

## اثر فاکتورهای مترشح از سلول‌های بنیادی حاصل از بافت چربی (ADSC-CM) روی تولید و تخریب اسید هیالورونیک در سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان

منا ملک محمدی<sup>۱</sup>

دکتر حسین عبدالتهرانی<sup>۱</sup>

دکتر ناصر اقدمی<sup>۲</sup>

۱. گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۲. گروه سلول‌های بنیادی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران.

**زمینه و هدف:** ساخته شدن ماتریکس خارج سلولی (extracellular matrix [ECM]) برای ترمیم جراحات یک عامل کلیدی است. اصلی‌ترین عضو این ماتریکس اسید هیالورونیک (hyaluronic acid [HA]) است. مطالعات اخیر نشان داده است که محیط حاصل از کشت سلول‌های مزانشیم مشتق از بافت چربی (ADSC-CM) باعث افزایش بیان و تولید کلاژن I، III و فیبرونکتین که اجزای ECM هستند، می‌شود. هدف این تحقیق بررسی اثر ADSC-CM در بیان ژن‌های تولیدکننده و تخریب‌کننده HA در سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان است.

**روش اجرا:** سلول‌های مزانشیم از سه نمونه‌ی لیپوساکشن جدا شد و بعد از کشت محیط رویی آن‌ها جمع آوری شد. نمونه‌ی بیوپسی پوست از شش نفر گرفته شد و سلول‌های فیبروبلاست از آن‌ها جدا شد. این سلول‌ها در ۱۰۰٪ ADSC-CM کشت داده شدند. بیان سه ژن تولیدکننده و دو ژن تخریب‌کننده HA در نمونه‌های تیمار شده و کنترل با real time PCR و میزان نهایی ترشح HA با کیت ELISA اندازه‌گیری شد.

**یافته‌ها:** بیان دو ژن تولیدکننده HA، HAS1 و HAS2 در نمونه‌های تیمار شده نسبت به کنترل افزایش و بیان ژن تخریب‌کننده HA، HYAL2 در آن‌ها کاهش یافت. اندازه‌گیری میزان ترشح نهایی HA توسط به روش ELISA نشان داد که میزان ترشح آن در نمونه‌های تیمار شده نسبت به کنترل افزایش یافته است.

**نتیجه‌گیری:** تولید و ترشح HA در سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان با اثر تحریک‌آمیز فاکتورهای رشد موجود در ADSC-CM، افزایش می‌یابد. بنابراین ترشحات ADSC با افزایش تولید و ترشح اجزاء ECM می‌تواند نقش اساسی در ترمیم داشته باشد.

**کلیدواژه‌ها:** ماتریکس خارج سلولی، فیبروبلاست، بافت چربی، هیالورونیک اسید، ترمیم جراحی

دریافت مقاله: ۹۰/۰۹/۰۶ پذیرش مقاله: ۹۰/۱۱/۲۴

پوست و زیبایی؛ بهار ۱۳۹۱، دوره‌ی ۳ (۱): ۴۵-۶۱

نویسنده‌ی مسئول:

دکتر حسین عبدالتهرانی

تهران، بزرگراه جلال آل احمد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده‌ی علوم پزشکی، صندوق پستی ۳۳۱-۱۴۱۱۵، پست الکترونیک:

h.tehrani@modares.ac.ir

تعارض منافع: اعلام نشده است.

عوامل مضر محیطی از قبیل تابش اشعه، آسیب‌های مکانیکی و سوختگی‌های گرمایی و شیمیایی دارد. حفظ ساختار طبیعی پوست، به‌خصوص پوست صورت، بسیار مهم است چرا که ظاهر و جلوه‌ی تعیین‌کننده‌ی مهمی برای ارتباط شکلی فرد است و ارزش بالایی در روابط اجتماعی دارد، تا جایی که درمان‌های آرایشی و

### مقدمه

پوست بزرگ‌ترین بافت بدن مهره‌داران است که عملکردهای زیادی شامل تنظیم حرارت، هدایت حس‌های فیزیکی و عمل به‌عنوان سد مکانیکی (برای حفاظت بدن در مقابل هجوم میکروارگانیسم‌ها و

فعالیت درون‌ریزی خود و ترشح فاکتورهای رشد باعث تکثیر سلول‌های فیبروبلاست پوست می‌شوند. روی هم رفته ADSC-CM باعث بهبود ترشح کلاژن نوع 1 از سلول‌های فیبروبلاست پوست و محرک مهاجرت سلول‌های فیبروبلاست و در التیام جراحات مدل‌ها *in vitro* می‌باشد. ADSC تعداد زیادی از فاکتورهای رشد مانند فاکتور رشد اولیه فیبروبلاست PIGF، PDGF، VEGF، HGF، TGF- $\beta$ ، KGF، bFGF را در محیط خود ترشح می‌کند.

هدف از این تحقیق، بررسی اثر محیط رویی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی روی ترشح HA از سلول‌های فیبروبلاستی مشتق از پوست، با هدف به‌کارگیری آن در ترمیم آسیب‌های پوستی با بهره‌گیری از اثر القایی ADSC-CM بر روی فیبروبلاست پوست انسان بود. این تحقیق در پی پاسخ به این پرسش بود که آیا فاکتورهای موجود در ADSC-CM سلول‌های فیبروبلاست را به افزایش تولید HA تحریک می‌کنند؟

## روش اجرا

### نمونه‌گیری بافت چربی و بیوپسی پوست

سه نمونه بافت چربی جدا شده طی فرایند لیپوساکشن و شش نمونه بیوپسی پوست از افراد مجزا بعد از دریافت رضایت‌نامه گرفته شد.

### جداسازی سلول‌های بنیادی از نمونه‌ی لیپوساکشن

بافت چربی سه بار با بافر نمکی PBS (هم‌حجم بافت) به همراه ۱٪ آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین شست‌وشوی داده شد. بعد از هم‌وزن کردن بافت با اسکالپر، بافت با ۰/۲٪ آنزیم کلاژناز نوع I که در بافر PBS تهیه شده بود (به میزان ۱/۲ حجم بافت) به مدت ۱ تا ۲ ساعت در دمای ۳۷°C هضم شد. بعد از غیرفعال کردن کلاژناز با محیط کشت  $\alpha$ -MEM حاوی ۱۰٪ FBS، به‌منظور جداسازی

جراحی‌های پلاستیک برای طراوت و یا رفع ضایعات پوست یک صنعت چند میلیون دلاری را در سراسر دنیا تشکیل داده است.<sup>۱</sup>

پوست از سه لایه اپی‌درم، درم و زیر پوست تشکیل شده است. ماتریکس خارج سلولی (extracellular matrix [ECM]) بزرگ‌ترین جزء تشکیل‌دهنده‌ی پوست طبیعی است که ژل مانند است و به‌وسیله‌ی سلول‌های پوست تولید می‌شود. ساخته‌شدن ECM یک عامل کلیدی برای ترمیم ضایعات پوستی از قبیل سوختگی، سالک، آبله مرغان و جای جراحات و جوش است. اجزاء ماتریکس خارج سلولی عبارتند از: پلی‌ساکاریدهای مختلف، آب و پروتئین‌های کلاژنی.

