



The Impact of Different Ratios of Chondrocytes and Mesenchymal Stem Cells on Chondrogenic Potential of Extracellular Vesicles Derived from Coculture of Chondrocytes and Mesenchymal Stem Cells

Hosseinzadeh M^{a,b}, Hosseini S^{a*}, Baghaban Eslaminejad M^{a*}

^aDepartment of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran

^b Faculty of Sciences and Advanced Technologies in Biology, University of Science and Culture, Tehran, Iran

Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation: Hosseinzadeh M, Hosseini S, Baghaban Eslaminejad M. The Impact of Different Ratios of Chondrocytes and Mesenchymal Stem Cells on Chondrogenic Potential of Extracellular Vesicles Derived from Coculture of Chondrocytes and Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Cell and Tissue*. 2022;13(4):268-284.

<https://10.52547/JCT.13.4.268>

KEYWORDS

Extracellular vesicles, Mesenchymal stem cells, Chondrocyte, Chondrogenesis

ABSTRACT

Aim: Cartilage tissue has limited capacity for spontaneous repair and self-renew due to the absence of vascularization and progenitor cells, thus requiring a therapeutic approach to repair tissue damage. Recently, extracellular vesicles (EVs) have attracted attentions because of their major roles in cell communication and tissue repair by regulating cellular processes such as cell growth, differentiation, and proliferation. Therefore, it is necessary to isolate extracellular vesicles with chondrogenic potential from an appropriate cellular source for cartilage regeneration. This study aims to compare the chondrogenic ability of extracellular vesicles derived from cocultured -chondrocytes / mesenchymal stem cells (CHO / MSC) at ratios of 1/2 and 1/4.

Material and Methods: Towards this goal, chondrocytes and mesenchymal stem cells were isolated from rabbit articular cartilage and bone marrow, respectively. Mesenchymal phenotype of isolated MSCs were characterized based on their surface markers and by differentiation into mesenchymal lineages. Chondrocytes and mesenchymal stem cells were co-cultured with defined ratios, their conditioned media were collected and extracellular vesicles were extracted with an ultracentrifuge. Concentrations of extracellular vesicles were determined using BCA Protein Assay Kit, then EVs were characterized in terms of size, morphology, and expression of surface markers by dynamic light scattering (DLS), scanning electron microscope (SEM) and western blotting, respectively. Mesenchymal stem cells were treated with different concentrations of extracellular vesicles (50, 100, and 150 ug/ml) for 21 days. Quantitative real time-PCR

* Corresponding author. Tel.: +98-2123562507; Fax: +98-2123562507

E-mail address: eslami@royaninstitute.org

DOI: <https://10.52547/JCT.13.4.268>

Received: May 23, 2022; Received in revised form: Dec 2, 2022; Accepted: Dec 13, 2022



(qRT-PCR) and histological analysis were subsequently performed to assess the quality of chondrogenic differentiation among experimental groups. The differentiation of MSCs to osteogenic and adipogenic lineages was demonstrated by Oil Red and Alizarin Red staining after 21 days.

Results: The results of flow cytometry showed that CD90 was expressed by 88.6% of the cell population as a positive marker and CD34 as a negative marker was only expressed in 5.48% of the cell population. SEM micrographs confirmed the spherical shape of CHO/MSC-EV 1/2 and CHO/MSC-EV 1/4 and the mean particle size of isolated EVs were 51.66 ± 8.15 and 19.11 ± 6.03 nm, respectively. Special surface markers for extracellular vesicles containing CD9 and CD81 were expressed in both groups. At concentrations of 100 and 150 $\mu\text{g/ml}$ of CHO/MSC-EV 1/2, higher cartilage - specific markers, including Col II were observed compared to CHO/MSC-EV 1/4. Similarly, safranin O and toluidine blue staining revealed the more deposition of aminoglycan and proteoglycan at concentrations of 100 and 150 $\mu\text{g/ml}$ of CHO/ MSC-EV 1/2, compared to CHO/ MSC-EV 1/4. This study demonstrated the chondrogenesis potential of extracellular vesicles, especially in CHO /MSC-EV 1/2 and extracellular vesicles derived from co-culturing chondrocytes/MSCs improve matrix production and chondrogenesis.

Conclusion: Our research shows that chondrocyte-MSCs proximity is essential for the response as improved viability, chondrogenesis, and matrix formation in recipient MSCs. It is also proposed that co-cultured derived EVs with the ability to promote chondrogenesis have the potential to be utilized in cartilage regeneration. Due to their immunogenicity and their low tumorigenic potential, extracellular vesicles can be used to help repair cartilage tissue.



تأثیر نسبت‌های مختلف کندروسیت و سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر پتانسیل تمایز به غضروف در وزیکول‌های خارج سلولی استخراج شده از هم‌کشتی کندروسیت و سلول‌های بنیادی مزانشیمی

مریم حسین‌زاده^{۱,۲}، سمانه حسینی^{۱*}، محمدرضا باغبان اسلامی‌نژاد^{۱*}

^۱ پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران
^۲ دانشکده فناوری‌های نوین و علوم زیستی، دانشگاه غیر انتفاعی علم و فرهنگ، تهران، ایران

چکیده	واژگان کلیدی
<p>هدف: عدم توانایی ترمیم خود به‌خودی بافت غضروف به‌دنبال ایجاد آسیب مفصلی، نیازمند یک رویکرد درمانی موثر است. اخیراً نقش وزیکول‌های خارج سلولی (EV) در ارتباطات سلولی و ترمیم بافت از طریق تنظیم فرایندهای سلولی مورد توجه قرار گرفته است. هدف این مطالعه، مقایسه توانایی غضروف‌زایی EV‌های مشتق از هم‌کشتی کندروسیت/سلول بنیادی مزانشیمی با نسبت‌های ۱ به ۲ و ۱ به ۴ در شرایط برون‌تنی است. مواد و روش‌ها: در این راستا، سلول‌ها جداسازی و مشخصه‌یابی شدند. محیط‌های رویی سلول‌های مورد نظر جمع‌آوری و EV با استفاده از دستگاه اولتراسانتریفیوژ استخراج شد. EV‌ها از لحاظ اندازه، مورفولوژی و بیان مارکرهای سطحی بررسی شدند. توانایی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کندروسیت در حضور غلظت‌های مختلف EV‌های (۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در ۲۱ روز بررسی شد و بیان مارکرهای غضروفی با استفاده از qRT-PCR و مطالعات بافتی ارزیابی شد. نتایج: CHO/MSC-EV 1/2 و CHO/MSC-EV 1/4 گروه‌های کرومی شکل و به ترتیب با اندازه $8/15 \pm 51/66$ و $6/03 \pm 19/11$ نانومتر بوده و مارکرهای سطحی ویژه‌ی EV‌ها شامل CD9 و CD81 در دو گروه بیان شد. افزایش بیان بالاتر مارکرهای ویژه‌ی غضروفی به‌ویژه Col II و همچنین ترشح آمینوگلیکان و پروتئوگلیکان در غلظت‌های 100 و 150 میکروگرم بر میلی‌لیتر CHO/MSC-EV 1/2 نسبت به CHO/MSC-EV 1/4 مشاهده شد. نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه پتانسیل تمایز به غضروف EV‌ها را به‌ویژه در وزیکول‌های مشتق از CHO/MSC-EV 1/2 نشان داد. استفاده از EV‌ها که توانایی غضروف‌زایی بالا دارند، به‌دلیل عدم ایمنی‌زایی و خطر تومورزایی می‌تواند در ترمیم بافت غضروف، موفقیت‌آمیز باشد.</p>	<p>وزیکول‌های خارج سلولی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، کندروسیت، غضروف‌زایی</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۲۲</p> <p>تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۹/۱۱</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۲۲</p>

