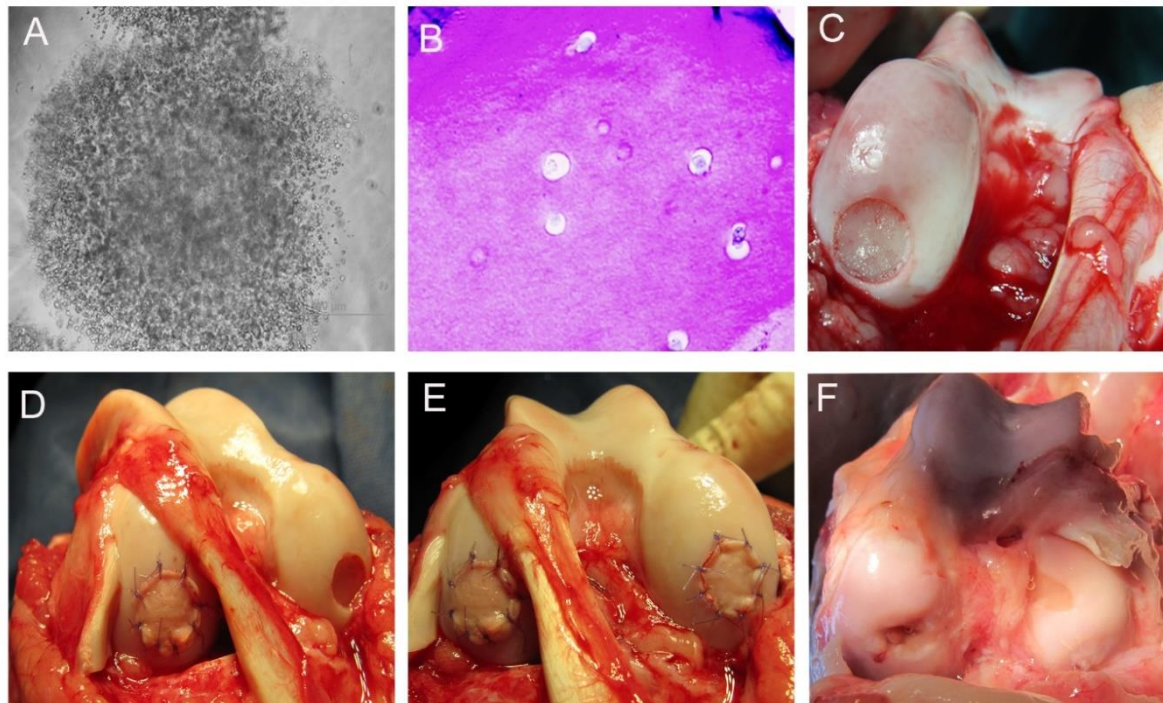
Accession Number	Gene Name Primer	Sequence	Annealing Time
FJ200438	Aggrecan	F: 5' ttg gac ttt ggc aga ata cc 3' R: 5' ctt cca cca atg tcg tat cc 3'	59
FJ200439	Collagen II	F: 5' gcg gag act act gga ttg R: 5' ttt ctt gtc ctt gct ctt gc 3'	58
FJ200440	PPAR alpha	F: 5' agaacaaggaagcgaagtc 3' R: 5' atcccgctttgttcatcac 3'	60
FJ200441	PPAR gama	F: 5' aagagcagagcaaagagggtg3' R: 5' gggcttcacattcaacaac 3'	60
FJ200442	Coll I	F: 5' ccc aga aca tca cct acc ac 3' R: 5' gga ggg agt tta cag gaa gc 3'	59
FJ200435	LPL	F: 5' tct ctt ggg ata cag cct tg 3' R: 5' atg ccc tac tgg ttt ctg 3'	60
XM001504101.1	Coll X	F: 5' act gag cga tac caa aca cc 3' R: 5' ggt cca ttt agt cct ctc tcc 3'	58
DQ152956.1	GAPDH	F: 5' gga gaa acc tgc caa gta tg 3' R: 5' tga gtg tcg ctg ttg aa gtc 3'	60
NM-001040009.1	Osteocalcin	F: 5' agc gag gtg gtg aag aga c 3' R: 5' gct cat cac agt cag ggt tg 3'	59
XM-001917620.1	Collagen type III	F: 5' ttg atg gtg cta ctt tga a 3' R: 5' aac atc ctc ctt caa cag c 3'	60

**جداسازی، کشت و تکثیر سلول های کندروسیت:** بافت غضروف هیالین تحت بی حسی موضعی از انتهای دنده آخر گوسفند در شرایط استریل جداسازی شد سپس در محلول  $\text{PBS}^-$  حاوی یک درصد آنتی بیوتیک به پژوهشگاه رویان منتقل شد. پس از ۳ تا ۴ بار شستشوی نمونه ها با  $\text{PBS}^-$  در زیر هود لامینار کلاس II بافت های همبند موجود در اطراف غضروف به طور کامل جدا و لایه غضروف به تکه های کوچک تقسیم شد. کشت و تکثیر سلول های کندروسیت مشابه روشی که مطالعه پیشین گروه حاضر ارائه شده است، انجام شد (۲۸). به این ترتیب که بافت غضروف ابتدا به تکه های ۲-۳ میلی متری برش شده و سپس یک میلی لیتر محلول ۰/۲ درصد کلاناز تیپ I و ۰/۱ درصد پروناز (حل شده در محیط بدون سرم) به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس کندروسیت های رها شده از غضروف به کمک فیلتر مش ۰/۲ میکرومتری جدا شده و در فلاسک های کشت ۷۵ سانتی متری کشت شد و ۱۰ میلی لیتر محیط کشت حاوی ۱۵٪ سرم گاوی اضافه و سپس به انکوباتور منتقل شد. کندروسیت ها پس از ۲۴ ساعت به کف ظرف چسبیده و شروع به تکثیر کردند. پس از یک هفته کندروسیت ها به کمک Trypsin-EDTA ۰/۲ درصد از کف ظرف کنده شدند و به ظرف جدید انتقال یافتند. یک هفته پس از پاساژ اول، پاساژ دوم انجام شد.

**آماده سازی سلول ها برای انجام پیوند:** برای انجام پیوند سلولی نیاز به کشت سه بعدی آن ها بود. بنابراین سلول های کندروسیت ها، Bm-MSCs و Ad-MSCs به روش سه بعدی در ژل کلانژن I مشابه مطالعه قبلی گروه حاضر کشت شدند (۲۹).

ابتدا سلول‌های حاصل از پاساژ ۲-۳ به کمک محلول Trypsin-EDTA ۰/۲ درصد از کف ظرف کنده شد و پس از رنگ‌آمیزی با رنگ حیاتی (Sigma, USA) PKH به کمک لام نفوبار شمارش سلولی انجام گرفت و سلول‌ها با تراکم  $10^6 \times 3-2$  در ۱ میلی‌لیتر محلول کلاژن I (Japan, Koken) شناور شده و سپس با توجه به اندازه آسیب تجربی ایجاد شده در غضروف مفصلی زانوی گوسفند، ۲ میلی‌لیتر کلاژن حاوی سلول در محلول ژل‌کننده کلاژن (ایجاد شده بر اساس دستورعمل شرکت تولیدکننده) منتقل شده و به فرم ژل در آمد. این مراحل به‌طور کامل بر روی یخ انجام شد و سپس ژل حاوی سلول به انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه منتقل شد و پس از اطمینان از بسته شدن ژل، بافر PBS-حاوی ۱ درصد سرم گاوی به سازه مورد نظر اضافه شد و سپس در شرایط آسپتیک با استفاده از انکوباتور پورتابل دستی به محل نگهداری حیوانات، جهت انجام عمل جراحی منتقل شد.