فیبروبلاست‌ها اصلی‌ترین سلول‌های تشکیل‌دهنده و مستقر در بافت همبند هستند که تولید و ترشح ترکیب‌های بافت همبند و مولکول‌های پیش‌ساز انواع مختلف کلاژن و فیبرهای الاستین را برعهده دارند. برنامه‌ی ترشحاتی فیبروبلاست‌ها تعیین‌کننده‌ی ساختار ECM و در نتیجه فراهم‌کننده‌ی اساس ساخت نوع به‌خصوصی از بافت همبند می‌باشد. هیالورونیک اسید (hyaluronic acid [HA])، عمده‌ترین و مهم‌ترین جزء تشکیل‌دهنده‌ی ECM، یک گلیکوز‌آمینوگلیکان است که آب جذب می‌کند و به مقدار زیاد در بافت آسیب‌دیده یا در حال رشد دیده می‌شود.<sup>۲،۳</sup>

استفاده از سلول‌های بنیادی برای ترمیم جراحات یکی از روش‌هایی است که تحقیقات زیادی روی آن انجام شده است.<sup>۴،۵</sup> سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی (adipose derived stem cell [ADSC])، علاوه بر عملکرد خود به‌عنوان واحدهای سازنده‌ی ناحیه آسیب‌دیده، به‌صورت سلول‌های درون‌ریز عمل کرده و مواد مترشحه‌ی سودمند خود را به محیط پیرامون‌شان می‌ریزند. مشاهده شده است که سلول‌های بنیادی حاصل از بافت چربی به خصوص به‌وسیله‌ی فعال کردن فیبروبلاست‌ها التیام جراحات را سرعت می‌بخشند، آن‌ها نه تنها به‌وسیله‌ی ارتباط بین سلول به سلول بلکه با

الفاکننده‌ی تمایزی استخوان جایگزین شد. محیط تمایزی استخوان شامل ۸۹۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه، ۱۳/۵ گرم DMEM (Gibco)، ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۱٪ پنسیلین/استرپتومایسین، ۱۰ میلی‌لیتر (IX) BME (Gibco)، ۳/۷ گرم  $\text{NaHCO}_3$  و با ۳ تا ۵ میلی‌لیتر (1N) HCl، pH آن به ۷ رسانیده شد، ۱۰۰ میلی‌لیتر FCS، ۵۰ میلی‌گرم اسید آسکوربیک (با غلظت نهایی  $50 \mu\text{g/ml}$ )، دگزامتازون با غلظت نهایی  $10^{-8}$  M،  $2,40,16$  گرم در لیتر  $\beta$ -glycerol phosphate (با غلظت نهایی ۱۰ mM) بود. به‌عنوان گروه شاهد، از محیط  $\alpha$ -MEM همراه با ۱۰٪ FBS در برخی از خانه‌ها استفاده شد. کشت سلول به مدت ۱۰ تا ۱۲ روز در شرایط دمای  $37^\circ\text{C}$  و ۵٪  $\text{CO}_2$  انکوبه یافت و هر سه روز یک بار محیط آن‌ها تعویض گردید. در پایان دوره‌ی تمایز، وقوع تمایز سلول با روش رنگ‌آمیزی آلزارین قرمز بررسی شد.

#### رنگ‌آمیزی Alizarin red S

بعد از ۱۰ روز سلول‌ها را با PBS شسته و به مدت ۱۵ دقیقه با متانول تثبیت شدند. مقدار ۲ گرم پودر آلزارین قرمز S در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و فیلتر گردید و pH آن در محدوده‌ی ۱/۴ تا ۳/۴ با هیدروکسید آمونیوم تنظیم شد و روی سلول‌ها به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. در پایان، سلول‌ها با آب مقطر شسته و خشک شدند.

#### تمایز سلول‌های ADSC به چربی

برای این منظور از سلول‌های پاساژ چهارم استفاده شد. ابتدا سلول‌ها به چاهک‌های پلیت شش‌خانه‌ی کشت انتقال داده شدند و زمانی که کف ظرف کشت از تک‌لایه‌ی سلولی پوشیده شد، تمایز آغاز گردید. محیط معمولی سلول‌ها با محیط تمایزی چربی هر ۳ روز یک بار تعویض شد. محیط تمایزی چربی همانند محیط تمایز به استخوان است با این تفاوت که دگزامتازون آن با غلظت نهایی  $10^{-7}$  M بوده و به‌جای  $\beta$ -glycerol

سلول‌های سوسپانسیون به‌دست‌آمده، به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت  $400 \text{g}$  سانتریفوژ شد. مایع رویی خارج شد و سلول‌های تک‌هسته‌ای که به‌صورت pellet در ته لوله باقی مانده بود در محیط کشت  $\alpha$ -MEM کشت داده شد و بعد از گذشت ۷-۵ روز فقط سلول‌های مزانشیم آن به کف فلاسک چسبیدند.

#### کشت و پاساژ سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی

سلول‌ها در محیط  $\alpha$ -MEM کامل در  $37^\circ\text{C}$  با ۵٪  $\text{CO}_2$  کشت داده شد. سلول‌های اولیه‌ی جداشده‌ی مزانشیمی قبل از متراکم‌شدن کلونی‌ها پاساژ داده شدند. سلول‌ها به میزان ۳۰۰۰ تا ۴۰۰۰ سلول به ازای هر سانتی‌متر مربع به ظرف کشت جدید انتقال داده شدند. محیط آن هر ۳ الی ۴ روز تعویض شد. زمانی که سلول‌ها حداقل ۸۰٪ سطح فلاسک را پر کردند، پاساژ داده شدند.

#### شناسایی ADSC با استفاده از فلوسایتومتری

برای انجام فلوسایتومتری تعداد  $100,000$  سلول، براساس پروتکل کارخانه‌ی سازنده، با استفاده از آنتی‌بادی‌های CD73، CD105، CD90، CD45/34، CD44، IgG1 نشان‌دار شدند. به‌طور خلاصه بعد از جداسازی سلول‌ها و انتقال آن‌ها به لوله‌های فلوسایتومتری، با توجه به نوع آنتی‌بادی، مقدار ۱۰ میکروگرم از آنتی‌بادی مورد نظر روی سلول‌ها ریخته شد و به‌طور مستقیم به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردیدند و نتایج خوانده شد. در تمام آزمایش‌های مربوط به فلوسایتومتری تکرار آزمایش حداقل ۳ بار برای هر نمونه بود. برای آنالیز داده‌ها از نسخه‌ی ۲/۹ نرم‌افزار WinMDI استفاده شد.

#### تمایز سلول‌های ADSC به استخوان

تعداد  $50,000$  سلول از سلول‌های پاساژ چهارم ADSC در پلیت شش‌خانه کشت و پس از این که تمام سطح کشت پر از سلول شد، محیط آن‌ها با محیط

ثانیه جهت کاهش آلودگی انتقال یافتند. جهت شستشو و حذف اتانل، به پتری‌دیش حاوی PBS انتقال داده شدند. نمونه‌های بیوپسی با تیغ بیستوری به قطعات ۲×۲ میلی‌متری تکه‌تکه شدند. قطعات بیوپسی به لوله حاوی آنزیم دیس‌پاز II (Dispase II)  $1/2 \mu\text{l/ml}$  به مدت ۱۵-۱۸ دقیقه در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  منتقل شدند. قطعات بیوپسی از دیس‌پاز به پتری‌دیش حاوی بافر انتقال یافتند. لایه اپی‌درم از درم با استفاده از پنس جدا شد. لایه درم به قطعات کوچکتر تقسیم شده و در  $0.1\%$  کلارناز I به مدت ۴ ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  انکوبه شدند. به منظور رهاسازی سلول‌ها از درم قطعات درم با پیپت پاستور پیپتاژ شدند. آنزیم کلارناز با افزودن بافر، غیرفعال شده و سپس در سرعت  $400\text{g}$  به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. توده‌ی سلول‌های فیبروبلاست حاصل در محیط DMEM/F12 کشت داده شدند.