۱- مقدمه

بیماری‌های غضروف مفصلی یکی از اختلالات شایع به‌ویژه در میان قشر میانسال و مسن جامعه است. غضروف مفصلی به‌علت عدم وجود رگ خونی و تراکم پایین سلولی ظرفیت محدودی برای ترمیم خودبه‌خودی دارد، در نتیجه آسیب‌های جزئی می‌توانند به آسیب‌های پیش‌رونده مانند استئوآرتریت (OA) منجر شوند (۱). روش‌های سنتی شامل دارو درمانی و جراحی برای درمان آسیب غضروف مفصلی به‌کار گرفته شده است اما هیچکدام در درمان کامل آسیب غضروفی موفق نبوده‌اند (۲، ۳). سلول‌درمانی یکی از روش‌های نوین در درمان آسیب‌های غضروفی است و سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) براساس دارا بودن توانایی تمایز به غضروف و استخوان به‌عنوان یک منبع سلولی مناسب مورد توجه قرار گرفته‌اند (۴-۶). علی‌رغم امکان تکثیر MSCها در شرایط برون‌تنی استفاده از این سلول‌ها همچنان با چالش‌هایی از جمله از دست رفتن ظرفیت تمایز به غضروف در شرایط کشت و تکثیر، خطر تومورزایی و ایمنی‌زایی همراه است (۷). در سال‌های اخیر استفاده از وزیکول‌های خارج سلولی که یکی از انواع ترشحات سلولی است به‌عنوان یک رویکرد درمانی عاری از سلول و بدون عوارض ناشی از سلول درمانی از جمله تومورزایی و ایمنی‌زایی مورد توجه قرار گرفته است. وزیکول‌های خارج سلولی، وزیکول‌هایی با غشای دو لایه‌ی لیپیدی هستند و از انواع سلول‌ها و همچنین از مایعات مختلف بدن مانند سرم، بزاق، مایع مغزی-نخاعی و مایع سینوویال استخراج می‌شوند (۸-۱۲). وزیکول‌های خارج سلولی با تنظیم فرایندهای سلولی از جمله رشد، تمایز و فراخوانی سلول‌ها، در فرایند ترمیم بافت‌های مختلف، نقش مهمی ایفا می‌نماید و نقش درمانی آن‌ها برای ترمیم بافت‌های مختلف شامل قلب، کلیه، کبد، ریه و پوست نیز مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۳-۱۸). Wang و همکاران با استفاده از EVهای مشتق از CPCها (Chondrogenic Progenitor Cells) در مدل موشی دچار استئوآرتریت (OA) نشان دادند که این EVها قادر به جلوگیری از پیشرفت و شدت OA در داخل بدن و همچنین افزایش تحریک در روند تکثیر کندروسیت‌ها در شرایط آزمایشگاهی هستند. همچنین نتایج qRT-PCR نشان داد که ژن‌های دخیل در فرایند ترمیم غضروف در موش‌های دریافت‌کننده EVهای مشتق از CPCها افزایش بیان و ژن‌های دخیل در التهاب کاهش بیان داشتند (۱۹). نتایج حاصل از مطالعه‌ای که توسط Zhang و همکاران در بررسی نقش وزیکول‌های خارج سلولی جدا شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از جنین انسانی در ترمیم آسیب استئوکندرال انجام شد، نشان داد که وزیکول‌های خارج سلولی منجر به بهبود آسیب استئوکندرال از طریق تشکیل بافت شبه استخوان ساب‌کندرال و بافت شبه غضروف هیالین شد (۲۰). همچنین گروه Tao در سال ۲۰۱۷ اثر وزیکول‌های خارج سلولی مشتق از سلول‌های MSC مایع سینوویال با افزایش بیان miRNA-140 را در آسیب استئوکندرال بررسی کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از این وزیکول‌های خارج سلولی سبب افزایش تکثیر کندروسیت‌ها در شرایط برون‌تنی و جلوگیری از پیشرفت استئوآرتریت در شرایط درون‌تنی گردید (۲۱). در مطالعه‌ای دیگر که سال ۲۰۱۸ توسط گروه Vonk و همکاران (۲۲) جهت بررسی اثر EV مشتق از MSC مغز استخوان انسان بر مدل شبه استئوآرتریت در کندروسیت در شرایط برون‌تنی انجام شد، مشاهده شد که استفاده از EVهای مشتق از MSC از طریق مهار فاکتورهای التهابی موثر بر هموستاز، ترمیم غضروف را بهبود می‌بخشند. همچنین این EVها سبب افزایش ترشح پروتئوگلیکان، Col II، Sox9 و نیز کاهش مارکر هایپرتروفی ColIX در بافت تازه تشکیل شده شد. در مطالعه‌ای که توسط حسین‌زاده و همکاران صورت گرفت، EV مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بیان بالاتری از مارکرهای غضروفی، ترشح پروتئوگلیکان و گلوکزآمینوگلیکان نسبت به EV مشتق از کندروسیت در شرایط برون‌تنی نشان داد، اما بیان مارکر هایپرتروفی در این EVها بالاتر بود (۱). اگرچه این مطالعات اثر EVها را در بهبود آسیب‌های غضروفی نشان می‌دهد اما همچنان دستیابی به یک منبع سلولی با توانایی غضروف‌زایی بالاتر و موثرتر مورد نیاز است. مطالعات نشان داده‌اند که هم‌کشتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی و کندروسیت، سبب تحریک تمایز

MSCها به غضروف می‌شود و نیز سایتوکین ترشح شده توسط MSCها سبب افزایش تکثیر سلول‌های غضروفی و ترشح ماده‌زمینه خارج سلولی غضروف می‌شود و این امر بواسطه وزیکول‌های خارج سلولی صورت می‌گیرد (۲۳، ۲۴). مطالعات مختلف نسبت‌های متنوعی از کندروسیت و MSC را مورد ارزیابی قرار دادند. به‌طور مثال، Shi و همکاران (۲۵)، نسبت ۱ به ۱ از کندروسیت و MSC جدا شده از خرگوش را کشت دادند و مشاهده کردند این هم‌کشتی تکثیر کندروسیت و تمایز MSC را افزایش داد. نتایج مطالعه‌ی گروه Bian و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان داد که هم‌کشتی کندروسیت و سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی با نسبت ۱ به ۴ در هیدروژل هیالورونیک‌اسید سبب کاهش بیان ژن هیپرتروفی و افزایش ویژگی‌های عملکردی و همچنین ترکیبات غضروف مهندسی شده شامل گلیکوز‌آمینوگلیکان‌ها و نیز ماتریکس غضروفی می‌شود. در حالی-که نتایج حاصل از کشت جداگانه کندروسیت‌ها و سلول‌های بنیادی مزانشیمی از نظر خواص بیومکانیکی و بیوشیمیایی ضعیف‌تر از گروه هم‌کشتی بود (۲۶). در مطالعه‌ای که توسط Xu و همکاران (۲۷) انجام شد، نسبت‌های مختلفی از هم‌کشتی سلول‌های کندروسیت و MSC خرگوشی را مورد بررسی قرار دادند و مشاهده نمودند با افزایش نسبت سلول‌های MSC، اثر هم‌کشتی افزایش یافته است. با توجه به این که منشا سلولی در محتوای EV نقش دارد (۲۸)، به‌نظر می‌رسد EV حاصل از هم‌کشتی کندروسیت و MSC با نسبت مختلف نیز اثر متفاوتی داشته باشد. لذا، از آنجا که تاکنون مطالعه‌ای مبنی بر بررسی و مقایسه پتانسیل غضروف‌زایی وزیکول‌های خارج سلولی حاصل از هم‌کشتی غضروف و استخوان انجام نشده است و همچنین تعیین غلظت مؤثر وزیکول‌های خارج سلولی همچنان یکی از چالش‌های این حوزه به‌شمار می‌رود، هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی اثر توانایی غضروف‌زایی وزیکول‌های خارج سلولی جدا شده از کشت هم‌زمان کندروسیت و سلول‌های بنیادی مزانشیمی با نسبت‌های ۱ به ۲ و ۱ به ۴ جهت کاربرد در ترمیم آسیب‌های غضروفی است.

