بررسی روند رشد جنینی مفصل زانوی موش سوری در محیط کشت

دکتر عبدالحسین شاموردی[۱]، دکتر احمد حسینی[۲]، دکتر مجتبی رضازاده[۳]، دکتر سعید کاظمی‌آشتیانی[۱]

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۳، شماره ۱ و ۲، ۴۱-۳۷، (۱۳۷۷)

برای مطالعه اثرات احتمالی حرکت برروی رشد مفصل، جوانه اندام جنینهای ۱۵ روزه موش سوری پس از جداشدن به محیط کشت منتقل و بمدت یک تا شش روز در انکوباتور تحت شرایط دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن کشت داده شدند. محیط کشت هر ۲۴ ساعت یکبار تعویض گردید. بدنبال آن نمونه‌ها با محلول بوئن تثبیت شده و پس از مرحله آماده‌سازی و تهیه بلوک پارافینی بطور سریال برش و با روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. نتایج نشان می‌دهد که در نمونه‌های کشت داده شده سلولهای خط مفصلی بجای تشکیل حفره، تبدیل به سلولهای شبه فیبروبلاستی و یا غضروفی می‌شدند. ساختمانهای داخل مفصلی و کپسول مفصلی نیز در شرایط محیط کشت تشکیل نمی‌شود. از این مطالعه می‌توان استنتاج نمود که شرایط محیط کشت و عدم حرکت می‌تواند رشد مفصل و ساختمانهای داخلی آنرا تحت تأثیر قرار دهد.

واژه‌های کلیدی : رشد مفصل سینوویال، حرکت، محیط کشت

برروی شکل‌گیری مفصل و حفظ آن عوامل و فاکتورهای داخلی و خارجی (۱) مؤثر می‌باشند. حرکت یکی از عواملی است که بررشد مفصل بعنوان عامل

۱) گروه پژوهشی علوم تشریح جهاد دانشگاهی علوم پزشکی ایران، تهران - ایران.
۲) گروه آموزشی علوم پایه دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران، تهران - ایران.
۳) گروه آموزشی علوم تشریح دانشکده پزشکی تربیت مدرس تهران، تهران - ایران.

خارجی تأثیر دارد. نقش حرکت بر رشد مفصل را می‌توان با سه متد ذیل بررسی نمود (۲):

الف – کشت جوانه اندامی در محیط آزمایشگاه

ب – پیوند جوانه اندامی به غشاء پری‌آلانتوئیک و یا به غشاء Coelomic

ج – بلوکه کردن نوروماسکولار جانکشن (Neuromuscular Junction)

در مطالعات گذشته عمدتاً نقش حرکت را در رشد مفصل با متد بلوکه کردن نورماسکولار جانکشن بررسی کرده‌اند. در این متد حرکات (مایع آمنیوتیک) کامل حذف نمی‌گردد. جهت حذف کامل حرکت (۶ و ۱۰) رشد جوانه اندامی و مفصل را با متد کشت اندام بررسی و گزارش کردند که مفاصل و استخوانها در جوانه اندامی جدا شده در محیط کشت شکل می‌گیرد. ولی مورفوژنزیس (Mophogenesis) مفصل جداشده کامل نمی‌شود.

Fell and Conti در سال ۱۹۴۳ گزارش نمودند که شکل‌گیری اولیه اسکلت اندام و مفصل پرندگان در محیط کشت صورت می‌گیرد و شکل‌گیری سطوح مفصل نیز بدنبال رشد و متمایزشدن اسکلروبلاستوما می‌باشد (۴).

Gündisch در سال ۱۹۴۳ با انجام کشت اسکلروبلاستومای اندام جوجه به این نتیجه رسید که رشد درون محیط کشت اغلب به غلط ارگانوتیپیک تفسیر و تعبیر شده در حالیکه رشد درون محیط کشت جوانه اندامی جدا شده یک تکثیر هیستوتیپیک بافتی می‌باشد و فقط تمایز و تزاید سلولهای غضروفی به بلاستومای اسکلت اندامی کشت داده شده ادامه می‌یابد (۵). بدنبال رشد هیستوتیپیک این مراکز غضروفی در بلاستوما، بافت همبند سست میان سطوح مفصلی نیز غضروفی خواهند شد. هر چه مفاصل به هنگام جداسازی، تکامل بیشتری یافته باشند غضروفی‌شدن با تأخیر بیشتری صورت خواهد گرفت. وی همچنین گزارش نمود که حرکت از جوش‌خوردن سطوح غضروفی ممانعت می‌کند.