#### کشت سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان در ADSC-CM

تعداد  $1 \times 10^6$  سلول در فلاسک T75 کشت داده شد و بعد از ۳ روز که کف فلاسک پر شد محیط کشت هر گروه از سلول‌های فیبروبلاست با  $100\%$  محیط رویی سلول‌های مزانشیمی مشتق از بافت چربی به صورت جداگانه تعویض شده و به مدت ۲۴ ساعت در  $37^{\circ}\text{C}$  و در  $5\%$   $\text{CO}_2$  انکوبه شد و گروه کنترل با DMEM/F12 کامل کشت داده شد.

#### استخراج RNA تام سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان (HDF) پس از کشت در ADSC-CM

سلول‌ها پس از جدا شدن از کف فلاسک با PBS شستشوی داده شدند و با استفاده از محلول TRIzol® (Invitrogen)، RNA نمونه‌های تیمار شده استخراج شد. جهت حذف آلودگی احتمالی به DNA ۱ واحد آنزیم DNase برای حذف یک میکروگرم از DNA و ۱ واحد آنزیم Rnase inhibitor و  $10$  حجم از آن buffer DNase اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در

phosphate از  $0.5$  گرم indomethacine (با غلظت نهایی  $50 \mu\text{g/ml}$ ) استفاده شد. در برخی از خانه‌های پلیت شش‌خانه به‌عنوان گروه شاهد از محیط معمولی یعنی محیط  $\alpha$ -MEM با  $10\%$  FBS استفاده شد. سلول‌ها به مدت ۲۱ روز در شرایط  $37^{\circ}\text{C}$ ،  $5\%$   $\text{CO}_2$  نگهداری و در پایان این مدت تمایز با روش رنگ‌آمیزی Oil Red مورد ارزیابی قرار گرفت.

#### رنگ‌آمیزی Oil Red O

سلول‌ها به مدت یک ساعت در دمای اتاق با فرمالین  $4\%$  تثبیت و سپس با الکل  $70\%$  شسته و به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه با محلول رنگ Oil Red O ( $0.63$  گرم پودر رنگ Oil Red O در  $100$  میلی‌لیتر ایزوپروپانول  $60\%$  حل شده و فیلتر گردید) به مدت ۳۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. در پایان محلول رنگی خارج و سلول‌ها، سه بار با الکل  $70\%$  شستشو شدند.

#### نحوه‌ی جمع‌آوری محیط رویی

سلول‌های مزانشیمی پاساژ چهار ( $10^5 \times 8$  سلول) در فلاسک T75 و در محیط  $\alpha$ -MEM کشت داده شدند تا ظرف خود را  $80\%$  پر کنند. سپس با  $100$  نانوگرم میتوماکسین به ازای هر  $10$  میلی‌لیتر محیط، تیمار شده و بعد از ۹۰ دقیقه انکوبه کردن، میتوماکسین با  $2$  تا  $3$  بار شستشو با PBS از محیط حذف شد و محیط DMEM/F12 فاقد سرم به سلول‌ها اضافه شد. محیط رویی بعد از ۷۲ ساعت کشت جمع‌آوری، در سرعت  $300\text{g}$  به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و با استفاده از فیلتر سرنگی  $0.22 \mu\text{m}$  استریل شد.

#### جداسازی سلول‌های فیبروبلاست از نمونه بیوپسی پوست انسان

نمونه‌های بیوپسی به ابعاد  $1 \times 2$  سانتی‌متر که از پوست ناحیه پشت گوش جدا شده بودند به لوله حاوی  $5$  میلی‌لیتر بافر PBS و  $1\%$  آنتی‌بیوتیک پنیسیلین/استرپتوماکسین منتقل شدند. سپس نمونه‌ها از بافر جدا شده و به پتری‌دیش حاوی اتانل  $70\%$  به مدت ۳۰

شد و بیان ژن GAPDH به‌عنوان کنترل داخلی نیز اندازه‌گیری شد. به ازای هر واکنش، ده میکرولیتر (Takara) 2X Power SYBR Green PCR master mix، یک میکرولیتر ( $5 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ ) Forward primer، یک میکرولیتر ( $5 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ ) Revers primer، دو میکرولیتر cDNA، شش میکرولیتر آب دیونیزه استفاده شد و ده دقیقه در  $95^\circ\text{C}$ ، ۱۵ ثانیه در  $95^\circ\text{C}$  و ۶۰ ثانیه در  $62^\circ\text{C}$  قرار داده شد و به تعداد ۴۰ چرخه تکرار شد. برای افزایش دقت، هر واکنش به‌صورت دوتایی انجام گرفت. برای انجام واکنش‌های Real-Time PCR از دستگاه Corbett Real-Time PCR مدل RG-6000 استفاده شد.

پس از پایان برنامه، با استفاده از  $C_T$ های نمونه‌ها و آنالیز داده‌های نهایی به‌صورت Relative و به روش مقایسه  $C_T$ ها (روش  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ) انجام گرفت. ژن GAPDH به‌عنوان کنترل داخلی برای یکسان‌سازی سطح RNA استفاده شد. بدین منظور  $C_T$  هر نمونه از  $C_T$  ژن GAPDH آن کم شد تا  $\Delta C_T$  به‌دست آید. سپس  $\Delta C_T$  نمونه‌های تیمار شده منهای  $\Delta C_T$  نمونه‌ی کنترل شد تا  $\Delta\Delta C_T$  هر نمونه به‌دست آید. بیان هر ژن در هر نمونه با محاسبه  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  آن محاسبه شد. از نمونه‌های تیمار شده‌ی مربوط به هر ژن میانگین گرفته شد و به‌صورت نمودار ستونی نشان داده شد.

#### اندازه‌گیری میزان ترشح اسید هیالورونیک با استفاده از ELISA

بعد از ۲۴ ساعت کشت سلول‌های فیبروبلاست در ADSC-CM، محیط رویی این سلول‌ها برای بررسی میزان نهایی تولید HA توسط کیت ELISA (Echelon Biosciences Inc.) استفاده شد.

#### آنالیز آماری

برای نتیجه‌گیری برتر بودن یکی از گروه‌های شاهد یا سلول‌های مزانشیمی و مقایسه، بعد از بررسی طبیعی بودن توزیع متغیرهای پیوسته از آزمون  $t$  استفاده شد.

دمای  $37^\circ\text{C}$  انکوبه شد. سپس، به میزان آنزیم DNase اضافه شده، EDTA به آن اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای  $65^\circ\text{C}$  قرار داده شد تا آنزیم DNase غیر فعال شود. برای تعیین کمیت RNA قبل و بعد از تیمار و حذف آلودگی DNA از اسپکتروفوتومتری استفاده شد. بدین منظور ۲ میکرولیتر از نمونه را با ۹۸ میکرولیتر آب DEPC در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر خوانده شد.