۲- مواد و روش‌ها

جداسازی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی: مغز استخوان از خرگوش سفید نر نیوزلندی به روش آسپیراسیون جدا و سانتریفیوژ شد (۲۹). به‌طور خلاصه، سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده، در فلاسک 75 cm² دارای محیط کشت پایه حاوی محیط کشت DMEM (Dubleco's modified eagles medium; Invitrogen, US) و سرم جنینی گاوی ۱۰ درصد (Fetal Bovine Serum; Gibco, US)، ۱ درصد پنیسیلین/استرپتومایسین (Invitrogen; US) کشت داده و به‌عنوان پاساژ صفر در نظر گرفته شدند. سپس فلاسک‌ها در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و اتمسفر حاوی ۵ درصد CO₂ انکوبه شدند. تعویض محیط هر سه روز یک‌بار انجام شد و پس از رسیدن به تراکم ۸۰ درصد، سلول‌ها ۱ به ۳ پاساژ داده شدند (پاساژ یک). سلول‌ها در هر پاساژ خالص‌تر شده و در نهایت سلول‌های پاساژ سوم جهت آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی ماهیت مزانشیمی سلول‌های بنیادی جدا شده از مغز استخوان: ماهیت مزانشیمی سلول‌های جدا شده از مغز استخوان از طریق تمایز به رده‌های مزانشیمی و همچنین بررسی بیان مارکرهای سطحی این سلول‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌منظور بررسی توانایی تمایز به رده‌های مزانشیمی (استخوانی و چربی)، در هر چاهک ظرف کشت ۶ خانه، تعداد ۱۰۰ هزار سلول قرار داده شد. پس از چسبیدن سلول‌ها به کف ظرف کشت و پر شدن ۷۰ تا ۸۰ درصد ظرف کشت، محیط کشت پایه با محیط‌های تمایز استخوان و چربی جایگزین و تعویض محیط هر سه روز یک‌بار انجام گردید. چاهک دارای محیط کشت پایه به‌عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد. پس از گذشت ۲۱ روز، محیط رویی سلول‌ها خارج شده و سلول‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی آلیزارین‌رد و اوایل‌رد به‌ترتیب برای تمایز به استخوان و چربی مورد بررسی قرار گرفتند (۲۹).

بیان مارکرهای سطحی سلول‌های جدا شده شامل CD34 و CD90، با استفاده از روش فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت (۱). بدین منظور، ۱۰۰ هزار سلول پاساژ ۳ به لوله‌های مخصوص فلوسایتومتری منتقل و حجم نهایی با بافر فسفات به ۱۰۰

میکرولیتر رسانده شد. آنتی‌بادی CD34 و CD90 با غلظت مشخص به هر لوله به صورت جداگانه اضافه شد. لوله‌ها در تاریکی و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. خوانش فلوسایتومتری با استفاده از دستگاه FACScan flow-cytometer (BD FACS Caliber, BD Biosciences, San Jose CA, USA) صورت گرفت و آنالیز داده‌ها توسط نرم افزار Flowing Software نسخه ۲/۵ انجام شد.

جداسازی و کشت سلول‌های کندروسیت: نمونه‌های بافت غضروف از زانوی خرگوش تحت عمل جراحی با رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی تهیه شد. نمونه به آزمایشگاه منتقل و سپس تحت شرایط استریل و به کمک تیغ جراحی، لایه‌ی غضروف از کندیل زانو به‌طور کامل جدا شد و پس از خرد شدن، تکه‌های ۲ تا ۳ میلی‌متری بافت غضروف در محلول کلانزاد نوع یک با غلظت ۰/۸ درصد به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. سپس کندروسیت‌های جدا شده از بافت به کمک سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰ به مدت ۵ دقیقه جمع‌آوری و به ظرف کشت انتقال داده شدند. تعویض محیط سلول‌ها هر ۳ روز یک‌بار و انتقال به فلاسک‌های جدید هر هفته یک بار انجام شد (۲۹).

هم‌کشتی کندروسیت و سلول بنیادی مزانشیمی و جمع‌آوری محیط کشت رویی: برای به‌دست‌آوردن EV حاصل از هم‌کشتی، کندروسیت و MSC به‌طور هم‌زمان با نسبت‌های ۱ به ۲ و ۱ به ۴ در محیط کشت پایه شامل محیط کشت DMEM، سرم جنین گاوی ۱۵ درصد فاقد EV و پنسیلین/استرپتومایسین ۱ درصد کشت داده شدند و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و محیط رویی سلول‌ها جهت استخراج وزیکول‌های خارج سلولی جمع‌آوری شد.

جداسازی وزیکول‌های خارج سلولی: برای جداسازی وزیکول‌های خارج سلولی از محیط‌های کشت جمع‌آوری شده از هم‌کشتی کندروسیت/ MSCها از روش اولتراسانتریفیوژ استفاده شد. ابتدا محیط‌های سلولی با دور (g) ۱۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه جهت حذف سلول‌های مرده سانتریفیوژ شدند (مرحله اول). پس از خارج کردن رسوب حاصل از مرحله‌ی اول، محلول روئی در دور (g) ۲۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد (مرحله دوم). جهت جداسازی EV، محلول روئی حاصل از مرحله دوم دو بار در (g) ۱۰۰۰۰۰ به مدت ۲ ساعت سانتریفیوژ شد. در این مرحله، محیط رویی خارج شده و رسوب حاصل حاوی وزیکول‌های خارج سلولی در بافر فسفات منفی استریل سوسپانس شده و تا آزمایشات بعدی در ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد (۳۰). از این به بعد، EV جدا شده از هم‌کشتی سلول‌ها با نسبت ۱ به ۲ به نام CHO/MSC-EV 1/2 و گروه هم‌کشتی با نسبت ۱ به ۴ به نام CHO/MSC-EV 1/4 در متن ذکر شده است.

تعیین غلظت وزیکول‌های خارج سلولی

سنجش غلظت وزیکول‌های خارج سلولی با استفاده از کیت سنجش پروتئین BCA (BCA protein assay kit)

طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. ابتدا نمونه با بافر فسفات (EMD Millipore Company, Darmstadt, Germany) به نمونه‌ها افزوده شد. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، پلیت حاوی BCA منفی رقیق و محلول نمونه توسط دستگاه میکروپلیت ریدر در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد.

پراکندگی نور دینامیکی (DLS): جهت تعیین اندازه وزیکول‌های خارج سلولی جدا شده از روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS) (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK) استفاده شد. ابتدا وزیکول‌های استخراج شده در بافر

فسفات سوسپانسی شده و حجم نهایی یک میلی‌لیتر در دستگاه در مقابل آشکارساز نوری قرار گرفته و بر اساس میزان شدت پراکندگی نور عبوری از نمونه، اندازه ذرات تعیین شد.

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM): بررسی مورفولوژی وزیکول‌های استخراج شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی صورت گرفت. برای آماده کردن نمونه، ابتدا غلظت مشخصی از وزیکول‌های خارج سلولی استخراج شده با بافر فسفات منفی رقیق شده و روی لام قرار داده شد. پس از خشک شدن، نمونه‌ها توسط ذرات طلا پوشش‌دار شدند و توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (Philips XL30 SEM, The Netherlands) عکس‌برداری انجام شد.

وسترن بلات: مارک‌های سطحی وزیکول‌های خارج سلولی شامل CD9 و CD81 با استفاده از روش وسترن بلات بررسی شد. ابتدا الکتروفورز SDS-PAGE نمونه‌ها با غلظت ۱۵ میکروگرم پروتئین به مدت ۷۵ دقیقه با ولتاژ ۱۲۰ ولت انجام شد. انتقال پروتئین از ژل پلی‌آکرلامید به غشا به مدت ۲ ساعت و ۳۰ دقیقه در ولتاژ ۲۵ ولت به وسیله‌ی روش نیمه خشک (Semi-Dry) انجام شد. سپس غشا ۳ مرتبه با بافر TBST (تریس - HCL، کلرید سدیم، توئین ۲۰) به مدت ۳۰ دقیقه شسته شد و به مدت ۱ ساعت در بافر مسدود کننده ۵ درصد BSA قرار گرفت. سپس در مجاورت آنتی‌بادی‌های اولیه شامل CD9 (Catalog No: GTX76182, Genetex, US) و CD81 (Catalog No: EX203, Cellgs, UK) محلول در بافر مسدود کننده ۲ درصد BSA به مدت یک شبانه‌روز قرار داده شد. پس از شستشوی غشا با بافر TBST، غشا در آنتی‌بادی ثانویه محلول در بافر مسدود کننده ۲ درصد BSA برای ۱ ساعت قرار داده شد و در نهایت سوبسترا به غشا افزوده شد و از سیستم تصویر ژل (ژل-داک) (Uvitec, Cambridge, UK) برای خوانش غشا استفاده شد.