**ایجاد مدل کندگی غضروف و پیوند سازه‌های سلولی:** برای این منظور تحت شرایط استریل و توسط جراح دامپزشک ابتدا بی‌هوشی کامل حیوانات مشابه روش قبلی انجام شد. هم‌زمان با ایجاد کندگی غضروف، پیوند سازه سلولی آماده شده از قبل در محل پیوند مورد نظر انجام شد. به این ترتیب که ابتدا حیوانات تحت بیهوشی عمومی بیهوش شده و سپس زانوی حیوان پس از انجام استریل‌سازی با محلول بتادین و شیو محل، از قسمت میانی کشکک باز شد. تمام بافت‌های پوشاننده زانو در ناحیه فمور برداشته شدند. سپس به کمک دستگاه میکروموتور دندانپزشکی و سر مته مخصوص دفتکتی با ابعاد  $4 \times 4 \times 2$  میلی‌متر بر روی دو کندیل جانبی و میانی فمورال ایجاد شد. در مرحله بعد سازه سلولی در محل دفتکت مورد نظر قرار داده شد. سپس توسط بافت پریوستال که از سطح قدامی تیبیای خود حیوان برداشته شده بود، کاور شده و با سوچورهای قابل جذب به غضروف سالم اطراف فیکس شد. حیوانات تحت نگهداری در شرایط استریل و آب و غذای در دسترس تا ۶ ماه برای التیام بافت نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها پس از انجام مرگ استاندارد جمع‌آوری و برای آنالیزهای بافتی، پاتولوژی و مولکولی استفاده شدند.



شکل ۱: عمل جراحی قبل و بعد از پیوند سازه سلولی. (A) آماده‌سازی و کشت سلول‌های Ad-MSCs, Bm-MSCs و کندروسیت‌ها در ژل کلاژن I. (B) رنگ‌آمیزی H&E زنده‌مانی سلول‌ها در ژل کلاژن را نشان می‌دهد. (C) ایجاد آسیب مدل کندگی غضروف با سایز بحرانی، (D و E) پیوند سازه سلولی در محل آسیب ایجاد شده و بخیه لایه بافت پریوست بر محل پیوند، (F) نمونه غضروف مفصلی پس از ۸ هفته از زمان پیوند سازه سلولی.

**بررسی ترمیم بافت غضروف:** میزان ترمیم غضروف مفصلی به دو روش ماکروسکوپی و سیستم امتیاز دهی پاتولوژی و همچنین بررسی میکروسکوپی و تهیه نمونه بافتی انجام شد. بررسی نمونه‌ها از نظر نوع بافت تشکیل شده در محل بافت غضروف هیالین و یا غضروف فیبرو انجام شد.

**بررسی ماکروسکوپی:** برای بررسی ترمیم بافتی، توسط پاتولوژیست حاذق چهار score بافتی تعریف شد و نمونه‌های تمام گروه‌ها بر اساس مشاهدات ۵ فرد، score و شماره‌دهی شد. چهار متغیر اصلی در هر یک از ۳۲ نمونه بافت شناسی اندازه‌گیری شدند. متغیر اول (Score 1) میزان "غضروف تازه تشکیل شده" در هر ضایعه بود که به‌صورت درصد بیان شد. این متغیر توسط عکس برداری از مناطق مختلف ضایعه و سپس محاسبه میانگین درصد سطح غضروف تشکیل شده نسبت به کل سطح به‌دست آمد. متغیر دوم (Score 2) "میزان داربست باقی‌مانده" در هر ضایعه است. ماده کلاژن که به‌عنوان داربست به‌همراه سلول‌های بنیادی استفاده شد، به مرور تحلیل می‌رود تا غضروف جدید جایگزین آن شود. این متغیر نیز به‌وسیله عکس برداری از مناطق مختلف هر ضایعه و محاسبه میانگین درصد سطحی کلاژن به‌دست آمد. همچنین Score 3 "صاف و صیقلی بودن سطح بافت ترمیم شده" یکی از شاخص‌های اصلی در نظر گرفته شد و در نهایت Score 4 "پر شدن کامل دفت" مد نظر بود (جدول ۲).

جدول ۲. بررسی ماکروسکوپی ترمیم غضروف مفصلی به صورت ماکروسکوپی براساس امتیاز دهی در 4-Score

groups	Score 1	Score 2	Score 2	Score 4
BmMSCs	0	2	2	4
AdMSCs	0	3	2	2
Chondrocyte	0	1	2	5
Control	6	2	0	0

بررسی هیستوپاتولوژی نمونه‌ها: ابتدا آماده‌سازی نمونه‌های بافتی، کلسیم‌زدایی و تهیه‌ی لام بافتی انجام شد. به این ترتیب که نمونه‌های جدا شده به محلول تثبیت‌کننده‌ی فرمالین ۱۰ درصد انتقال یافت. به‌دلیل وجود کلسیم در نمونه‌ها، قبل از تهیه‌ی نمونه‌ی بافتی، نیاز به عمل کلسیم‌زدایی است. لذا بر اساس مطالعات و بررسی‌های به‌عمل آمده برای این منظور از محلول کلسیم‌زدای اسید نیتریک ۵ درصد استفاده شد.

برای انجام رنگ‌آمیزی ابتدا برش‌های بافتی به‌مدت ۱۰ دقیقه با زایلین شفاف‌سازی شدند و پارافین اضافه در اطراف بافت‌ها برداشته شد. سپس در شیب غلظت الکل ۱۰۰ تا ۷۰ درصد و آب به‌مدت ۳ دقیقه آب‌دهی شدند. پس از آن نمونه‌ها به‌مدت ۴ دقیقه در هماتوکسیلین قرار داده شدند تا هسته‌ی سلولی نمایان شده و سپس به‌مدت ۲ دقیقه در اتوزین شناور شد تا سیتوپلاسم سلول نمایان شد. رنگ‌آمیزی فست‌گرین-سافرانین O به‌طور اختصاصی برای رنگ‌آمیزی بافت‌های حاوی کلاژن همانند استخوان (رنگ سبز و بافت غضروف (رنگ قرمز) استفاده شد. برای این منظور پس از غوطه‌ورسازی در رنگ هماتوکسیلین، به‌مدت ۳ دقیقه شستشو با آب انجام شد. سپس نمونه‌ها به‌مدت ۹-۸ دقیقه در رنگ فست‌گرین غوطه‌ور شدند تا رشته‌های کلاژن به‌طور اختصاصی به رنگ سبز درآمدند. سپس شستشو با آب مقطر صورت گرفت و لام‌ها ۲۰-۱۰ ثانیه در سافرانین O قرار داده شدند تا بافت غضروف قرمز رنگ شد. در نهایت شستشو با آب مقطر به‌مدت ۳ دقیقه انجام شده و نمونه‌ها به ترتیب داخل الکل ۷۰ تا ۱۰۰ درصد آب‌گیری و برای شفاف‌تر شدن، ۱۰ دقیقه در زایلین قرار داده شد و سپس در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده و بررسی شدند.