ژل آگارز ۱٪ با بافر TAE ساخته شد و نمونه‌های قبل و بعد از تیمار با DNase روی ژل برده شد و به مدت نیم ساعت با ولتاژ ۱۰۰ الکتروفورز شد تا کیفیت RNA مورد استفاده برای ساخت cDNA تأیید شود. حضور باندهای ۱۸S و ۲۸S rRNA مبنی بر سالم بودن RNA تام استخراج شده بود.

#### تولید cDNA

برای تولید cDNA از کیت Takara استفاده شد. cDNA ( $50 \text{ ng}/\text{ml}$ ) با استفاده از ۱ میکروگرم RNA تام استخراج شده،  $1 \mu\text{l}$  از پرایمر random hexamer و آب DEPC به حجم نهایی به  $10 \mu\text{l}$  رسید. سپس به مدت پنج دقیقه در دمای  $70^\circ\text{C}$  درجه سانتیگراد انکوبه شد. چهار میکرولیتر ( $5 \times$ ) reaction buffer، ۱ میکرولیتر ( $20 \text{ u}/\mu\text{l}$ ) Ribonuclease inhibitor، ۲ میکرولیتر ( $10 \text{ mM}$ ) dNTP mix، ۱ میکروگرم آنزیم ( $200 \text{ u}/\mu\text{l}$ ) و آب DEPC به آن اضافه شد تا به حجم ۲۰ میکرولیتر رسید، این مخلوط به مدت پنج دقیقه در  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتیگراد، ۱۰ دقیقه در دمای  $25^\circ\text{C}$  درجه سانتیگراد، یک ساعت در دمای  $42^\circ\text{C}$  درجه سانتیگراد، ۱۰ دقیقه در  $70^\circ\text{C}$  درجه سانتیگراد انکوبه شد.

#### Real-Time PCR

برای بررسی بیان ژن‌های تولیدکننده‌ی HA (HAS1، HAS2، HAS3) و ژن‌های تخریب‌کننده آن (HYAL1 و HYAL2) از پرایمرهای جدول ۱ استفاده

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای استفاده شده برای real-time PCR

نام ژن	سمت	توالی پرایمر	کد ژن
HAS1	Forward	5'-GGAATAACCTCTTGCAGCAGTTTC-3'	NM_001523.2
	Reverse	5'-GCCGGTCATCCCCAAAAG-3'	
HAS 2	Forward	5'-TCGCAACACGTAACGCAAT-3'	NM_005328.2
	Reverse	5'-ACTTCTCTTTTCCACCCCATTT-3'	
HAS 3	Forward	5'-AACAAAGTACGACTCATGGATTTCCT-3'	NM_001199280.1
	Reverse	5'-GCCCGCTCCACGTTGA-3'	
HYAL1	Forward	5'-GATGTCAGTGTCTTCGATGTGGTA-3'	NM_007312.3
	Reverse	5'-GGGAGCTATAGAAAATTGTCATGTCA-3'	
HYAL2	Forward	5'-CTAATGAGGGTTTTGTGAACCAGAATAT-3'	NM_033158.4
	Reverse	5'-GCAGAATCGAAGCGTGGATAC-3'	
GAPDH	Forward	5'-CCCATGTTTCGTCATGGGTGT-3'	NM_002046
	Reverse	5'-TGGTCATGAGTCCTTCCACGATA-3'	

## یافته‌ها

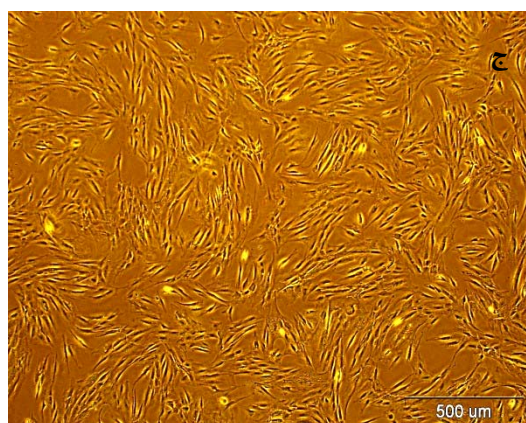
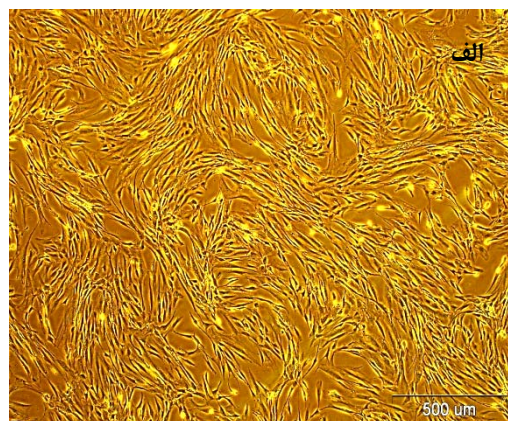
### جداسازی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی از نمونه‌های لیپوساکشن

برای حذف تأثیر ویژگی‌های فردی و تفاوت‌های ژنتیکی افراد در عملکرد سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداشده از بافت چربی، نمونه‌ها از سه فرد بزرگسال زن ۳۰، ۲۹ و ۳۵ ساله با استفاده از روش لیپوساکشن گرفته شد. نمونه‌های به‌دست‌آمده از هر فرد به‌طور متوسط ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌لیتر بود که این بافت شامل خون و مواد تزریقی در حین جراحی نیز بود. نمونه‌های چربی جمع‌آوری شده تحت شرایط استریل، روی یخ و در کوتاهترین فاصله‌ی زمانی به آزمایشگاه آورده شدند و بعد از شستشوی آن به‌منظور حذف ناخالصی‌ها، سلول‌های (processed lipoaspirated [PLA]) آن جدا شدند. سلول‌های PLA اولین سلول‌هایی هستند که بلافاصله بعد از هضم آنزیمی و بدون هیچ گسترشی در ظرف پلاستیکی یا کشت به‌دست می‌آیند که تقریباً جمعیتی برابر با  $1.0 \times 10^5 \pm 2$  سلول در هر میلی‌لیتر بافت چربی را تشکیل دادند. سلول‌های ADSC بعد از گذشت یک هفته از کشت سلول‌های PLA به کف ظرف کشت چسبیدند و قابل شناسایی و تشخیص از

سایر سلول‌های موجود بودند. بعد از یک هفته با تعویض محیط سلول‌ها، ناخالصی‌ها از ظرف کشت حذف شد و تنها سلول‌های چسبیده به کف ظرف که ADSC‌ها بودند به جای ماندند. این سلول‌ها پس از پر کردن کف فلاسک خود پاساژ داده شدند تا به تعداد لازم برای استفاده در مراحل بعدی تحقیق برسند. سلول‌های ADSC همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است همگی از نظر مورفولوژی شبیه سلول‌های فیبروبلاست بودند یعنی سلول‌هایی دوکی شکل و کشیده که این خصوصیت معمول سلول‌های مزانشیم می‌باشد.