Lelkes در سال ۱۹۵۸ مفصل زانوی ۶ یا ۷ روزه جنین جوجه را با روش کشت اندام در شیشه ساعت حاوی محلول پلاسمای خون و Fowl embryonic extract کشت داد. او نمونه‌ها را به دو گروه که یکی از گروهها هر روز ۵ بار دارای حرکت غیرفعال و گروه دیگر بدون حرکت بعنوان کنترل کشت داد. وی گزارش نمود که در گروه کنترل که حرکت، نداشت بافت بین مفصل متمایز نشده و غضروفی شدند و در گروه دیگر که حرکت غیرفعال داشت این روند صورت نگرفت و حفره‌های کوچکی نیز در منطقه مفصلی مشاهده شد. او مطرح نمود که حرکت بر شکل‌گیری ساختمانها و سطوح مفصلی تأثیر می‌گذارد و متمایزشدن ساختمانهای مفصل مدیون حرکت می‌باشد.

در مطالعه اخیر نیز رشد درون محیط کشت مفصل زانوی ۱۵ روزه و رشد نرمال مفصل سینوویال جنین موش سوری مطالعه گردید. در نمونه‌های محیط کشت، شکل‌گیری اولیه مفصل صورت گرفته بود و هیچ توجه‌ای به مراحل اولیه رشد آن نشده است.

مواد و روش کار

نمونه‌های مورد مطالعه در گروه شاهد جوانه‌های اندامی جنین ۱۳ تا ۱۹ روزه (پلاک واژینال = روز صفر حاملگی) و گروه تجربی (محیط کشت) جوانه اندامی جنین ۱۵ روزه موش سوری می‌باشند. تعداد نمونه‌ها در هر گروه پنج عدد است. جنین نمونه‌ها پس از کشتن موش با کشیدگی در ناحیه گردن و خارج‌کردن آنها با روش سزارین به پلیت حاوی محیط کشت منتقل شد. جوانه اندامی آنها را از محل اتصال به تنه با قیچی ظرف چشم پزشکی و سوزن سرنگ انسولین جدا و نمونه‌های شاهد را به محلول فیکساتیو بوئن (Bouin's fluid) و نمونه‌های تجربی را به پتری‌دیش حاوی محیط کشت انتقال داده شد. محیط کشت این مطالعه، محیط کشت Ham's F10 با نسبت ۱۰ درصد سرم گوساله می‌باشد.

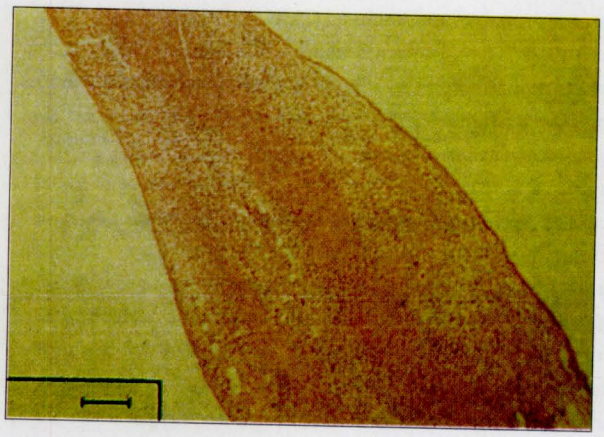
نمونه‌های تجربی را در انکوباتور مرطوب ۳۷ درجه با دی‌اکسید کربن ۵ درصد برای مدت ۱ تا ۶ روز کشت داده و محیط کشت آنها نیز هر ۲۴ ساعت یکبار تعویض می‌گردید. این گروه نیز پس از کشت به محلول فیکساتیو بوئن منتقل گردیدند.