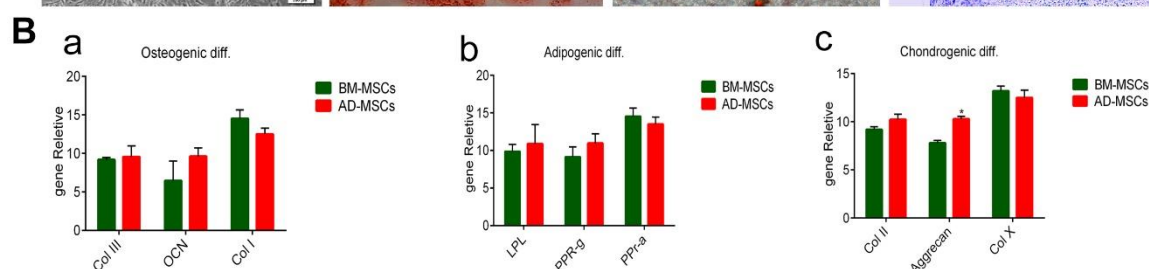
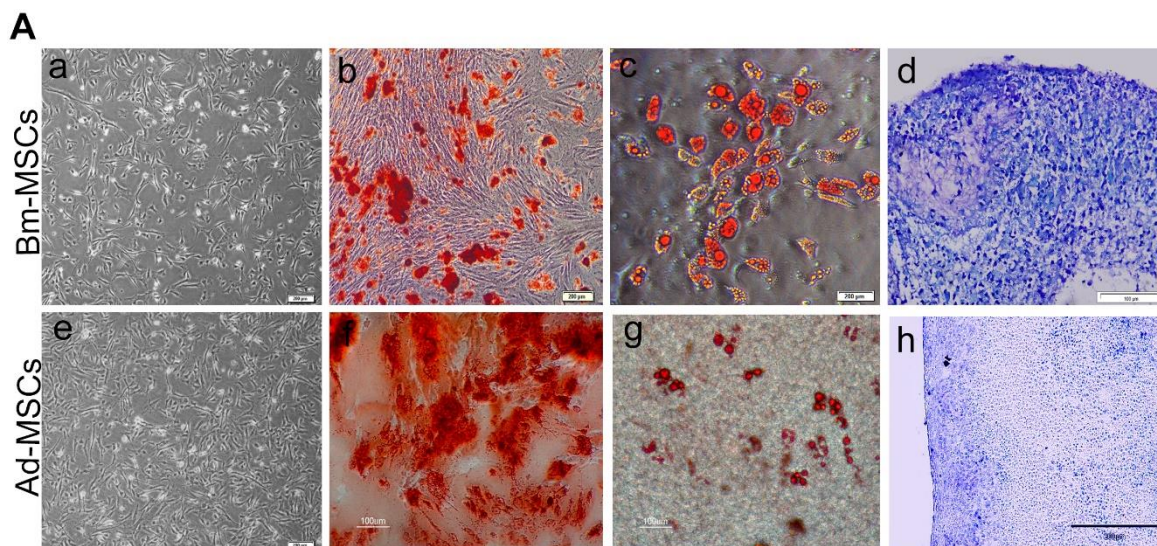
### ۳-آنالیز آماری

حجم نمونه با توجه به نتایج مطالعات گذشته و با سطح اطمینان ۹۵ درصد و مقدار خطای مجاز ۰/۰۵ برابر با ۱۲ محاسبه شد. بعد از جمع‌آوری اطلاعات، ابتدا داده‌ها وارد نرم افزار آماری prism شد و میانگین درصد تشکیل غضروف، میانگین داربست باقی‌مانده و میزان التهاب در هر ضایعه و برای هر گروه تعیین شد. سپس میزان تفاوت آماری میانگین ترمیم هر ضایعه با استفاده از آنالیز آماری One way ANOVA بررسی و همچنین برای مقایسه دو گروه با هم از scheffe post hoc multiple comparison استفاده شد.

### ۴-نتایج

#### سلول‌های بنیادی مزانشیمی Bm-MSCs و Ad-MSCs و بررسی خصوصیات آن

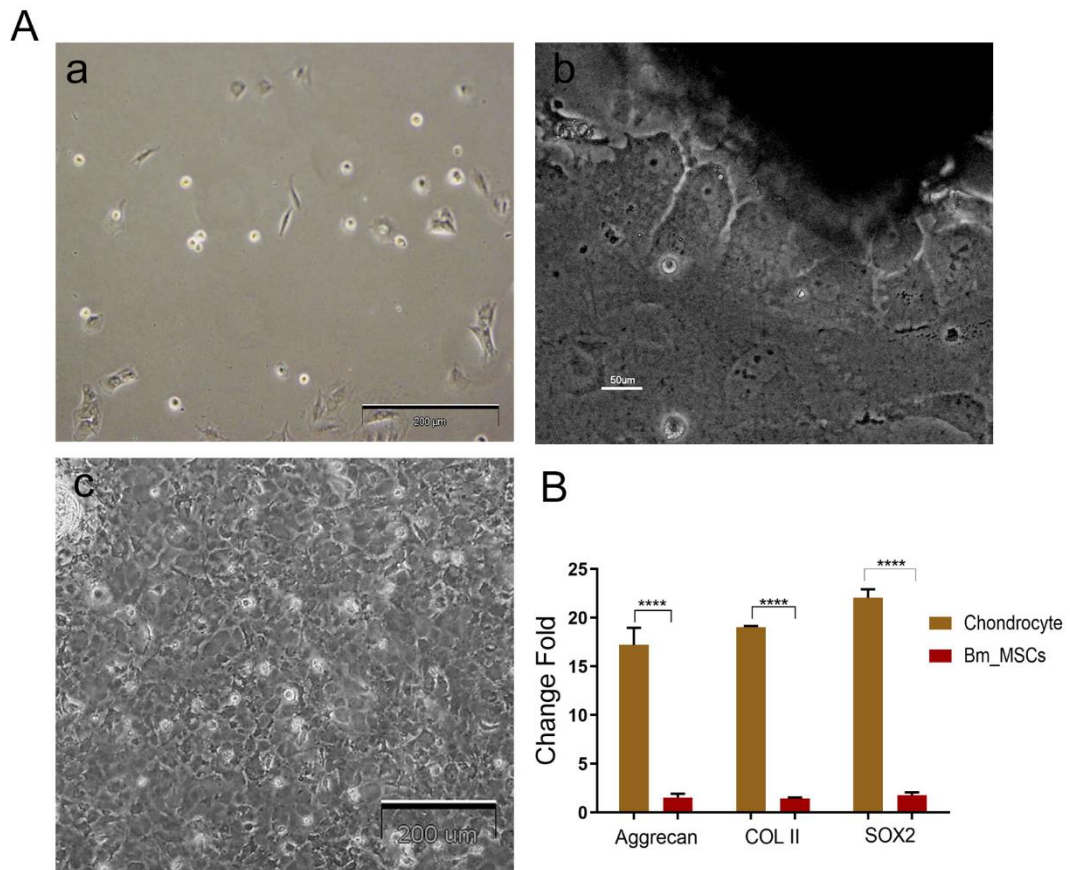
حدود ۵-۴ روز پس از آغاز کشت، سلول‌های Bm-MSC و Ad-MSC به کف ظرف چسبیدند. هر دو نوع سلول در کشت اولیه، مورفولوژی شبه فیبروبلاستی (دوکی) و موجی شکل داشتند (شکل ۲ - A). سپس با انجام پاساژ سلولی، سلول‌ها تکثیر شدند و جمعیت آن‌ها افزایش یافت. هر دو نوع سلول Bm-MSCs و Ad-MSCs پتانسیل تمایز به غضروف را نشان دادند. گلیکوزآمینوگلیکان‌های ماده زمینه غضروفی با استفاده از رنگ تلوئیدن بلو به رنگ بنفش نمایان شدند که نشان‌دهنده ترشح ترکیبات گلیکوپروئینی سولفات‌ها از جمله اگریکان بود. همچنین بر اساس بررسی‌های Real-time PCR ژن‌های اختصاص یافت غضروف یعنی COL II، ACAM، COL X در سلول‌های تمایز یافته بیان شده بود. در تمایز به استخوان ندول‌های معدنی و ترشح کلسیم در بین سلول‌ها از هفته اول مشاهده شد. این ندول‌ها پس از ۲۱ روز افزایش یافته و به دنبال رنگ آمیزی آلیزارین رد، قرمز رنگ شدند که حاکی از معدنی شدن ماتریکس بود. همچنین نتایج Real-time PCR حاکی از بیان معنی‌دار ژن‌های COL I و COL III و ژن OCN بود (شکل ۲ - B). هر دو نوع سلول همچنین پتانسیل تمایز به چربی را به خوبی نشان دادند و قطرات چربی ۴ روز بعد از القای آدیپوژنیک در سیتوپلاسم سلول‌ها شروع به تشکیل کردند. سپس طی ۲۱ روز اندازه این قطرات افزایش سایز دادند و در رنگ‌آمیزی اوایل رد به رنگ قرمز درآمدند. بررسی Real-time PCR نشان داد که در توده‌های سلولی تمایز یافته، ژن‌های اختصاصی بافت چربی از جمله LPL، PPR-g و PPr-a بطور معنی‌داری بیان شده است. i