بررسی اثر وزیکول‌های خارج سلولی بر غضروف‌زایی: به منظور بررسی پتانسیل غضروف‌زایی وزیکول‌های خارج سلولی از روش توده‌ی سلولی (Micro mass) استفاده شد. ۲۵۰ هزار سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان خرگوش (به دست آمده در مرحله اول) در فالكون رسوب داده شده و وزیکول‌های خارج سلولی با غلظت ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به محیط تمایزی اضافه شد. گروه شاهد دارای محیط تمایز به غضروف بدون EV در نظر گرفته شد. پس از ۲۱ روز تمایز با انجام مطالعات بافتی و بررسی بیان ژن‌های غضروفی بررسی شد.

qRT-PCR بررسی بیان ژن‌های دخیل در غضروف‌زایی شامل Agn، Col II، Sox9 و مارکر هایپرتروفی ColX، با روش qRT-PCR صورت گرفت. استخراج RNA و سنتز هم‌زمان cDNA از توده‌ی سلولی با استفاده از کیت Single Cell To cDNA (شرکت هستی‌نوآوران ژن رویان، ایران) انجام شد. برهم کنش‌های qRT-PCR با استفاده از Maxima SYBR Green/ROX (شرکت یکتاتجهیز، ایران) در دستگاه Applied Biosystems Step One plus Real-time PCR انجام شد. به تعداد نمونه‌های مورد بررسی، استریپ مخصوص روی رک یخ چیده شد و برای هر واکنش دو بار تکرار و برای هر پرایمر دو کنترل منفی نیز در نظر گرفته شد. نمونه‌ها برای چهل سیکل به ترتیب در دماها و مدت ذکر شده در جدول ۲ قرار داده شدند. پس از اتمام واکنش نهایی، پیک مخصوص ژن واکنش‌های تکثیری با آنالیز محور ذوب تایید شد. با استفاده از داده‌های نهایی دستگاه که به شکل CT بود میزان نسبی بیان هر یک از ژن‌ها و miRNA مورد نظر در گروه‌های آزمایش نسبت به گروه شاهد (سلول‌های تمایز یافته‌ی کشت داده شده در محیط تمایز غضروفی و فاقد EV) محاسبه شد. در نهایت داده‌ها با نرم افزار REST (Relative Expression Software Tool) مورد ارزیابی قرار گرفتند. تغییرات سطح mRNA هر نمونه با سطح Gapdh (House keeping mRNA) نرمال‌سازی شد. میزان تغییر بیان هر ژن در گروه‌های آزمایش نسبت به گروه شاهد (میزان بیان

هر ژن در گروه شاهد یک در نظر گرفته شد) به صورت Fold change نمایش داده شد. جدول ۱ پرایمرها مورد استفاده را نشان می‌دهد.

جدول ۱: لیست پرایمرهای طراحی شده برای بررسی بیان ژن‌های غضروفی

Genes	Primer sequences
Col X	F: GAACCCAGAATCCATCTGAG R: GGCATAGGGAATGAAGAACTG
Sox 9	F: AGTAGGCAATAGTGTAGAGGAC R: CGGTGTTTAAGGCTCAAGG
Col II	F: CAAGTCCCTCAACAACCAG R: TATCCAGTAGTCACCGCTC
Agn	F: TGCCACTGTGAGAGTTCC R: ACATTCCACACCCAGAGTT

مطالعات بافتی: سلول‌های تمایز یافته در محیط تمایزی ابتدا با پارافرمالدهید ۴ درصد تثبیت شدند. در مرحله‌ی بعد، از سلول‌های تثبیت شده نمونه پارافینی گرفته شد و در نهایت با دستگاه میکروتوم برش‌هایی با قطر ۶ میکرون تهیه شد. برش‌ها به روی لام معمولی منتقل شدند و برای رنگ‌آمیزی لام‌ها نیز از رنگ‌های سافرانین O و تولوئیدین بلو استفاده شد. در مرحله آخر، لامل بر روی لام خشک قرار داده شد و با میکروسکوپ نوری مشاهده شد.

۳- آنالیز آماری

نتایج به‌دست آمده در گروه‌های مورد مطالعه بین دو گروه با استفاده از آزمون تی مستقل و بین گروه‌های مختلف با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه، با نرم افزار GraphPad Prism (نسخه ۷) آنالیز شد. نمایش داده‌ها به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده و معنی‌دار بودن نتایج در سطح ($p < 0.05$) در نظر گرفته شده است.

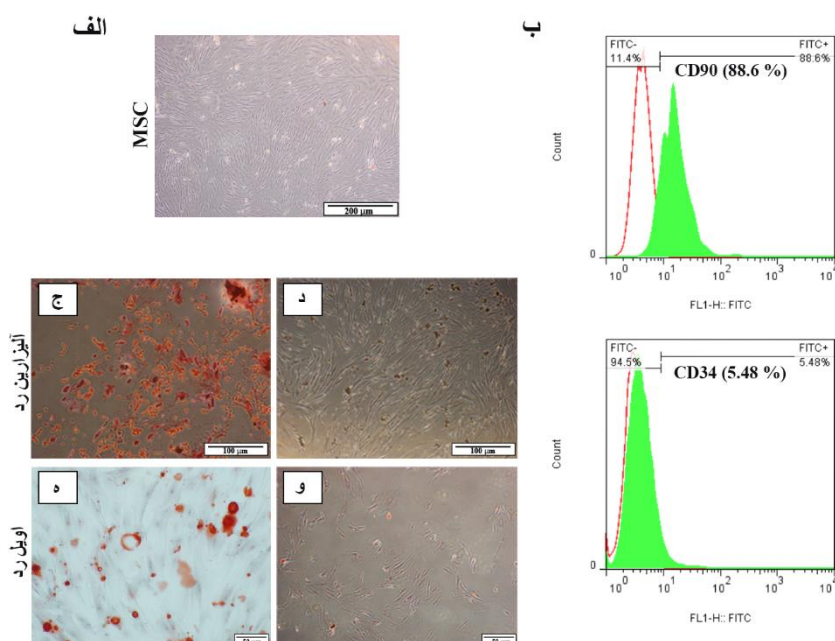
۴- نتایج

جداسازی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی و بررسی ویژگی‌های آن‌ها

سلول‌ها در کشت اولیه به‌صورت ناخالص بودند. سلول‌های چسبیده به کف و سلول‌های خونی به‌صورت شناور در محیط کشت قابل مشاهده بودند. سلول‌های چسبیده دوکی شکل با ایجاد کلنی و یا بدون ایجاد کلنی رشد کرده و بتدریج این کلنی‌ها به یکدیگر رسیده و کف ظرف کشت را پر کردند (شکل ۱ الف).

نتایج آنالیز فلوسایتومتری برای سلول‌های جدا شده از مغز استخوان نشان داد که این سلول‌ها برای مارکر هماتوپویتیکی CD34 منفی هستند و این مارکر را در سطح خود بیان نمی‌کنند. نتایج بررسی مارکر مزانشیمی CD90، نشان دهنده‌ی بیان این مارکر در سطح سلول‌های جدا شده بود. نتایج به‌دست آمده توسط روش فلوسایتومتری نشان می‌دهند که سلول‌های جدا شده ویژگی‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی را دارند (شکل ۱ ب).

به‌منظور اثبات مزانشیمی بودن سلول‌های جدا شده، توانایی تمایزی این سلول‌ها به دودمان‌های مزانشیمی شامل استخوان و چربی نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. سلول‌ها در محیط تمایز به استخوان طی مدت ۲۱ روز، شروع به ترشح مواد معدنی کردند که با رنگ‌آمیزی آلیزارین‌رد نمایان شد. ندول‌های استخوانی تشکیل شده در زیر میکروسکوپ نوری به رنگ قرمز دیده شدند که تایید کننده‌ی تمایز به استخوان بود (شکل ۱ ج، د). همچنین تمایز به رده‌ی چربی توسط رنگ‌آمیزی اوایل‌رد بررسی شد و قطرات چربی جمع شده درون سیتوپلاسم سلول‌های تمایز یافته به کمک رنگ‌آمیزی اوایل‌رد به رنگ قرمز درآمدند (شکل ۱ ه، و).