نمونه‌ها پس از ۷۲ ساعت در محلول بوئن، آماده‌سازی و در پارافین قالب‌گیری شدند و با میکروتوم روتاری بصورت سریال برشهای ۵ میکرونی تهیه و با روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی و مورد مطالعه قرار گرفتند.

نتایج

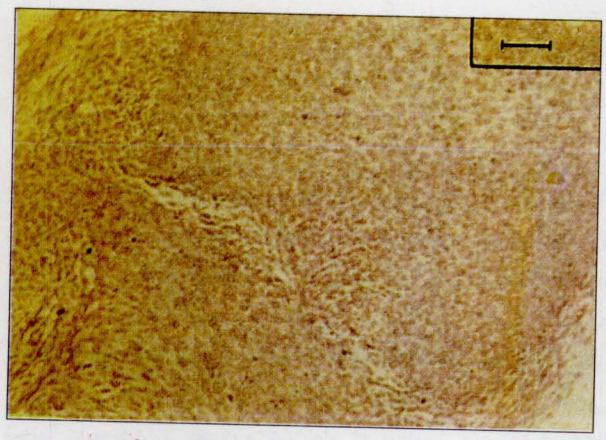
گروه شاهد:

روز ۱۳ جنینی توده متراکم و ممتد سلولهای مزانشیمی در طول اندام دیده می‌شود. این سلولها هسته گرد و بازوفیلیک دارند (تصویر ۱).



تصویر ۱ – جوانه اندامی از جنین ۱۳ روزه. A) توده متراکم سلولهای مزانشیمی بصورت ممتد مشخص شده است، رنگ‌آمیزی : H&E، بزرگنمایی ۱۰۰×

در روز ۱۴ جنینی مدل‌غضروفی درشت‌نی و ران و اینتروزون هموژنه (Homogeneous interzone) که در آینده مفصل زانو را شکل می‌دهد دیده می‌شود. این منطقه بدون عروق (Avascular) است و در قسمت میانی آن نیز تعدادی سلول تیره مشاهده می‌گردد (تصویر ۲).

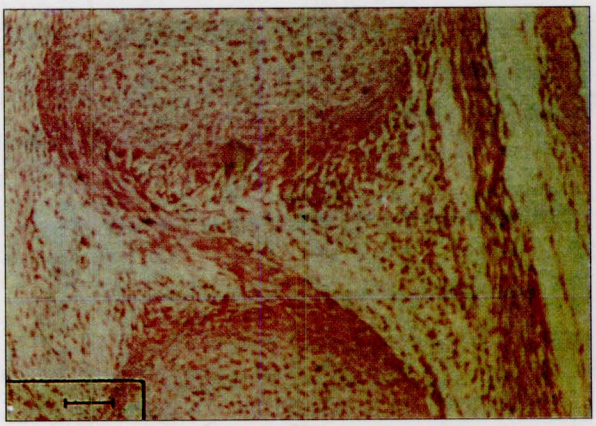


تصویر ۲ – جوانه اندامی از جنین ۱۴ روزه. A) Dark cell، رنگ‌آمیزی : H&E، بزرگنمایی ۴۰۰×

اینترزون سه لایه در روز ۱۵ جنینی مشاهده شد که دو لایه کناری، غضروف مفصلی را که با پری‌کندریوم ممتد می‌گردد را شکل می‌دهد و لایه میانی که دارای سلولهای سست و پراکنده هست در آینده ساختمانها و عناصر داخلی مفصل از آن مشتق می‌گردد. در این لایه تعدادی سلول تیره و ساختمان اولیه لیگامان متقاطع نیز دیده می‌شود (تصویر ۳).

تصویر ۳ - جوانه اندامی از جنین ۱۵ روزه. A) Synovial Mesenchyme مشاهده می‌شود، رنگ‌آمیزی : H&E، بزرگنمایی ۱۰۰×

کندیلهای استخوان ران و درشت‌نی در روز ۱۶ جنینی برجسته شده و بالشتک جانبی و لیگامانهای متقاطع و حفرات کوچکی نیز در ناحیه محیطی لایه میانی مشاهده می‌گردد (تصویر ۴).