شکل ۲: سلول‌های بنیادی مزانشیمی و مشخصه یابی آن‌ها، (A) تصویر سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان (a) و تمایز به استخوان چربی (b)، چربی (c) و غضروف (d) را نشان می‌دهد. تصویر سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از بافت چربی (e) و تمایز به استخوان (f)، چربی (g) و غضروف (h) را نشان می‌دهد. (B) بررسی Real-time PCR، بیان ژن‌های استخوانی (a)، چربی (b) و غضروفی (c) را نشان می‌دهد\* ( $p < 0.05$ ).

### کشت و تکثیر کندروسیت‌ها و بررسی خصوصیات آن

پس از کشت کندروسیت‌های جدا شده و تکه‌های باقی‌مانده بافت غضروف، کندروسیت‌های آزاد به کف ظرف کشت چسبیده و کندروسیت‌های موجود در تکه‌های بافت نیز از نواحی حاشیه‌ای بافت چسبیده به کف ظرف شروع به مهاجرت کرده و کف ظرف کشت پراکنده شدند. کندروسیت‌ها در کشت اولیه مورفولوژی پنج و شش ضلعی و در برخی موارد گرد داشتند و از نظر اندازه بسیار کوچک بودند. در طی پاساژهای بعدی مورفولوژی کندروسیت‌ها از فرم گرد به سلول‌های کشیده و دوکی شکل تغییر کرد و از نظر اندازه ۲-۳ برابر بزرگ‌تر از کندروسیت‌ها در کشت اولیه شدند.

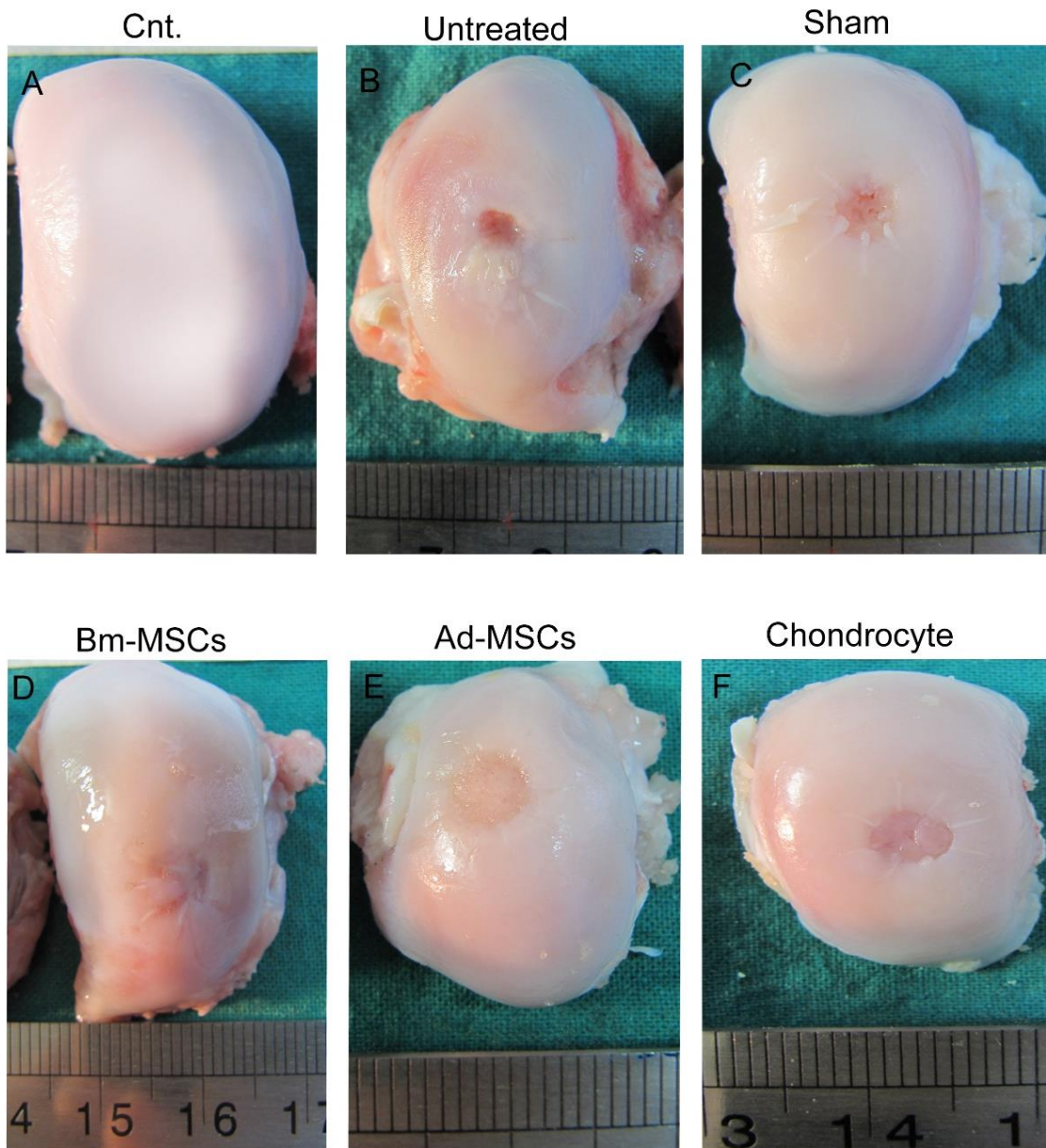


شکل ۳: تصویر کندروسیت‌های جدا شده از بافت غضروف دنده‌ای و بررسی بیان ژن‌های غضروفی. (A) تصویر کشت اولیه و اتصال کندروسیت‌ها به سطح ظرف کشت را نشان می‌دهد (a)، اتصال اکسپلنت غضروفی و مهاجرت کندروسیت‌ها از بافت در کف ظرف (b)، تکثیر و تراکم کندروسیت‌ها در کف ظرف پس از کشت دوم (C)، (B) نمودار بیان ژن‌های اختصاص بافت غضروفی را در مقایسه با سلول‌های Bm-MSCs نشان می‌دهد: \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .