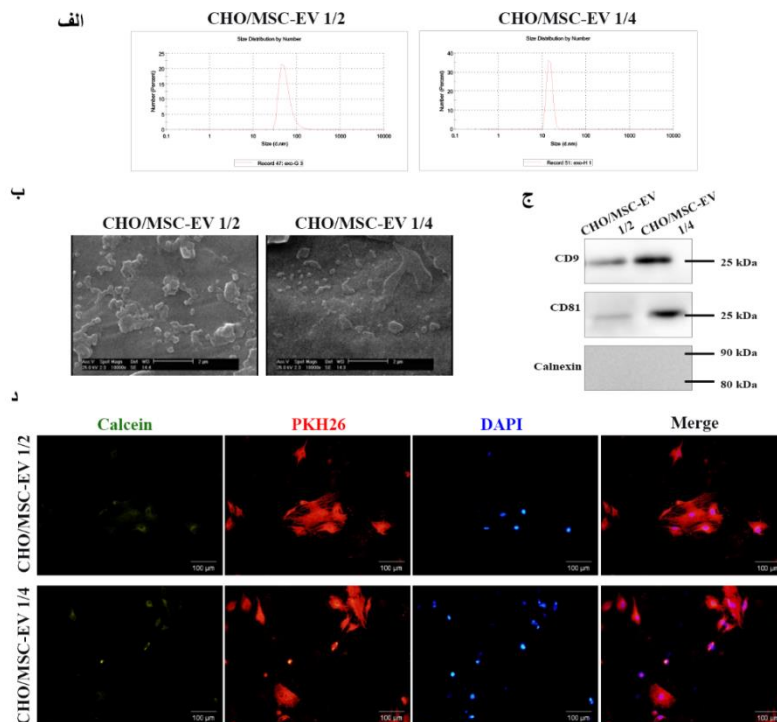


شکل ۱: سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان خرگوش. سلول‌های جدا شده از مغز استخوان (الف) بررسی بیان مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از روش فلوسایتومتری (ب). سلول‌های تمایز یافته به استخوان (ج) و گروه شاهد (د) بعد از گذشت ۲۱ روز. سلول‌های تمایز یافته به چربی (ه) و گروه شاهد (و) بعد از گذشت ۲۱ روز.

بررسی ویژگی‌های وزیکول‌های خارج سلولی جدا شده

وزیکول‌های خارج سلولی استخراج شده از هر دو منبع سلولی، از نظر اندازه، مورفولوژی و پروتئین‌های سطحی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از بررسی اندازه وزیکول‌های خارج سلولی استخراج شده در دو گروه مختلف توسط دستگاه DLS در شکل ۲ الف نشان داده شده است. طبق آنالیز انجام شده، میانگین قطر $CHO/MSC-EV\ 1/2$ $51/66 \pm 8/15$ نانومتر و میانگین قطر $CHO/MSC-EV\ 1/4$ $19/11 \pm 6/03$ نانومتر است. طبق اندازه‌های به دست آمده مشاهده شد که $CHO/MSC-EV\ 1/2$ اندازه‌ی بزرگتری در مقایسه با $CHO/MSC-EV\ 1/4$ دارند.

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی، مورفولوژی کروی وزیکول‌های خارج سلولی استخراج شده از هر دو گروه سلولی را تایید نمود (شکل ۲ ب). نتایج حاصل از وسترن بلات حضور پروتئین‌های سطحی ویژه وزیکول‌های خارج سلولی شامل CD9 و CD81 و عدم حضور مارکر Calnexin را در هر دو نمونه تایید کرد. با توجه به نتایج به دست آمده، $CHO/MSC-EV\ 1/4$ بیان بالاتری از پروتئین سطحی CD81 را نسبت به $CHO/MSC-EV\ 1/2$ نشان داد (شکل ۲ ج).



شکل ۲: بررسی ویژگی‌های وزیکول‌های خارج سلولی استخراج شده. قطر وزیکول‌های خارج سلولی استخراج شده توسط DLS (الف). تصاویر میکروسکوپ SEM از وزیکول‌های خارج سلولی مشتق از CHO/MSC-EV 1/2 و CHO/MSC-EV 1/4 (ب). وزیکول‌های خارج سلولی دارای مورفولوژی کروی شکل با ابعاد نانومتری می‌باشند. بیان پروتئین‌های سطحی اختصاصی CD9 و CD81 وزیکول‌های خارج سلولی با روش وسترن بلات. بیان پروتئین‌های سطحی CD9 و CD81 در باند ۲۵ کیلو دالتون (kDa) و عدم بیان مارکر Calnexin تایید شد (ج). بررسی میزان جذب EV توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی. سلول‌های بنیادی مزانشیمی با PKH26 به رنگ قرمز و EVها با کلسئین به رنگ سبز نشان‌دار شدند. هسته‌ی سلول‌ها نیز با DAPI به رنگ آبی نشان‌دار شد (د).

نتایج حاصل از بررسی میزان جذب وزیکول‌های خارج سلولی در (شکل ۲ د) نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که جذب EVها توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی بعد از ۲۴ ساعت صورت گرفته است.

اثر وزیکول‌های خارج سلولی جدا شده بر تمایز به غضروف سلول‌های بنیادی مزانشیمی

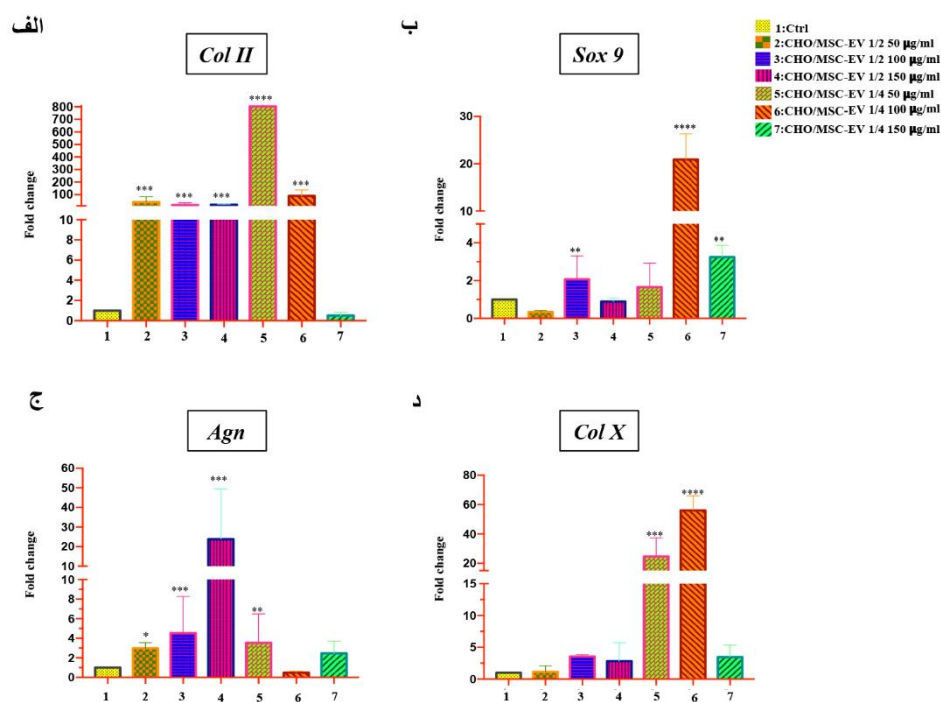
میزان بیان ژن Col II در توده‌ی سلولی حاصل از تمایز MSCهای کشت داده شده در حضور وزیکول‌های خارج سلولی CHO/MSC-EV 1/2 و CHO/MSC-EV 1/4 از نظر آماری افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد نشان داد. گروه دریافت‌کننده‌ی CHO/MSC-EV 1/4 با غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری را در میزان بیان ژن Col II نسبت به گروه شاهد و نیز در مقایسه با غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان داد. همه‌ی غلظت‌ها در گروه دریافت‌کننده‌ی CHO/MSC-EV 1/2 نیز افزایش بیان معنی‌داری نسبت به گروه شاهد، نشان دادند (شکل ۳ الف).

میزان بیان ژن Sox 9 نیز در گروه CHO/MSC-EV 1/4 با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیان بالاتری را نسبت به گروه شاهد و نیز نسبت به سایر غلظت‌ها داشته است و پس از آن غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گروه CHO/MSC-EV 1/4

غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گروه CHO/MSC-EV 1/2 اختلاف معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد نشان دادند. در سایر گروه‌ها، از نظر آماری افزایش معنی‌داری در بیان ژن Sox 9 مشاهده نشد (شکل ۳ ب).