### مشخصات فلوسایتومتری سلول‌های ADSC

در این قسمت بیان‌گیرنده‌های سلول‌های بنیادی مزانشیم و خون‌ساز با استفاده از آنتی‌بادی‌های مربوطه در ADSC‌های پاساژ ۳ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از فلوسایتومتری نشان داد که سلول‌های جداشده از بافت چربی شاخص‌های سطحی CD73، CD105، CD90، CD44 را که مربوط به سلول‌های مزانشیمی هستند را بیان کرده و شاخص‌های سطحی CD45/34 را که مربوط به سلول‌های بنیادی خون‌ساز هستند را بیان نمی‌کنند.



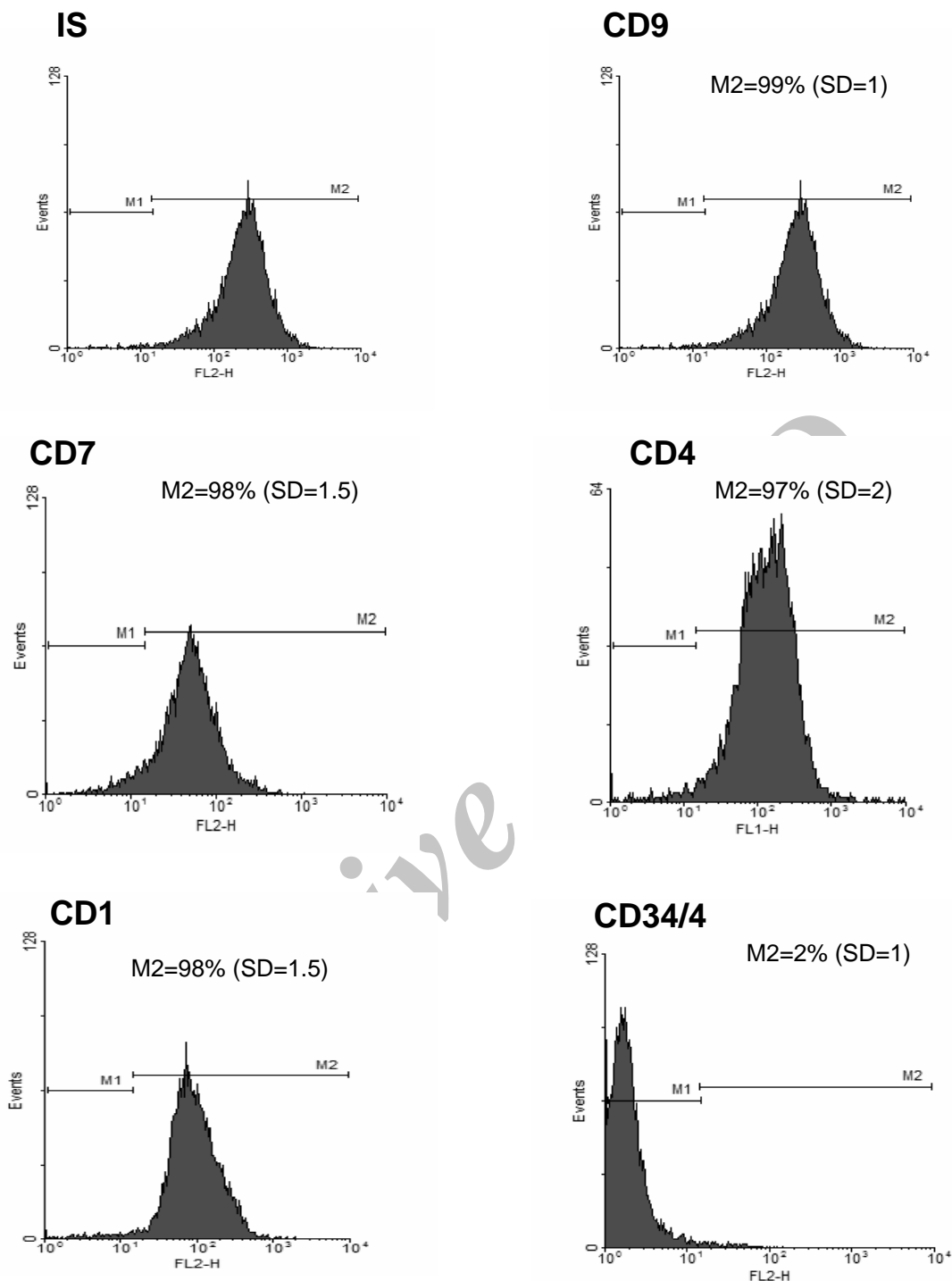
شکل ۱: تصویر میکروسکوپی سلول‌های مزانشیم مشتق از بافت چربی در پاساژ ۳. الف) نمونه‌ی بیمار اول، ب) نمونه‌ی بیمار دوم، ج) نمونه‌ی بیمار سوم.

قرار گیرد. کشت تمایز به استخوان هر روز با میکروسکوپ معکوس مشاهده شد. اولین نشانه‌های تغییرات مورفولوژی و تمایز به استخوان ۵ روز پس از القای تمایز مشاهده گردید. بدین ترتیب که در مناطقی از تک‌لایه سلولی، توده‌های سلولی تشکیل و به تدریج بزرگ‌تر شد. در پایان دوره کشت تمایز (۱۰ روز پس از کشت) توده‌های سلولی از نظر ترشح ماتریکس معدنی با روش آلیزارین قرمز ارزیابی شدند که حاصل آن قرمز شدن توده‌های مذکور بود. در کشت کنترل که سلول‌ها در معرض محیط معمولی فاقد مواد القاکننده‌ی تمایز به استخوان قرار داشتند، توده‌های سلولی تشکیل نشد و این کشت با آلیزارین قرمز رنگ نشد. بنابراین، نتایج کشت ۱۰

در شکل ۲ یک نمونه از نتایج فلوسایتومتری نشان داده شده است. برای حصول اطمینان از داده‌های فلوسایتومتری از هر نمونه سلول مقدار ۱۰۰/۰۰۰ سلول برای هر مارکر سطحی به صورت تکرار سه تایی بررسی شد. در همه‌ی نمونه‌ها مارکرهای چسبنده به میزان  $99 \pm 1$  درصد بیان شده و مارکرهای سطحی خون ساز با دارا بودن بیانی مساوی  $1 \pm 1$  فاقد بیان به حساب آمدند.

#### تمایز سلول‌های ADSC به استخوان و چربی

علاوه بر شاخص‌های سطحی، در بررسی سلول‌های بنیادی لازم است که قدرت تمایز این سلول‌ها به رده‌های استخوان و چربی و یا غضروف مورد ارزیابی



شکل ۲: نتایج فلوسایتومتری سلول‌های جدا شده از بافت چربی به صورت هیستوگرام. مقادیر ذکر شده در خصوص درصد هر یک از شاخص‌ها حاصل تکرارهای صورت گرفته بوده و به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار آورده شده است.

کلسیم را در خود ذخیره نمایند که این مهم با رنگ‌آمیزی آلیزارین در شکل ۳ نشان داده شده است.

روزه برای تمایز به استخوان در سلول‌های جدا شده از بافت چربی نشان می‌دهد که این سلول‌ها قادرند یون



اندکی از این سلول‌ها از درم جدا شوند، این توانایی را دارند که سریع کف ظرف کشت خود را پر کنند و نیز هنگامی که کف ظرف کشت خود را پر کردند این سلول‌ها ۱ به ۳ پاساژ داده شدند. تصویر میکروسکوپی هر یک از نمونه‌ها به همراه مشخصات (جنس - سن) آن‌ها در شکل ۵ آمده است.