### بررسی ترمیم بافت غضروف

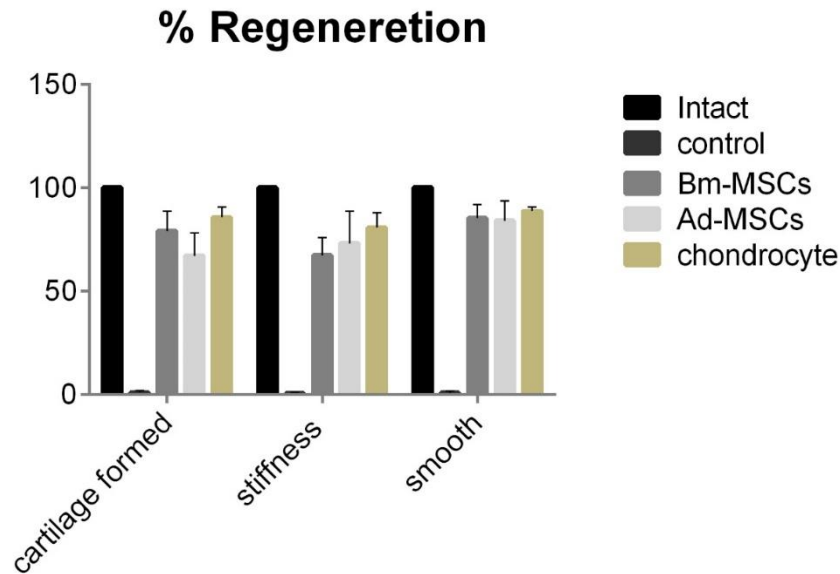
یک هفته بعد از عمل جراحی و پیوند سازه سلولی، محل زخم بهبودی کامل یافته و در هیچ مورد عفونت زخم مشاهده نشد. تنها در دو مورد به دلیل مشکل گوارشی ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک کوآموکسی کلاو نیاز به تزریق زیر جلدی سرم قندی نمکی ایجاد شد.

بررسی ماکروسکوپی ترمیم: بررسی ظاهری در گروه Untreated نشان داد که ترمیم خودبخودی و تشکیل بافت غضروف صورت نگرفته است. در حالی که در نمونه‌های دریافت کننده سلولی یعنی Bm-MSCs، Ad-MSCs و کندروسیت تشکیل غضروف جدید مشاهده شد. سطح برخی از نمونه‌ها به‌طور کامل صاف، پر و صیقلی شد. در حالی که در برخی از نمونه‌ها این ترمیم کم‌تر مشاهده شد. برای هر گروه آزمایشی تعداد سه پیوند انجام شده بود که بررسی‌های ظاهری برای هر گروه در شکل ۴ مشخص شده است. بررسی‌های ظاهری نشان داد که ایجاد غضروف جدید در تمام گروه‌های آزمایشی مشاهده شد. اگرچه این ترمیم نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود ولی اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های آزمایشی Bm-MSCs، Ad-MSCs و کندروسیت مشاهده نشد.



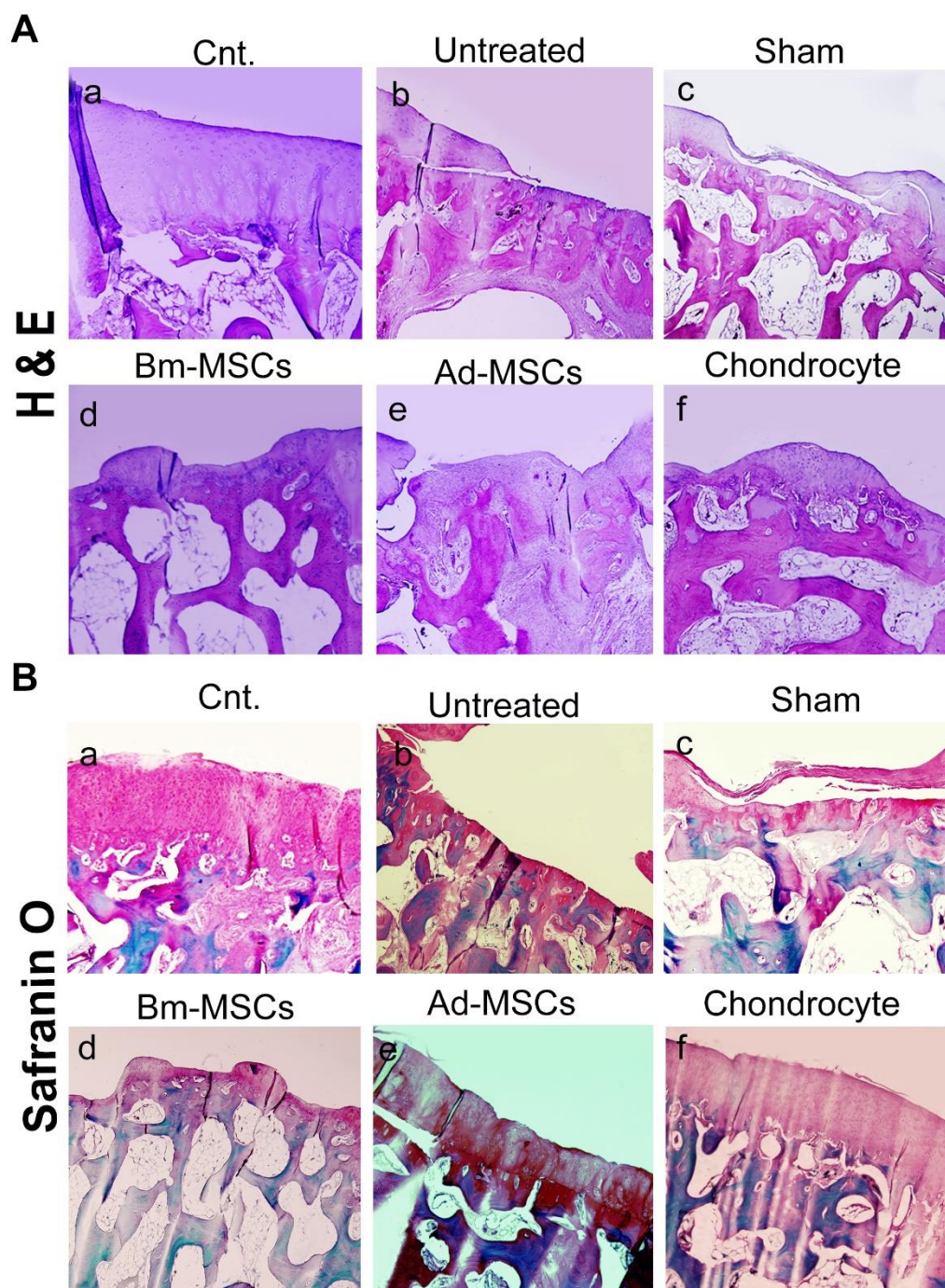
شکل ۴: بررسی میکروسکوپی ترمیم آسیب مفصلی. (A) گروه سالم، (B) در گروه Untreated آسیب مفصلی ترمیم مشاهده نشد، (C) در گروه Sham (دریافت کننده ژل) ترمیم مشاهده نشد، (D, E) در گروه‌های دریافت کننده Bm-MSCs و Ad-MSCs نیز پرشدگی و ایجاد غضروف شبه هیالین مشاهده شد، (F) در گروه کندروسیت آسیب مفصلی پر شده غضروف شفاف و صیقلی شبه هیالین مشاهده شد.

همچنین بررسی شاخص‌های مهم ترمیم از جمله تشکیل بافت غضروف جدید، سختی و صاف و صیقلی بودن سطح بافت (درجه‌بندی ترمیم بافت از نظر پاتولوژیست) در ۳۲ نمونه بافتی اندازه‌گیری شدند و نتایج نشان داد که بین گروه‌های مختلف دریافت کننده سلول تفاوت معنی‌داری وجود ندارد.



شکل ۵: بررسی شاخص‌های ترمیم از نظر پاتولوژی. نمودار نشان دهنده شاخص‌های ترمیم، از جمله تشکیل بافت غضروف جدید، سختی و صاف و صیقلی بودن سطح بافت ایجاد شده است.