ژن Agn نیز در گروه حاوی CHO/MSC-EV 1/2 بویژه غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر افزایش معنی‌داری نشان داد. در غلظت ۱۰۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز میزان بیان بالاتر این ژن نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. در گروه‌های حاوی CHO/MSC-EV 1/4، در غلظت ۵۰ و ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر افزایش بیان مشاهده گردید اما در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیان این ژن به‌طور معنی‌داری کاهش نشان داد (شکل ۳ ج).

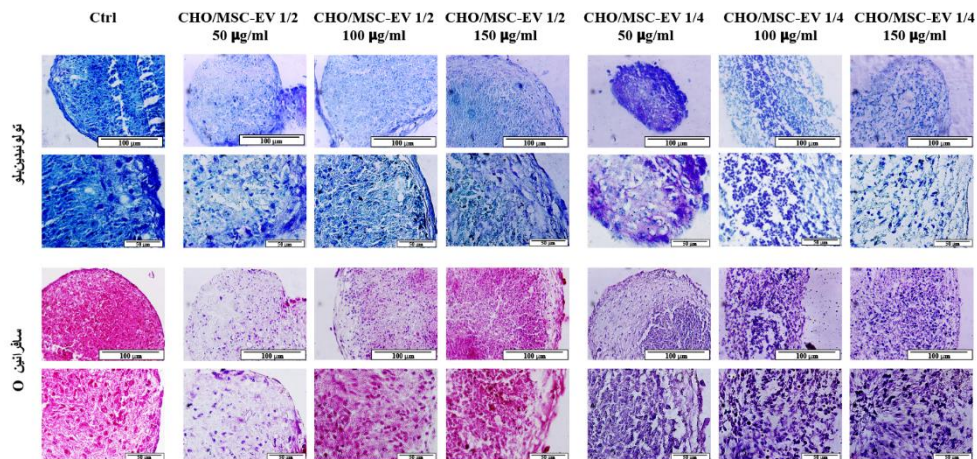
ژن Col X به‌عنوان یک مارکر هایپرتروفی در تمایز به غضروف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از qRT-PCR در گروه‌های مورد مطالعه، بیان بسیار کم این ژن را در گروه CHO/MSC-EV 1/2 در مقایسه با گروه شاهد نشان داد. اما، افزایش بیان ژن Col X در گروه‌های دریافت‌کننده CHO/MSC-EV 1/4 مشاهده شد که این افزایش بیان در غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از لحاظ آماری معنی‌دار بود. میزان بیان ژن Col X در گروه‌های CHO/MSC-EV 1/2 نسبت به CHO/MSC-EV 1/4، در تمام گروه‌ها و در مقایسه با گروه کنترل از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. همچنین بیان ژن Col X در غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گروه CHO/MSC-EV 1/4 نسبت به غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بسیار کاهش نشان داد (شکل ۳ د).



شکل ۳: مقایسه کمی بیان ژن‌های ویژه غضروفی؛ شامل *Col II* (الف)، *Sox 9* (ب)، *Agn* (ج)، *Col X* (د) در توده‌ی سلولی حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی در حضور وزیکول‌های خارج سلولی و با غلظت‌های متفاوت پس از گذشت ۲۱ روز. $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; and $****p < 0.0001$.

شکل ۴: نتایج مطالعات بافتی شامل رنگ‌آمیزی تولوئیدی بلو و سافرانین O بر روی توده‌های سلولی تمایز یافته در حضور غلظت‌های مختلف CHO/MSC-EV 1/2 و CHO/MSC-EV 1/4 را نشان می‌دهد. در رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو ماده زمینه

اطراف سلول‌ها در داخل لاکونا آبی متمایل بنفش شد که حاکی از خاصیت متاکرومازی آن‌ها بود. در رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو، گروه CHO/MSC-EV 1/2، در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و گروه CHO/MSC-EV 1/4 در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تمایزی مشابه گروه کنترل نشان دادند (شکل ۴). بنفش شدن جایگاه‌های غنی از گلیکوزآمینوگلیکان در رنگ‌آمیزی سافرانین O نیز نشان‌دهنده‌ی میزان بالای پروتئوگلیکان می‌باشد. در هر دو گروه CHO/MSC-EV 1/2 و CHO/MSC-EV 1/4 در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر میزان بالاتری از گلیکوزآمینوگلیکان و مشابهت با گروه کنترل مشاهده شد (شکل ۴).



شکل ۴: تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به غضروف در حضور وزیکول‌های خارج سلولی مشتق از منابع سلولی مختلف CHO/MSC-EV 1/2 و CHO/MSC-EV 1/4 در مدت زمان ۲۱ روز با رنگ‌آمیزی تولوئیدین‌بلو و سافرانین O

۵- بحث

عدم توانایی بافت غضروف در ترمیم، ضرورت استفاده از راه‌کار درمانی را جهت جلوگیری از پیشرفت آسیب‌های وارده نشان می‌دهد (۶، ۳۱). اخیراً استفاده از وزیکول‌های خارج سلولی به‌عنوان راه‌کاری نوین برای غلبه بر مشکلات ناشی از سلول درمانی مطرح شده است. لذا در این مطالعه، پتانسیل تمایزی وزیکول‌های خارج سلولی حاصل از هم‌کشتی کندروسیت/ سلول بنیادی مزانشیمی با نسبت‌های ۱/۲ و ۱/۴ به‌عنوان منبع سلولی در کتام غضروفی مورد بررسی قرار گرفت و با توجه به بیان بالای مارکر هایپرتروفی، پتانسیل بالای تمایز به غضروف وزیکول‌های خارج سلولی مشتق از CHO/MSC-EV 1/2 نسبت به CHO/MSC-EV 1/4 تایید شد.

نتایج حاصل از بررسی ویژگی‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان خرگوش، ماهیت مزانشیمی بودن این سلول‌ها را تایید نمود. ظاهر فیروبلاستی و دوکی شکل، توانایی تمایز به رده‌های مزانشیمی شامل استخوان (با تشکیل ندول‌های استخوانی که نشان‌دهنده‌ی ترشح ماده‌ی زمینه معدنی در سیتوپلاسم سلول‌ها است) و چربی (که با تشکیل قطرات چربی همراه است) و همچنین بیان مارکر مزانشیمی مثبت CD90 و همچنین عدم بیان مارکر CD34، از ویژگی‌های سلول‌های جدا شده است که با مطالعات پیشین همخوانی دارد (۱، ۳۲).

به‌منظور شناسایی و اثبات حضور وزیکول‌های خارج سلولی در نمونه‌های به‌دست آمده ابتدا قطر وزیکول‌ها با استفاده از روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS) اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری (DLS) اندازه‌گیری شد. اندازه‌ی CHO/MSC-EV 1/2 در محدوده‌ی ۵۱ نانومتر قرار دارد که با EV جدا شده در مطالعات دیگر همخوانی دارد (۳۳). همچنین، مقایسه اندازه قطر وزیکول‌های خارج سلولی نشان می‌دهد که CHO/MSC-EV 1/4 اندازه کوچکتری نسبت به CHO/MSC-EV 1/2 دارد. در مطالعه‌ای که اخیراً وزیکول‌های خارج سلولی را از منبع کندروسیت و سلول بنیادی مزانشیمی مغز استخوان استخراج نموده است، اندازه‌ی قطر ذرات EV بین ۳۰ تا ۲۰۰ نانومتر گزارش شده است و اندازه‌ی ذرات مطالعه حاضر نیز در این محدوده قرار می‌گیرد (۳۴). لازم به ذکر است که قطر وزیکول‌های خارج سلولی استخراج شده با نتایج به‌دست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی همخوانی دارد. همچنین هر دو گروه مارک‌های سطحی پروتئینی وزیکول‌های خارج سلولی شامل CD9 و CD81 را بیان کردند که این نتایج با تعاریف استاندارد از وزیکول‌های خارج سلولی و نیز انجمن بین‌المللی وزیکول‌های خارج سلولی (ISEV) مطابقت دارد (۳۰).