### تکثیر سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان در ADSC-CM

برای بررسی تاثیر محیط کشت رویی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی، سلول‌های مزانشیمی ابتدا با میتومايسين تیمار شدند و سپس برای گرفتن محیط رویی سلول‌ها به تعداد یکسان تقسیم و کشت داده شدند و ۷۲ ساعت بعد از کشت، محیط رویی جمع شد پس از سانتریفیوژ کردن جهت جداسازی سلول‌های مرده و استریل کردن آن با فیلتر ۰/۲ میکرون سلول‌های فیبروبلاست جدا شده از نمونه‌های انسانی با غلظت ۱۰۰٪ محیط رویی به دست آمده کشت داده شدند. هر یک از شش نمونه‌ی پوست انسان در هر سه محیط ADSC-CM حاصل کشت داده شد. بنابراین ۱۸ نمونه‌ی تیمار شده به دست آمد. برای هر یک از سلول‌های فیبروبلاست یک نمونه به عنوان کنترل در محیط DMEM/F12 کامل کشت داده شد. بعد از ۲۴ ساعت سلول‌های ۲۴ نمونه‌ی موجود برای بررسی تفاوت بین نمونه‌های تیمار شده و کنترل جمع‌آوری شدند.

### بررسی بیان ژن‌های هیالورونیک در سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان (HDF) پس از کشت در ADSC-CM

RNA تام سلول‌های ۲۴ نمونه‌ی ذکر شده‌ی فوق، استخراج شدند. میزان RNA استخراج شده و خلوص آن به کمک اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری شد و در تمام نمونه‌ها میزان نسبت جذب نور ۲۶۰/۲۸۰ حدوداً ۱/۸ به دست آمد که نمایانگر خلوص بالای RNA استخراج شده است. جهت بررسی کیفیت RNA تام

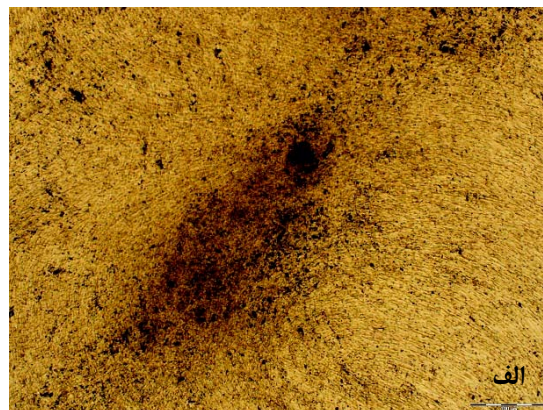
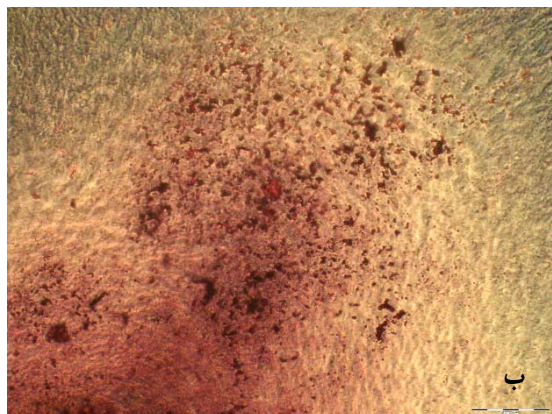
اولین قطرات چربی ۱۰ روز پس از آغاز کشت در برخی از سلول‌ها مشاهده شد. این قطرات به تدریج در سایر سلول‌ها نیز ظاهر شد، به طوری که در پایان ۲۰ روز، اغلب سلول‌ها حاوی قطرات چربی بودند در مقابل در سلول‌های گروه شاهد که به مدت ۲۰ روز در محیط فاقد القاء‌کننده بودند، قطره چربی تشکیل نشد. در نتیجه قدرت تمایز این سلول‌ها به بافت چربی نیز ۲۰ روز بعد از کشت در محیط تمایزی با مشاهده قطرات چربی توسط رنگ‌آمیزی Oil Red اثبات شد (شکل ۴).

### جداسازی سلول‌های فیبروبلاست پوست

بعد از اخذ رضایت‌نامه از شش فرد نمونه بیوپسی به ابعاد حدوداً ۱×۲ سانتی‌متر از پوست گرفته شد و پس از جداسازی درم از اپی‌درم، لایه‌ی درم با آنزیم کلاژناز نوع I هضم شد تا سلول‌های فیبروبلاست آن از لایه درم جدا شده و کشت داده شود. سلول‌های فیبروبلاست معمولاً پس از چند ساعت به کف ظرف کشت پلاستیکی خود می‌چسبند ولی در کشت اولیه تا سه روز به سلول‌ها زمان داده شد.

سپس محیط آن‌ها تعویض شد تا ناخالصی‌ها از محیط حذف شود. سلول‌های کراتینوسیت نیز از جمله سلول‌های چسبنده به ظرف کشت پلاستیکی هستند و در کشت اولیه و تا اندازه‌ای در پاساژ اول ناخالصی کراتینوسیت دیده شد. کراتینوسیت‌ها به صورت کلونی‌هایی موزاییک مانند با اندازه‌ای کوچک، از سلول‌های دوکی شکل و کشیده‌ی فیبروبلاست‌ها یا کلونی‌های فیبروبلاست‌ها که سلول از آن‌ها به بیرون مهاجرت می‌کند، قابل تفکیک بودند.