**بررسی هیستوپاتولوژی نمونه‌ها:** رنگ‌آمیزی H&E برای بررسی‌های هیستوپاتولوژی، زنده‌مانی سلول‌های پیوند شده و ایجاد بافت‌های جدید در محل پیوند استفاده شد. نتایج حاصل از این رنگ‌آمیزی نشان داد که تمامی نمونه‌ها دارای سلول‌های زنده بوده و نشانی از آپوپتوزیس سلولی و نکروزیس بافتی مشاهده نشد. در گروه Untreated و sham گروه دریافت‌کننده ژل کلاژن بدون سلول تشکیل بافت غضروف مشاهده نشد و استخوان ساب‌کندرال باقی‌مانده قابل مشاهده بود. در گروه Bm-MSCs و Ad-MSCs و کندروسیت تشکیل توده‌ی غضروفی جدید مشاهده شد و نشانی از تحلیل استخوان ساب‌کندرال مشاهده نشد. تشکیل غضروف جدید غیرطبیعی (abnormal) در هیچ گروهی مشاهده شد. اگرچه تشکیل بافت غضروف جدید در تمام گروه‌های دریافت‌کننده سلول مشاهده شد؛ بررسی بیشتر در گروه Bm-MSCs و کندروسیت نشان داد که بافت جدید تشکیل شده شباهت بیشتری با ساختار غضروف هیالین دارد. همچنین بافت غضروف شبه فیبروز روی استخوان ساب‌کندرال در گروه sham تشکیل شده بود که احتمالاً به دلیل مهاجرت سلول‌های بنیادی مزانشیمی از استخوان ساب‌کندرال در درون ژل کلاژن، از جمله استخوان را سبز و غضروف را قرمز بود. رنگ‌آمیزی Safranin O/Fast green بافت‌های دارای رشته‌های کلاژن نوع متمایل به نارنجی نمایان کرد. از این رنگ‌آمیزی برای مشخص نمودن و تفکیک بهتر اجزای بافتی و همچنین نمایش بافت استخوان استفاده شد. در تمامی نمونه‌ها بافت استخوان سبز، بافت غضروف به رنگ قرمز نمایان شد. در گروه Bm-MSCs و Ad-MSCs غضروف تازه تشکیل شده بیش‌ترین شباهت را به غضروف هیالین داشت.



شکل ۶: بررسی هیستوپاتولوژی ترمیم غضروف مفصلی. (a) نمونه سالم که بافت غضروف هیالین سالم مشاهده شد، (b) بر اساس رنگ آمیزی H&E در گروه Untreated هیچ گونه ترمیم بافتی و پرشدگی مشاهده نشد، (c) در گروه Sham بافت شبه فیبری در محل پیوند ژل کلاژن بدون سلول مشاهده شد، (d,e) در گروه های دریافت کننده سلول بنیادی تا حدود زیادی بافت شبه غضروف هیالین ایجاد شد و سلول ها در ساختارهای شبه لاکونا مشاهده شد، (f) در گروه دریافت کننده کندروسیت بیشترین میزان تشکیل بافت شبه غضروفی مشاهده شد.

### ۵-بحث

در سال های اخیر استفاده از سلول های MSCs برای ترمیم انواع بیماری ها مورد استفاده شده و نتایج قابل قبولی در بسیاری موارد مشاهده شده است (۳۰). به طور مثال استفاده از این سلول ها در درمان آسیب های مفصلی بافت استخوان و غضروف از

جمله استئوآرتروز (OA) و روماتوئید آرتروز (RA) نتایج چشم‌گیری نشان داده است (۳، ۱۲-۱۴، ۱۶، ۱۹، ۲۰، ۳۰). با توجه به این‌که سلول‌های MSCs جدا شده از منابع مختلف سلولی اثربخشی متفاوتی در مطالعات مشابه نشان داده است، یکی از چالش‌های اصلی در سلول درمانی بیماری OA انتخاب منبع سلولی مناسب است (۲۰). این تفاوت‌ها نه تنها در منابع سلولی آلوژن بلکه در منابع سلولی اتولوگ هم مشاهده شده است. لذا بررسی منابع مختلف سلولی در شرایط کاملاً یکسان یکی از روش‌هایی است که می‌توان تا حدودی نتیجه‌گیری منطقی و قابل قبولی برای یافتن بهترین منبع سلولی ارائه دهد. علاوه بر سن، گونه منبعی که سلول MSCs از آن جداسازی می‌شود، کشت سلول‌های بنیادی در آزمایشگاه‌های مختلف با استفاده از ترکیبات، مواد و تجهیزات آزمایشگاهی متفاوت بر کیفیت و خصوصیات تکثیری و تمایزی آن سلول تاثیر به‌سزایی دارد (۳۱). برای این منظور در مطالعه حاضر تمام متغیرهای نامبرده که باعث تغییر در نتیجه تحقیقات می‌شود، حذف شده است و سلول‌ها در شرایط کاملاً یکسان جداسازی، کشت و آماده‌سازی نمونه و همچنین پیوند سازه سلولی انجام شد. همچنین در این مطالعه برای حذف عوامل تاثیرگذار حاصل از منابع آلوژن و حفظ تمام شرایط یکسان و خطر ریسک آلودگی در پیوند و پتانسیل بهتر در ترمیم، از منابع سلولی اتولوگ استفاده شد. لذا با توجه به مطالعات پرکاربردترین منابع سلولی برای سلول درمانی OA یعنی سلول‌های کندروسیت، سلول‌های Bm-MSCs و Ad-MSCs انتخاب، به‌صورت هم‌زمان از بافت مربوطه جداسازی و در شرایط کاملاً یکسان آزمایشگاهی تکثیر و در ضایعه تجربی غضروف ایجاد شده با سایز بحرانی در زانوی گوسفند پیوند زده شد. از آنجایی که تنها سلول موجود در بافت غضروف مفصلی کندروسیت است، مطالعات نشان داده که این سلول‌ها بهترین منبع سلولی برای درمان ضایعات و آسیب‌های مفصلی است. از طرف دیگر چالش‌های استفاده از کندروسیت‌ها در آزمایشگاه مثل کمبود بافت قابل استفاده، ایجاد آسیب ثانویه برای جداسازی بافت، تمایززدایی سلول‌ها در آزمایشگاه در زمان تکثیر، از معایب عمده و محدودکننده استفاده از این منبع است (۳۲-۳۴). در مطالعه حاضر ما این سلول‌ها را بافت غضروف هیالین انتهایی دنده گوسفند جداسازی کردیم. نتایج ما نشان داد کندروسیت‌های کشت شده در شرایط آزمایشگاهی نه تنها ظاهر چندوجهی و گرد اختصاصی کندروسیت‌ها را حفظ کردند بلکه ژن‌های اختصاصی بافت غضروف که با روش Real-time PCR بررسی شد را نیز به‌طور معنی‌داری بیان کردند (شکل ۳). از طرفی نتایج حاصل از مطالعه حاضر نیز نشان داد بهترین میزان ترمیم و ایجاد بافت شبه هیالین در گروه کندروسیت اتفاق افتاده است (شکل ۳-۶). لذا نتایج تاییدی بر مناسب بودن سلول‌های کندروسیت به‌عنوان اولین منبع سلولی برای درمان بیماری‌های غضروفی است. اما با توجه به مشکلات نامبرده در استفاده از کندروسیت‌ها، انتخاب یک منبع سلولی جایگزین با نتایج قابل قبول و بدون محدودیت استفاده از کندروسیت‌ها می‌تواند تا حدود زیادی برای بیماران رضایت‌بخش باشد. از طرفی چالش‌های استفاده از کندروسیت‌ها در مواردی که آسیب وارده به بافت غضروف وسیع باشد بسیار بغرنج‌تر خواهد بود.