در راستای ارزیابی توانایی تمایز به غضروف وزیکول‌های خارج سلولی جدا شده، بیان ژن‌های ویژه‌ی غضروفی شامل Col II، Sox9 و Agn در MSC‌های کشت داده شده در حضور CHO/MSC-EV 1/2 و CHO/MSC-EV 1/4 بررسی شد. ژن Col II یکی از مهمترین ژن‌های ماده زمینه خارج سلولی بافت غضروف می‌باشد که افزایش بیان آن تمایز به رده‌ی کندروسیتی را نشان می‌دهد (۳۵). در مطالعه‌ی حاضر، افزایش بیان این ژن در گروه‌های دریافت‌کننده EV را نشان می‌دهد که تایید کننده تأثیر مثبت EV بر غضروف‌زایی است. ژن Sox9 کدکننده‌ی یک فاکتور رونویسی مهم در تمایز به غضروف است که القاکننده‌ی بیان سایر ژن‌های دخیل در مسیر تمایز به غضروف می‌باشد (۳۶، ۳۷). مطالعات پیشین افزایش بیان ژن‌های ویژه‌ی غضروفی را در گروه‌های حاوی وزیکول‌های خارج سلولی حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی نشان می‌دهد (۱) و افزایش این ژن در گروه‌های دریافت‌کننده CHO/MSC-EV 1/4 نیز نشان‌دهنده تأثیر EV بر این فرایند است. Agn نیز یکی دیگر از ژن‌های دخیل در غضروف‌زایی است که بیان آن برای تمایز ضروری است (۳۸). افزایش بیان در گروه‌های دریافت‌کننده CHO/MSC-EV 1/2 نسبت به گروه CHO/MSC-EV 1/4 نشان دهنده توانایی بیشتر این گروه در غضروف‌زایی باشد. در مطالعه‌ای که اخیراً توسط اسماعیلی و همکاران (۳۹) انجام شده است، گروه‌هایی که EV مشتق از هم‌کشتی MSC و کندروسیت بصورت اگریگیت را دریافت کرده بودند، افزایش بیان در ژن‌های غضروفی شامل Agn، Col II، Sox9 داشتند که تایید کننده نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر است.

در مقابل، بیان مارکر هایپرتروفی Col X در دو گروه CHO/MSC-EV 1/2 و CHO/MSC-EV 1/4 بررسی شد. ژن Col X در کندروسیت‌های هایپرتروفیک بیان می‌شود و یک مارکر مهم برای استخوان‌سازی درون غضروفی است و در حدود ۴۵ درصد از کلاژن تولید شده توسط کندروسیت‌های هایپرتروف را شامل می‌شود (۴۰-۴۲). لذا، هایپرتروفی یکی از چالش‌ها در زمینه‌ی استفاده از کندروسیت‌های حاصل از تمایز BMSC‌ها در شرایط آزمایشگاهی است که سبب ایجاد فنوتیپ کندروسیتی ناپایدار و نامناسب جهت کاربردهای درمانی می‌شود. ژن Col X در گروه‌های مورد مطالعه در این پژوهش در غلظت ۱۰۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در گروه‌های حاوی CHO/MSC-EV 1/4 بیان بسیار بالایی داشته است. مطالعات نشان داده‌اند که EV‌های مشتق از MSC‌ها پتانسیل تشکیل غضروف هایپرتروف را دارند و بنابراین منطقی به‌نظر می‌رسد که میزان ژن Col X در گروه‌های CHO/MSC-EV 1/4 نسبت به CHO/MSC-EV 1/2 بالاتر باشد (۲۰، ۴۳).

به‌منظور بررسی بیشتر، مطالعات بافت‌شناسی شامل رنگ‌آمیزی‌های ویژه‌ی غضروفی ساfranین O و تولوئیدین بلو انجام شد. تصاویر حاصل از برش‌های بافتی نشان داد که در توده‌ی سلولی، سلول‌ها آرایشی شبیه به سلول‌های بافت غضروف طبیعی را نشان می‌دهند. به این ترتیب که سلول‌ها در حاشیه‌ی توده سلولی، تشکیل لایه‌ی شبه پری‌کندرویم داده و سلول‌های مرکزی‌تر را احاطه می‌کند. ماتریکس غضروف حاوی گلیکوزآمینوگلیکان است. این امر به‌دلیل حضور کربوهیدرات‌ها و نیز زیاد بودن گروه‌های سولفات با بار منفی است که به‌همراه گلیکوزآمینوگلیکان در رنگ‌آمیزی تولوئیدین‌بلو، خاصیت متاکرومازی را نشان می‌دهد. در نتیجه‌ی این رنگ‌آمیزی، ماتریکس اطراف سلول‌ها در داخل لاکونا به رنگ بنفش (بازوفیل) درآمد. همچنین سلول‌هایی که در حفرات شبه لاکونا قرار گرفته‌اند و دارای مورفولوژی گرد هستند نیز در نواحی حاشیه‌ای به‌حالت نسبتاً کشیده دیده شدند. تمایز غضروفی در گروه‌های حاوی EV به خوبی قابل مشاهده است که تایید کننده نتایج qRT-PCR نیز می‌باشد. در مجموع، تمایز به غضروف در گروه‌های دریافت کننده‌ی EV در مقایسه با گروه شاهد نتایج بهتری را نشان داد.

در مجموع نتایج به‌دست آمده از آنالیزهای qRT-PCR و رنگ‌آمیزی اختصاصی بافت غضروف، از آنجا که میزان مارکر هایپرتروفی در گروه CHO/MSC-EV 1/4 نسبت به گروه CHO/MSC-EV 1/2 بالا است، علیرغم قابل مقایسه بودن بیان مارکرهای غضروفی و پروتئوگلیکان بین دو گروه، می‌توان ادعا کرد که استفاده از EV‌های جدا شده از هم‌کشتی سلول‌های کندروسیت و سلول‌های بنیادی مزانشیمی با نسبت ۱ به ۲ (CHO/MSC-EV 1/2) جهت انجام مطالعات در زمینه‌ی تمایز به غضروف گزینه‌ی مناسب‌تری است.

همچنین بر طبق داده‌های حاصل از qRT-PCR، علی‌رغم این‌که ژن‌های Col II و Sox9 در اکثریت گروه‌ها در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای بیان بالاتری بودند، به دلیل بالا بودن میزان بیان ژن هایپرتروفی Col X نیز در این غلظت، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر را به‌عنوان غلظت بهینه می‌توان در نظر گرفت.

۶- نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده از آزمایشات ما نشان داد که هم‌کشتی کندروسیت و سلول‌های بنیادی مزانشیمی سبب بهبود پتانسیل تمایز به غضروف در وزیکول‌های خارج سلولی مشتق از این منابع سلولی می‌گردد و با توجه به تفاوت‌های مشاهده شده در غلظت‌های مختلف، غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از گروه CHO/MSC-EV 1/2 دارای عملکرد تمایزی بهتری هستند. همچنین مشاهده شد که در شرایط برون‌تنی، EV‌ها از طریق بیان ژن‌های غضروفی Col II و Sox9 و نیز کاهش بیان ژن‌های هایپرتروفی از جمله Col X و همچنین بیان پروتئین‌های غضروفی، قادر به پیشبرد تمایز به غضروف خواهند بود. در نتیجه استفاده از EV‌ها در آزمایشات مربوط به ترمیم غضروف به‌عنوان یک روش امیدوارکننده قابل پیش‌بینی است. برای مطالعات آتی در این زمینه پیشنهاد می‌شود که جهت فهم دقیق نحوه عملکرد EV‌ها، مکانیسم عمل آن‌ها و نیز محتویات این وزیکول‌ها مورد بررسی قرار گیرد.

۷- تشکر و قدردانی

این مطالعه توسط صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری حمایت مالی شده است. لذا بدین‌وسیله نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی خود را از این صندوق اعلام می‌دارند.