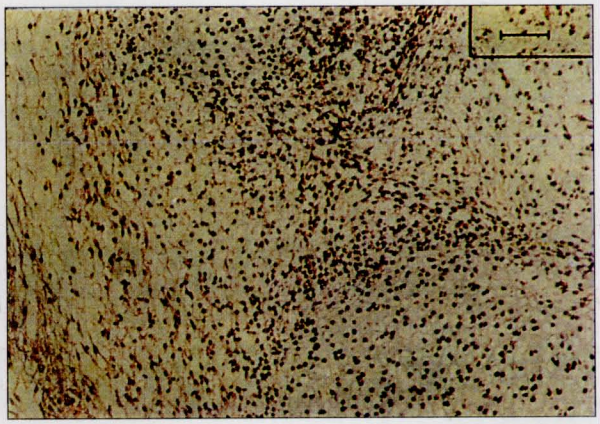
تصویر ۴ - جوانه اندامی از جنین ۱۶ روزه. A) لیگامان Cruciate، B) حفره‌های مفصلی با سلولهای پراکنده، رنگ‌آمیزی : H&E، بزرگنمایی ۲۰۰×

در روز ۱۷ جنینی کندیل استخوانها واضحتر و بزرگتر شد و فضای بین دو کندیل دیده می‌شود. منیسک داخلی و خارجی گوه‌ای شکل شده و شکاف مفصلی نیز از بهم پیوستن حفره‌ها شکل گرفته است. کپسول و حفره مفصلی و عناصر داخلی در روز ۱۸ و ۱۹ جنینی شکل نهایی خود را بدست آورده است (تصویر ۵).

گروه تجربی :

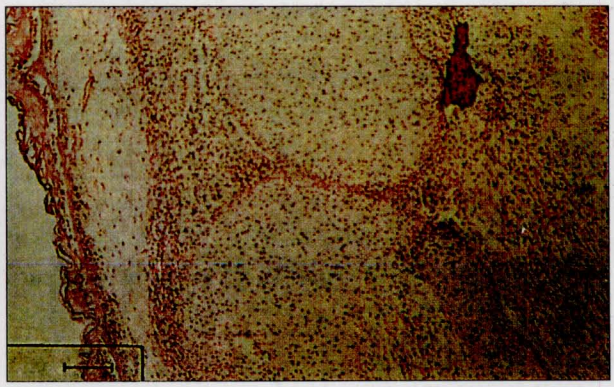
در نمونه یک روزه در محیط کشت، اینترزون سه لایه دیده می‌شود. لایه میانی اینترزون پرسلول و ساختمان اولیه لیگامان کروشیت دید· می‌شود. این درمقایسه‌باروز۱۶شاهد که حفره‌های مفصلی در ناحیه محیطی دیده می‌شد، از نظر رشدی عقبتر و حفره وعناصر داخلی مفصلی مشاهده نمی‌گردد (تصویر ۶).

تصویر ۵ - جوانه اندامی از جنین ۱۷ روزه. A) منیسک داخلی و خارجی، B) لیگامان Cruciate، C) شکاف مفصلی، رنگ‌آمیزی : H&E، بزرگنمایی ۲۰۰×



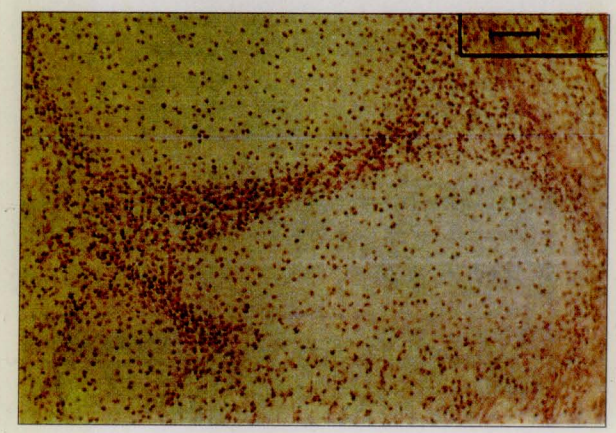
تصویر ۶ - جوانه اندامی از جنین ۱۵ روزه (یک روز در محیط کشت). A) تراکم سلولها در منطقه لیگامانهای Cruciate، رنگ‌آمیزی : H&E، بزرگنمایی ۲۰۰×

در نمونه سه روز در محیط کشت، فضای بین دو مدل غضروفی استخوانها کوچک و سلولهای ناحیه میانی متراکمتر شده‌اند و در مقایسه با روز ۱۸ شاهد، عناصر داخلی مفصلی و حفره و کپسول مفصلی دیده نمی‌شود (تصویر ۷).