سلول‌های MSCs حاصل از منابع سلولی در دسترس یا اتولوگ برای بیماران مثل بافت مغز استخوان و چربی می‌تواند کاندید مناسبی برای جایگزینی سلول‌های کندروسیت باشد. در مطالعه حاضر استفاده از سلول‌های Bm-MSCs و Ad-MSCs در شرایط کاملاً یکسان نشان داد که هر دوی این سلول‌ها توانایی تکثیر و پتانسیل تمایز به استخوان و غضروف بالایی را دارند (شکل ۱). در واقع خصوصیات این سلول‌ها در آزمایشگاه کاملاً یکسان بوده و برتری نسبت به هم نداشت، با توجه به اینکه این سلول‌ها از یک حیوان جداسازی شده بودند و متغیرهای موثر برای ایجاد خطا حذف شده بود، می‌توان نتیجه گرفت که هر دوی این سلول‌ها برای مطالعات مشابه مناسب هستند. در مطالعات قبلی هر دو منبع سلولی Bm-MSCs و Ad-MSCs برای ترمیم OA در مدل‌های حیوانی و همچنین کارآزمایی بالینی استفاده شده است اگرچه نتایج در تمام مطالعات نشان دهنده مناسب بودن سلول و اثر بخشی آن در ترمیم بوده است. (۳۶-۳۹). اما به‌دلیل اینکه مطالعات در شرایط مجزایی و در مدل‌های حیوانی

متفاوتی انجام شده است نمی‌توان نتیجه گیری قطعی برای انتخاب بهترین منبع سلولی را ارائه داد. ما در شرایط کاملاً یکسان و در یک مدل حیوانی هر سه گروه سلولی را پیوند زدیم پس تمام عوامل متغیر از مطالعه حذف شده است. همانطور که در شکل ۴ تصاویر میکروسکوپی نشان می‌دهد در تمامی گروه‌های سلول درمانی (D-F) پرشدگی محل آسیب نسبت به گروه های کنترل (A-C) به طور واضح مشخص است. لذا برای اطمینان از نتیجه به دست آمده با توجه به تعداد تکرارها برای هر گروه آزمایشی و امتیاز دهی میزان ترمیم توسط پاتولوژیست از لحاظ میزان غضروف جدید تشکیل شده، صافی سطح غضروف تشکیل شده و ضخامت بافت تشکیل شد، در شکل ۵ نتایج به صورت نمودار ترمیم ترمیم و مقایسه شد. نتایج این بررسی نشان داد محل آسیب با استفاده از سلول‌ها نسبت به گروه Untreated و Control (دریافت کننده ژل) کاملاً پر شده و سطح صاف و صیقلی ایجاد شده است، اما اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های کندروسیت، Bm-MSCs و Ad-MSCs مشاهده نشد. از طرفی مهم است که نتایج از نظر بافت شناسی و پاتولوژی نیز تایید شود و مشخص شود که پرشدگی از طریق تشکیل بافت غضروف هیالین اتفاق افتاده یا بافت غضروف فیبرو لذا برای بررسی دقیق تر ما برش‌های بافتی تهیه کرده و به چند روش اختصاصی رنگ آمیزی بافتی انجام دادیم (شکل ۶). نتایج این بررسی نشان داد که در تمامی گروه‌های دریافت کننده سلول بافت غضروف شبه هیالین تشکیل شده است و آسیب غضروفی کاملاً پر شده است. در نمونه های دریافت کننده کندروسیت ضخامت بافت تشکیل شده بیشتر بوده و بافت جدید ایجاد شده به طور مشخص ظاهر غضروف هیالین دارد که همان طور که در مطالعات قبلی هم اشاره شده بود کندروسیت بهترین منبع برای بازسازی غضروف مفصلی است (۴۰). اما برای معرفی یک جایگزین سلول بنیادی نتایج این مطالعه نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین گروه دریافت کننده سلول BM-MSCs و گروه AD-MSCs وجود ندارد.

#### ۶- نتیجه گیری

نتایج ما همانند سایر مطالعات گذشته تایید می‌کند که سلول‌های کندروسیت به عنوان بهترین منبع سلولی برای ترمیم ضایعات غضروف مفصلی است. ولی با توجه به محدودیت‌های ذکر شده در بالا در استفاده از کندروسیت‌ها مطالعات نیاز به منبع سلولی جایگزین با محدودیت‌های کمتر و اثربخشی بالا را نشان می‌دهد. لذا سلول‌های MSCs از جمله BM-MSCs و AD-MSCs منابع جایگزین مناسبی هستند اگر چه تا کنون بررسی جامعی صورت نگرفته تا مشخص شود از بین این دو منبع سلولی کدام مناسب‌تر است. مطالعه حاضر برای پاسخ به این سوال طراحی و انجام شد و نتایج بررسی‌های میکروسکوپی و هیستوپاتولوژی اختلاف معنی‌داری بین دو گروه BM-MSCs و AD-MSCs را از لحاظ میزان ترمیم نشان نداد لذا با توجه به اینکه دسترسی به بافت چربی و جداسازی Ad-MSCs نسبت به سلول‌های Bm-MSCs راحت‌تر و کم‌خطرتر بوده و همچنین عوارض کم‌تری دارد، می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌های Ad-MSCs نیز منبع سلولی مناسب و کارآمدی برای ترمیم آسیب‌های بافتی است. همچنین برای نتیجه‌گیری بهتر نیاز است که توانایی تکثیر و ترمیم آسیب غضروف مفصلی بین دو منبع سلولی Ad-MSCs اتولوگ و آلوزن نیز بررسی شود.

#### ۸- تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از مزرعه نگه‌داری و مراقبت از حیوانات بزرگ پژوهشگاه رویان (هلیجرد) برای همکاری در نگه‌داری از حیوانات، در اختیار قرار دادن اتاق عمل و وسایل مورد نیاز جراحی طرح حاضر و همچنین پژوهشگاه رویان برای حمایت‌های مالی در جهت انجام طرح حاضر دارند.