۸- منابع

1. Hosseinzadeh M, Kamali A, Hosseini S, Baghaban Eslaminejad M. Higher Chondrogenic Potential of Extracellular Vesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells Compared to Chondrocytes-EVs In Vitro. *BioMed Research International*. 2021;2021:9011548.
2. Krishnan Y, Grodzinsky AJ. Cartilage diseases. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2018;71-72:51-69.
3. Musumeci G, Loreto C, Carnazza ML, Martinez G. Characterization of apoptosis in articular cartilage derived from the knee joints of patients with osteoarthritis. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2011;19(2):307-13.
4. Wei X, Yang X, Han ZP, Qu FF. et al. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta pharmacologica Sinica*. 2013;34(6):747-54.
5. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *Journal of cellular physiology*. 2007;213(2):341-7.
6. Nasiri N, Hosseini S, Reihani-Sabet F, Eslaminejad M. Targeted mesenchymal stem cell therapy equipped with a cell-tissue nanomatchmaker attenuates osteoarthritis progression. *Scientific Reports*. 2022;12.
7. Heldring N, Mäger I, Wood MJ, Le Blanc K. et al. Therapeutic potential of multipotent mesenchymal stromal cells and their extracellular vesicles. *Human gene therapy*. 2015;26(8):506-17.
8. Kim JY, Song S-H, Kim KL, Ko J-J. et al. Human Cord Blood-Derived Endothelial Progenitor Cells and Their Conditioned Media Exhibit Therapeutic Equivalence for Diabetic Wound Healing. *Cell Transplantation*. 2010;19(12):1635-44.
9. Street JM, Barran PE, Mackay CL, Weidt S. et al. Identification and proteomic profiling of exosomes in human cerebrospinal fluid. *Journal of Translational Medicine*. 2012;10(1):5.
10. Lässer C, Seyed Alikhani V, Ekström K, Eldh M. et al. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *Journal of Translational Medicine*. 2011;9(1):9.
11. Dear JW, Street JM, Bailey MA. Urinary exosomes: A reservoir for biomarker discovery and potential mediators of intrarenal signalling. *PROTEOMICS*. 2013;13(10-11):1572-80.
12. Madison MN, Roller RJ, Okeoma CM. Human semen contains exosomes with potent anti-HIV-1 activity. *Retrovirology*. 2014;11(1):102.
13. Malda J, Boere J, van de Lest CHA, van Weeren PR. et al. Extracellular vesicles — new tool for joint repair and regeneration. *Nature Reviews Rheumatology*. 2016;12(4):243-49.
14. Timmers L, Lim SK, Arslan F, Armstrong JS. et al. Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. *Stem cell research*. 2007; 21(2):129-37.
15. Gatti S, Bruno S, Deregibus MC, Sordi A. et al. Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2011;26(5):1474-83.
16. Tan CY, Lai RC, Wong W, Dan YY. et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote hepatic regeneration in drug-induced liver injury models. *Stem cell research & therapy*. 2014;5(3):76.
17. Zhu YG, Feng XM, Abbott J, Fang XH. et al. Human mesenchymal stem cell microvesicles for treatment of Escherichia coli endotoxin-induced acute lung injury in mice. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2014;. ۲۵-۱۱۶:(۱)۳۲
18. Zhang B, Shi Y, Gong A, Pan Z. et al. HucMSC Exosome-Delivered 14-3-3ζ Orchestrates Self-Control of the Wnt Response via Modulation of YAP During Cutaneous Regeneration. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2016;34(10):2485-500.

19. Wang R, Jiang W, Zhang L, Xie S. et al. Intra-articular delivery of extracellular vesicles secreted by chondrogenic progenitor cells from MRL/MpJ superhealer mice enhances articular cartilage repair in a mouse injury model. *Stem cell research & therapy*. 2020;11(1):93.
20. Zhang S, Chu WC, Lai RC, Lim SK. et al. Exosomes derived from human embryonic mesenchymal stem cells promote osteochondral regeneration. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2016;24.
21. Tao S-C, Yuan T, Zhang Y-L, Yin W-J. et al. Exosomes derived from miR-15-40 p-overexpressing human synovial mesenchymal stem cells enhance cartilage tissue regeneration and prevent osteoarthritis of the knee in a rat model. *Theranostics*. 2017;7(1):180.
22. Vonk LA, van Dooremalen SFJ, Liv N, Klumperman J. et al. Mesenchymal Stromal/stem Cell-derived Extracellular Vesicles Promote Human Cartilage Regeneration In Vitro. *Theranostics*. 2018;8(4):906-20.
23. Kim M, Steinberg DR, Burdick JA, Mauck RL. Extracellular vesicles mediate improved functional outcomes in engineered cartilage produced from MSC/chondrocyte cocultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019;116(5):1569-78.
24. Aung A, Gupta G, Majid G, Varghese S. Osteoarthritic chondrocyte-secreted morphogens induce chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum*. 2011;63(1):148-58.
25. Shi J, Liang J, Guo B, Zhang Y. et al. Adipose-Derived Stem Cells Cocultured with Chondrocytes Promote the Proliferation of Chondrocytes. *Stem Cells Int*. 2017;2017:1709582.
26. Bian L, Zhai DY, Mauck RL, Burdick JA. Coculture of human mesenchymal stem cells and articular chondrocytes reduces hypertrophy and enhances functional properties of engineered cartilage. *Tissue engineering Part A*. 2011;17(7-8):1137-45.
27. Xu L, Wu Y, Xiong Z, Zhou Y. et al. Mesenchymal Stem Cells Reshape and Provoke Proliferation of Articular Chondrocytes by Paracrine Secretion. *Scientific Reports*. 2016;6(1):32705.
28. Li Q, Yu H, Sun M, Yang P. et al. The tissue origin effect of extracellular vesicles on cartilage and bone regeneration. *Acta Biomater*. 2021;125:253-66.
29. Khalilifar MA, Baghaban Eslaminejad MR, Ghasemzadeh M, Hosseini S. et al. In Vitro and In Vivo Comparison of Different Types of Rabbit Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Repair. *Cell journal*. 2019;21(2):۱۰۰-۱۰۵:(
30. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2018;7(1):1535750.
31. Eslaminejad MB, Poor EM. Mesenchymal stem cells as a potent cell source for articular cartilage regeneration. *World journal of stem cells*. 2014;6(3):344.
32. Bakhtina A, Tohfafarosh M, Lichtler A, Arinzeh TL. Characterization and differentiation potential of rabbit mesenchymal stem cells for translational regenerative medicine. *In vitro cellular & developmental biology Animal*. 2014;50(3):251-60.
33. Wen Z, Mai Z, Zhu X, Wu T. et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate cardiomyocyte apoptosis in hypoxic conditions through microRNA144 by targeting the PTEN/AKT pathway. *Stem cell research & therapy*. 2020;11(1):36.
34. Chen Y, Xue K, Zhang X, Zheng Z. et al. Exosomes derived from mature chondrocytes facilitate subcutaneous stable ectopic chondrogenesis of cartilage progenitor cells. *Stem cell research & therapy*. 2018;9(1):318.
35. Lian C, Wang X, Qiu X, Wu Z. et al. Collagen type II suppresses articular chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis progression by promoting integrin $\beta 1$ -SMAD1 interaction. *Bone Research*. 2019;7:8.

36. Ghosh S, Laha M, Mondal S, Sengupta S. et al. In vitro model of mesenchymal condensation during chondrogenic development. *Biomaterials*. 2009;30(33):6530-40.
37. Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A. et al. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes & development*. 2002;16(21):2813-28.
38. Hodax JK, Quintos JB, Gruppuso PA, Chen Q. et al. Aggrecan is required for chondrocyte differentiation in ATDC5 chondroprogenitor cells. *PLoS One*. 2019;14(6):e0218399.
39. Esmaili A, Hosseini S, Kamali A, Hosseinzadeh M. et al. Co-aggregation of MSC/chondrocyte in a dynamic 3D culture elevates the therapeutic effect of secreted extracellular vesicles on osteoarthritis in a rat model. *Scientific Reports*. 2022;12(1):19827.
40. Shen G. The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage. *Orthodontics & craniofacial research*. 2005;8(1):11-17.
41. Mueller MB, Tuan RS. Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum*. 2008;58(5):1377-88.
42. Knuth CA, Andres Sastre E, Fahy NB, Witte-Bouma J. et al. Collagen type X is essential for successful mesenchymal stem cell-mediated cartilage formation and subsequent endochondral ossification. *European cells & materials*. 2019;38:106-22.
43. Fabre H, Ducret M, Degoul O, Rodriguez J. et al. Characterization of Different Sources of Human MSCs Expanded in Serum-Free Conditions with Quantification of Chondrogenic Induction in 3D. *Stem Cells International*. 2019;2019:2186728.