تصویر ۷ - جوانه اندامی از جنین ۱۵ روزه (سه روز در محیط کشت). A) لایه واسطه‌ای اینترزون باریکتر از نرمال می‌باشد، B) سلول کندروسیت، رنگ‌آمیزی : H&E، بزرگنمایی ۱۰۰×

در نمونه ۶ روزه در محیط کشت این فضا کمتر و در سولهای لایه میانی یک رجعت سلولی دیده می‌شود. سلولهای این ناحیه دوکی شکل شبیه فیبروبلاست‌ودرناحیه‌محیطی‌نیزقسمت‌غضروفی مشاهده می‌گردد (تصویر ۸).



تصویر ۸ - جوانه اندامی از جنین ۱۵ روزه (شش روز در محیط کشت). A) کندروسیتها، تا منطقه سطوح مفصلی مشاهده می‌شوند، B) تراکم سلولی در منطقه اینترزون بیشتر و در قسمت قدامی تاندون Qudriceps دیده می‌شود، رنگ‌آمیزی : H&E، بزرگنمایی ×۲۰۰

بحث

در مطالعه حاضر نقش حرکت و رشد مفصل در محیط کشت با جداکردن اندام در روز ۱۵ جنینی و کشت‌دادن آن در محیط Ham's F10 بررسی گردید. مفصل و عناصر داخلی آن مانند منسیکها، لیگامانهای کروشیت در نمونه‌های کشت داده شده مشاهده نگردید که این یافته با نتایج Sokolaff و Drachman در سال ۱۹۶۶ (۲) و Valojerdy در سال ۱۹۹۰ (۱۱) همسو می‌باشد. در نمونه‌های ۱۶ روزه نرمال این مطالعه ساختمانهای اولیه عناصر داخل مفصل شکل گرفته و در روز ۱۸ جنینی مفصل کامل شده است. در مطالعه حاضر، در نمونه‌هایی که کاندید برای کشت بودند ساختمانهای اولیه اعضاء داخل مفصلی مشاهده می‌گردید، اما پس از ۳ تا ۶ روز در محیط کشت این ساختمانهای اولیه به سلولهای شبیه به فیبروبلاست و غضروفی تبدیل شده بودند که با توجه به گزارش Drachman و همکاران در سال ۱۹۷۶ (۳) می‌توان مطرح نمود که ساختمانهای داخل مفصلی از مزانشیم اینترزون بطور ژنتیکی شکل گرفته اما حفظ و رشد آتی آنها نیاز به حرکت دارد.

حفره مفصلی بین ران و درشت‌نی، ران و کشکک در نمونه‌های کشت داده شده در این بررسی شکل نگرفت و حدود پاتلا را نیز نمی‌توان مشخص نمود. تاندون عضلات مجاور مفصل نیز آتروفی شده است. Lelkes در سال ۱۹۵۸ (۸)، Fell and Canti در سال ۱۹۳۴ (۴) و Valojerdy در سال ۱۹۹۰ (۱۱) شکل نگرفتن حفره مفصلی را نیز در نمونه‌های فاقد حرکت گزارش نموده‌اند. در نمونه‌های ۱۶ روزه نرمال این مطالعه محدوده پاتلا و سلولهای پیش‌ساز غضروفی آن و مفصل فمور پاتلا به روشنی دیده می‌شود. تاندون کوادریسپس در روز ۱۶ و ۱۸ جنینی متمایز شده است. با توجه به یافته‌های محققین قبل و این مطالعه شاید این شکل‌نگرفتن حفره مفصلی در نمونه‌های کشت داده شده بدلیل حذف حرکات جنینی و انقباض عضلات مجاور باشد و حدس زده می‌شود که فاکتورهای داخلی (ژنتیک و مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده) اولین عامل مؤثر در حفره‌سازی و فاکتورهای خارجی (حرکات جنین و انقباض عضلات) در تکمیل و حفظ حفره مفصلی نقش داشته باشد.