## ۸-منابع:

1. Chow YY, Chin KY. The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Mediators Inflamm.* 2020;8293921.
2. Emami A, Namdari H, Parvizpour F, Arabpour Z. Challenges in osteoarthritis treatment. *Tissue and cell.* 2022;101992.
3. Moretti L, Maccagnano G, Coviello M, Cassano GD, Franchini A, Laneve A, et al. Platelet rich plasma injections for knee osteoarthritis treatment: a prospective clinical study. *Journal of Clinical Medicine.* 2022;11(9):2640.
4. Armiento A, Stoddart M, Alini M, Eglin D. Biomaterials for articular cartilage tissue engineering: Learning from biology. *Acta biomaterialia.* 2018;65:1-20.
5. Ostrowska M, Maśliński W, Prochorec-Sobieszek M, Nieciecki M, Sudoł-Szopińska I. Cartilage and bone damage in rheumatoid arthritis. *Reumatologia/Rheumatology.* 2018;56(2):111-20.
6. Medvedeva EV, Grebenik EA, Gornostaeva SN, Telpuhov VI, Lychagin AV, Timashev PS, et al. Repair of damaged articular cartilage: current approaches and future directions. *International journal of molecular sciences.* 2018;19(8):2366.
7. Jung CK. Articular cartilage: Histology and physiology. *Techniques in cartilage repair surgery.* 2014:17-21.
8. Wenham CY, Conaghan PG. New horizons in osteoarthritis. *Age and ageing.* 2013; 42(3):272-8.
9. Cai X, Yuan S, Zeng Y, Wang C, Yu N, Ding C. New trends in pharmacological treatments for osteoarthritis. *Frontiers in Pharmacology.* 2021;12:645842.
10. Abramoff B, Caldera FE. Osteoarthritis: pathology, diagnosis, and treatment options. *Medical Clinics.* 2020;104(2):293-311.
11. Zhang M, Hu W, Cai C, Wu Y, Li J, Dong S. Advanced application of stimuli-responsive drug delivery system for inflammatory arthritis treatment. *Materials Today Bio.* 2022;14:100223.
12. Wiggers TG, Winters M, Van den Boom NA, Haisma HJ, Moen MH. Autologous stem cell therapy in knee osteoarthritis: a systematic review of randomised controlled trials. *British Journal of Sports Medicine.* 2021; 55(20):1161-9.
13. Dubey NK, Mishra VK, Dubey R, Syed-Abdul S, Wang JR, Wang PD, et al. Combating osteoarthritis through stem cell therapies by rejuvenating cartilage: a review. *Stem Cells International.* 2018; 2018.
14. Wang J, Zhou L, Zhang Y, Huang L, Shi Q. Mesenchymal stem cells-a promising strategy for treating knee osteoarthritis: a meta-analysis. *Bone & Joint Research.* 2020;9 (10): 719-28.
15. Taghiyar L, piriyaee A, Baghaban Eslaminejad Mr. Studying the cartilage structure derived from the differentiation of rat mesenchymal stem cells in comparison with costal hyaline cartilage. *Kosar Journal.* 2007; 2 (2):97-106
16. Harrell CR, Markovic BS, Fellbaum C, Arsenijevic A, Volarevic V. Mesenchymal stem cell-based therapy of osteoarthritis: current knowledge and future perspectives. *Biomedicine & pharmacotherapy.* 2019;109: (23)18-26.
17. Jovic D, Yu Y, Wang D, Wang K, Li H, Xu F, et al. A brief overview of global trends in MSC-based cell therapy. *Stem Cell Reviews and Reports.* 2022;18 (5):1525-45.
18. Loo SJQ, Wong NK. Advantages and challenges of stem cell therapy for osteoarthritis. *Biomedical reports.* 2021;15 (2):1-12.
19. Lam AT, Reuveny S, Oh SK-W. Human mesenchymal stem cell therapy for cartilage repair: review on isolation, expansion, and constructs. *Stem Cell Research.* 2020;44:101738.
20. Shariatzadeh M, Song J, Wilson SL. The efficacy of different sources of mesenchymal stem cells for the treatment of knee osteoarthritis. *Cell and tissue research.* 2019; 378: 399-410
21. Hulme CH, Perry J, McCarthy HS, Wright KT, Snow M, Mennan C, et al. Cell therapy for cartilage repair. *Emerging topics in life sciences.* 2021;5(4):575-89.
22. Brondeel C, Pauwelyn G, De Bakker E, Saunders J, Samoy Y, Spaas JH. Mesenchymal stem cell therapy in canine osteoarthritis research: "experientia docet" (experience will teach us). *Frontiers in Veterinary Science.* 2021; 8.
23. Zhu C, Wu W, Qu X. Mesenchymal stem cells in osteoarthritis therapy: A review. *American journal of translational research.* 2021;13(2):448.
24. Khan WS, Johnson DS, Hardingham TE. The potential of stem cells in the treatment of knee cartilage defects. *The Knee.* 2010;17 (6): 369-74.
25. Diekman BO, Guilak F. Stem cell-based therapies for osteoarthritis: challenges and opportunities. *Current opinion in rheumatology.* 2013; 25(1):119.

26. Baghaban Eslaminejad Mr, Nikmahzar Ab, Taghiyar L, Dehghan MM, Farrokhi A, Eftekhari Yazdi P. Studing of Differentiation of Mesenchymal stem cells-derived from canines bone marrow into Bone, Cartilage and Adipose. *Yakhteh*; 2007; 1:13-38.
27. Hosseinzadeh M, Hosseini S, Eslaminejad MB. The Impact of Different Ratios of Chondrocytes and Mesenchymal Stem Cells on Condrogenic Potential of Extracellular Vesicles Derived from Coculture of Chondrocytes and Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Cell & Tissue* 2023; 13 (4).
28. Baghaban Esmalinejad Mr, Taghiyar L, Falahi F. Investigating the expression level of cartilage genes in monolayer and three-dimensional cultures Rat articular chondrocytes with Real-time PCR. *Anatomical Sciences Journal* 200; 31: 107-116.
29. Baghaban Eslaminejad Mr, Taghiyar L, Kiani Sahar, Piriyaee Abass. Subcutaneous transplantation of mouse mesenchymal stem cells cultured in alginate and their differentiation into cartilage. *Journal of Blood* 2007; 2 (4): 105-114.
30. Song Y, Zhang J, Xu H, Lin Z, Chang H, Liu W, et al. Mesenchymal stem cells in knee osteoarthritis treatment: A systematic review and meta-analysis. *Journal of orthopaedic translation*. 2020; 24:121-30.
31. Jang S, Lee K, Ju JH. Recent updates of diagnosis, pathophysiology, and treatment on osteoarthritis of the knee. *International journal of molecular sciences*. 2021;22 (5):2619.
32. Iturriaga L, Hernández-Moya R, Erezuma I, Dolatshahi-Pirouz A, Orive G. Advances in stem cell therapy for cartilage regeneration in osteoarthritis. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2018;18 (8):883-96.
33. Akkiraju H, Nohe A. Role of chondrocytes in cartilage formation, progression of osteoarthritis and cartilage regeneration. *Journal of developmental biology*. 2015;3 (4):177-92.
34. Demoor M, Ollitrault D, Gomez-Leduc T, Bouyoucef M, Hervieu M, Fabre H, et al. Cartilage tissue engineering: molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2014;1840 (8):2414-40.
35. Ejaz R. Dar, Mudasir B. Gugjoo, Moien Javaid, Shahid Hussain, Mujeeb R. Fazili, Kuldeep Dhama, Taha Alqahtani, Ali M. Alqahtani, Riaz A. Shah, and Talha Bin Emran. Adipose Tissue- and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells from Sheep: Culture Characteristics. *Animals (Basel)*. 2021 Aug; 11(8): 2153.
36. Ji Eun Kim, Sang Mok Lee, Soo Hyun Kim, Phil Tatman, Albert O Gee, Deok-Ho Kim, Kyung Eun Lee, Youngmee Jung, Sang Jun Kim. Effect of self-assembled peptide-mesenchymal stem cell complex on the progression of osteoarthritis in a rat model. *Int J Nanomedicine*; 2014 May 7;9 Suppl 1(Suppl 1):141-57.
37. Yves-Marie Pers, Lars Rackwitz, Rosanna Ferreira, Oliver Pullig, Christophe Delfour, Frank Barry, Luc Sensebe, Louis Casteilla, Sandrine Fleury, Philippe Bourin, Danièle Noël, François Canovas, Catherine Cyteval, Gina Lisignoli, Joachim Schrauth, Daniel Haddad, Sophie Domergue, Ulrich Noeth, Christian Jorgensen. Adipose Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapy for Severe Osteoarthritis of the Knee: A Phase I Dose-Escalation Trial. *Stem Cells Transl Med*, 2016 Jul;5(7):847-56.
38. Damia E, Chicharro D, Lopez S, Cuervo B, Rubio M, Sopena JJ, Vilar JM, Carrillo JM. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: Are They a Good Therapeutic Strategy for Osteoarthritis? *Int J Mol Sci*. 2018 Jun 30;19(7):1926. doi: 10.3390/ijms19071926.
39. Fanglong Song, Jilei Tang, Rui Geng, Hansheng Hu, Chunhui Zhu, Weiding Cui, Weimin Fan. Comparison of the efficacy of bone marrow mononuclear cells and bone mesenchymal stem cells in the treatment of osteoarthritis in a sheep model. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014 Mar 15;7(4):1415-26.
40. Alessandra Colombini, F Libonati, S Lopa, G M Peretti, M Moretti, L de Girolamo. Autologous chondrocyte implantation provides good long-term clinical results in the treatment of knee osteoarthritis: a systematic review. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*; 2023 Jun;31(6):2338-2348.