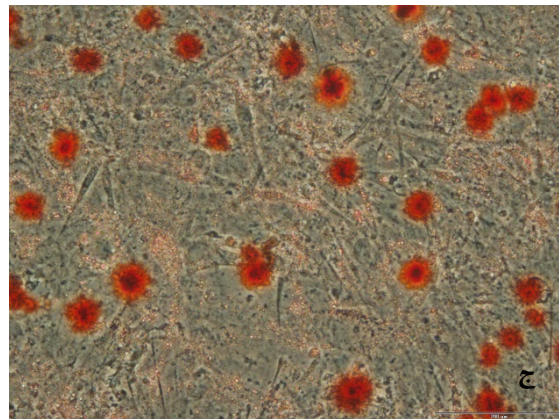
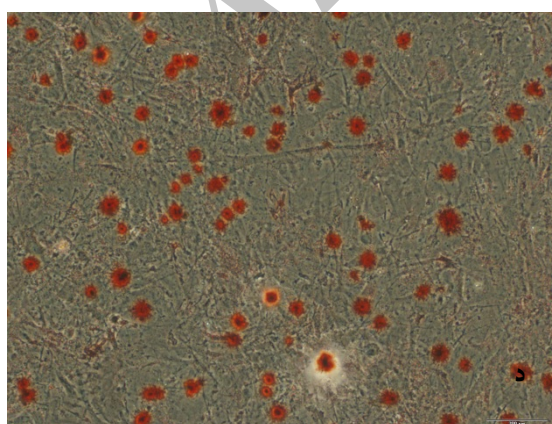
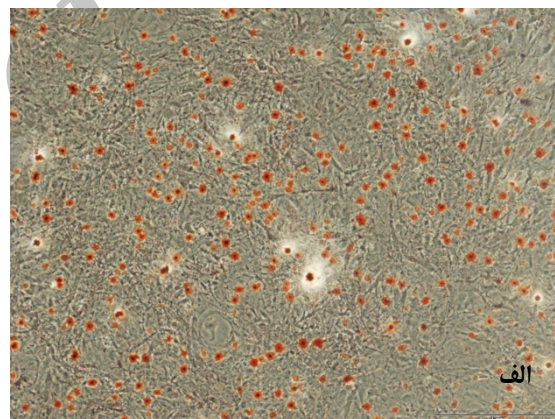
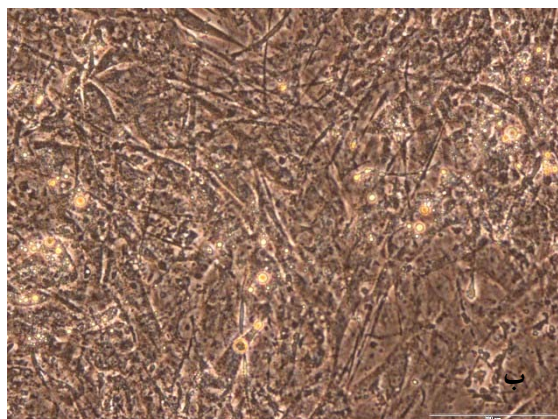
اتصال‌های کراتینوسیت‌ها به کف ظرف پلاستیکی بسیار محکمتر از اتصال فیبروبلاست‌ها می‌باشد، بنابراین این در پاساژ‌های بعدی به دلیل کنده نشدن کراتینوسیت‌ها از ظرف کشت قبلی و انتقال فیبروبلاست‌های کنده شده به ظرف دیگر این ناخالصی رفع شد. به دلیل توانایی بسیار زیاد سلول‌های فیبروبلاست در رشد و تکثیر، حتی اگر تعداد بسیار



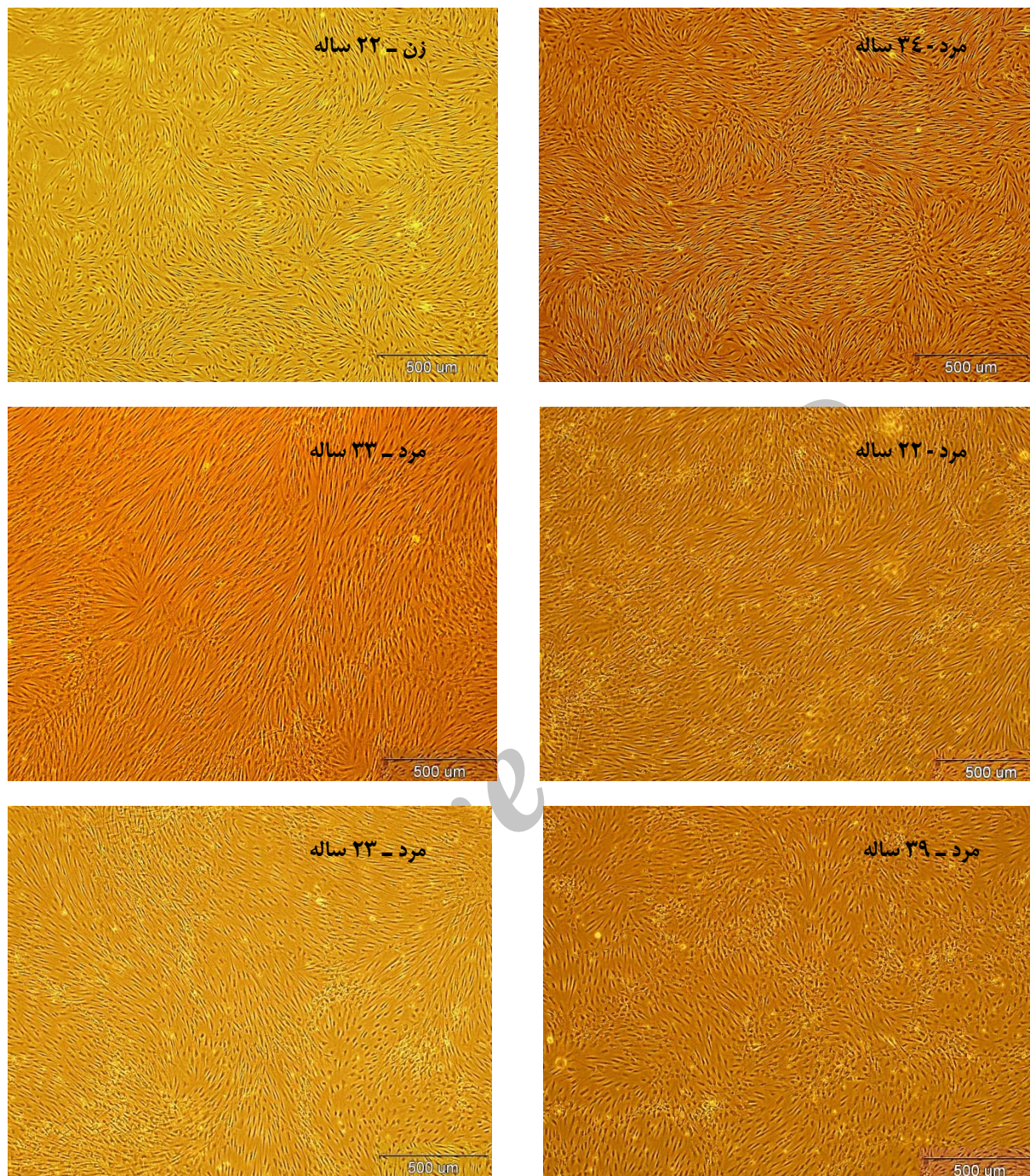
شکل ۳: تصویر میکروسکوپی سلول‌های ADSC تمایز یافته به استخوان. الف) تصویر قبل از رنگ آمیزی با آلیزارین قرمز. ب) تصویر بعد از رنگ آمیزی با آلیزارین قرمز.

۲۸ S تأیید کیفیت خوب RNA استخراج شده هستند. برای تولید cDNA از یک میکروگرم RNA تام استفاده شد و Real-Time PCR هر نمونه به صورت

استخراج شده، به میزان ۰/۵ میکروگرم روی ژل ۱/۲٪ الکتروفورز شد. مثالی از RNA روی ژل برده شده در شکل ۶ آمده است که کیفیت باندها ۱۸ S و



شکل ۴: تصویر میکروسکوپی سلول‌های ADSC تمایز یافته به چربی. الف) تصویر قبل از رنگ آمیزی. ب) تصویر بعد از رنگ آمیزی با oil red. ج و د) تصویر بعد از رنگ آمیزی با oil red با بزرگ‌نمایی‌های بیشتر.



شکل ۵: تصویر میکروسکوپی سلول‌های فیبروبلاست جدا شده از بیوپسی پوست انسان.