گونه حیوان آزمایشگاهی این مطالعه با مطالعات قبل Drachman و همکاران در سال ۱۹۷۶ (۳) و Valojerdy در سال ۱۹۹۰ (۱۱) متفاوت بود، ولی با توجه به همسوبودن یافته‌ها می‌توان مطرح نمود که این روند ارتباطی به گونه حیوان ندارد.

در مطالعه حاضر در نمونه‌های کشت داده شده غضروف مفصلی شکل نگرفته و فیوزشدن غضروفی و فیبروزی بین دو شفت استخوانی نیز مشاهده گردید که این با یافته‌های Mitrovic در سال ۱۹۸۲ (۹) و Valojerdy در سال ۱۹۹۰ (۱۱) همسو می‌باشد.

References

1. Charles, W. Archer. Cellular aspects of the development of diarthrodial joint and articular cartilage. J. Anat. 164, 444-456, (1994).
2. Drachman, D.B. and Skoloff, L. The role of mevement in embryonic joint development. Dev. Biol. 14, 401-420, (1966).
3. Drachman, D.B., Weiner, L.P., Price, D.L. and Chase, J. experimental arthrogryposis caused by viral myopathy. Arch. Neurol. Chicago, 33, 362-367, (1976).
4. Fell, H.B. and Canti, R.G. Experiments on the development *in vitro* of the avian knee-joint. Proc. R. Soc. Lond. (B), 116, 316-351, (1943).
5. Gundish, M. The mechanism of development of Skelton and joint of limbs. Experiment *in vitro* on embryonic limb of chicken. Erdélyi muzeum egyesület, Orv. Ert. 54, 33-44 (In Mungarian), (1943).
6. Hamburger, V. and Waugh, M. The primary development of the skeleton in nerveless and poorly innervated limb transplants in chick embryos, Physiol. Zool. 13, 367-381, (1940).
7. Hosseini, A. and Hogg, D.A. The effect of paralysis on skeletal development in the chick embryo. I) general effects. J. Anat. 177, 159-168, (1990).
8. Lelkes, G. Experiments *in vitro* on the role of movement in the development of the joint, J. Embryol. Exp. Morphol. 6(2), 183-186, (1958).
9. Mitrovic, D. Development of the articular cavity in paralysed chick embryos and in chick embryo limb buds cultured on chorio-allantoic membranes. Acta. Anat. 113, 313-324, (1982).
10. Murray, P.D.F. and Selby, D. Intrinsic and extrinsic factors in the primary development of the skeleton. Arch. Entwicklungsmech. Org. 122, 629-662, (1930).
11. Valojerdy, M.R. Effect of paralysis of skeletal muscles on the development of synovial joints in the chick embryo. Ph.D. Thesis, Glasgow University, (1990).

A survey of embryonic development of swissmice knee joint in vitro

Shahverdi Gh.H.[1], Hosseini A.[2], Rezazadeh M.[3], Kazemi Ashtiani S.[1]

[1]*Department of Anatomical Research, Jahad Daneshghai, Iran Medical University, Tehran - Irna.* [2]*Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Beheshti, Medical Sciences Tehran University, Tehran - Iran.* [3]*Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran- Iran.*

In order to study the development of knee joint in absence of movement; mouse limb buds were separated from 15 days old embryos and cultured in Ham's F-10 medium conditioned with 37°C and 5% Co_2 for 1 to 6 days. The medium was renewed every 24h during incubation. After 6 days, specimens were fixed by Buin's fluid, embedded in paraffin wax, serially sectioned and stained with H&E. The results indicated that, the mesenchymal cells of joint interzone were differentiated to fibroblast like cells and chondrocytes rather than lossing to form joint space. The intra-articular structures and joint capsules were also failed to develop in culture condition. In conclusion it can be postulated that, the absence of movement and *in vitro* conditions could affect the joint development and its intra-articular structures.

Key words : Synovial joint development, Movement, Culture