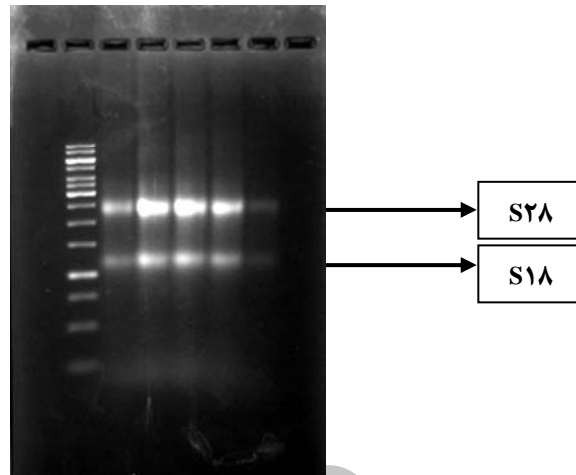
سپس  $\Delta\Delta Ct$  آن‌ها با کم کردن  $\Delta Ct$  هر نمونه از  $\Delta Ct$  کنترل آن به دست آمد. بیان هر یک از ژن‌ها در نمونه‌ها با استفاده از  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  اندازه‌گیری شد. میانگین بیان ژن‌ها محاسبه شد و با استفاده از برنامه‌ی Excel نمودار بیان ژن‌ها که به‌طور خلاصه در شکل ۷ نشان

تکرارهای دوتایی، برای هر یک از ژن‌ها گذاشته شد و میانگین  $Ct$  آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. دلتا هر یک از نمونه‌ها با کم کردن میانگین آن‌ها از میانگین  $Ct$  GAPDH آن به دست آمد که به اصطلاح در این مرحله  $Ct$  نمونه‌ها نرمال شد.

همان‌طور که در شکل ۷ نمایان است. از سه ژن تولیدکننده‌ی HAS1، HAS2 و HAS3 بیان دو ژن HAS1 و HAS2 در نمونه‌های تیمار شده با ADSC-CM افزایش یافته که این افزایش به ترتیب (میانگین  $\pm$  انحراف معیار)  $2/60 \pm 0/25$  و  $1/76 \pm 0/25$  با  $P < 0/001$  بود و در HAS3 افزایش معنی‌داری مشاهده نشد. ژن HYAL2 به‌عنوان یک ژن بیان‌کننده‌ی هیالورونیداز در نمونه‌های تیمار شده کاهش یافته بود  $0/82 \pm 0/08$  برابر گروه کنترل و  $P = 0/02$ . هرچند که بیان ژن HYAL1 تفاوت محسوسی بین گروه تیمار شده و کنترل نداشت  $1/23 \pm 0/42$  و  $P > 0/4$ .

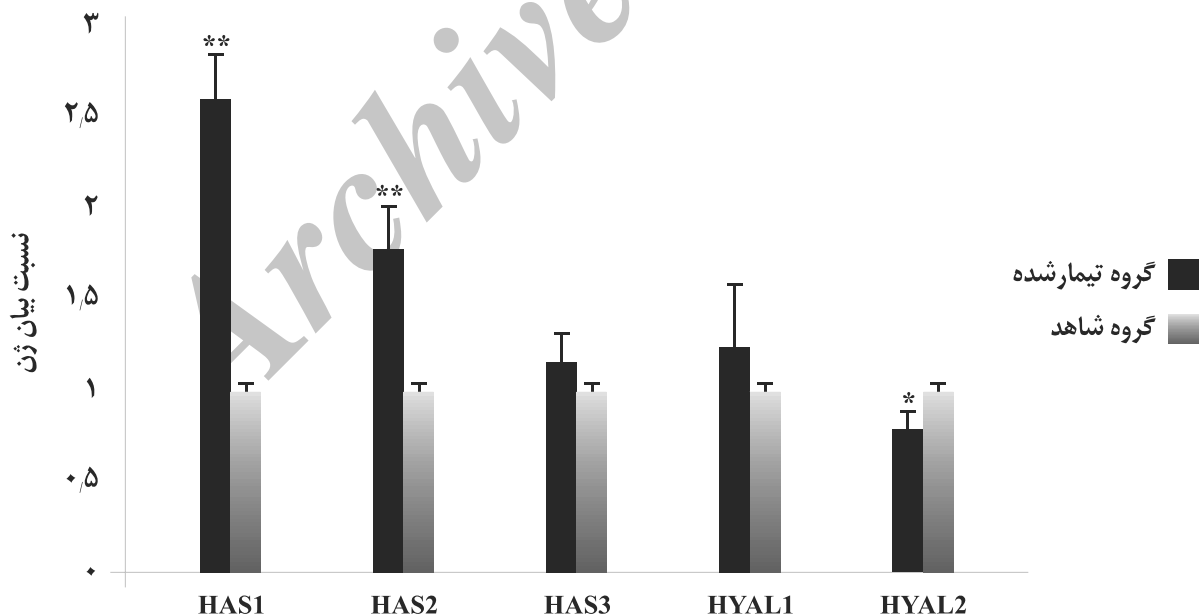
#### میزان ترشح اسید هیالورونیک

برای اندازه‌گیری میزان ترشح اسید هیالورونیک از سلول‌های پوست انسان، از کیت الیزا k-1200 (Echelon Bioscience Inc.) استفاده شد. این کیت



شکل ۶: الکتروفورز RNA تام استخراج شده از سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان. الکتروفورز آن بر روی ژل ۱/۲٪ انجام شد. محل RNAهای ریبوزومی ۲۸ S و ۱۸ S نشان داده شده است.

داده شده است، رسم شد. با استفاده از نرم‌افزار SPSS، آزمون *t* انجام شد تا معنی‌داری آن‌ها مشخص شود.



شکل ۷: نمودار نمایش‌دهنده‌ی نسبت بیان سه ژن تولیدکننده‌ی HAS1، HAS2 و HAS3 و دو ژن تخریب‌کننده‌ی HA، HYAL1 و HYAL2 در نمونه‌های تیمار شده و کنترل. \* به معنای داشتن  $P < 0/05$  است. \*\* به معنای داشتن  $P < 0/01$  است.

آلکالین فسفاتاز واکنش داد و ایجاد رنگ زرد رنگی کرد که در جذب نور ۴۰۵ نانومتر خوانده شد. بنابراین هر چه که غلظت HA موجود در نمونه‌ها بیشتر بود پروتئین کمتری باقی ماند تا به HA متصل به پلیت اتصال یابد و در نهایت رنگ کمتری تولید کرد و جذب کمتری داشت.

میانگین ترشح HA در نمونه‌های تیمار شده و شاهد محاسبه و نمودار آن رسم شد (شکل ۸). با استفاده از نرم‌افزار SPSS، آزمون  $t$  انجام شد تا معنی‌داری آن‌ها مشخص شود. همان‌طور که در شکل ۸ نمایان است. ترشح HA نمونه‌های تیمار شده با ADSC-CM در مقایسه با گروه کنترل به‌طور محسوسی افزایش یافته که این افزایش  $3/96 \pm 0/39$  برابر گروه کنترل با  $P < 0/0001$  بود.

## بحث

در این تحقیق سلول‌های ADSC از سه نمونه‌ی بافت چربی حاصل از جراحی لیپوساکشن جدا شد. با انجام فلوسایتومتری مشخص شد که این سلول‌ها شاخص‌های سطحی مهم سلول‌های مزانشیم که شامل CD90، CD44، CD73، CD105 را بیان می‌کنند و شاخص‌های سطحی سلول‌های خون ساز مانند CD45/34 را بیان نمی‌کنند. به این وسیله مزانشیم بودن این سلول‌ها به اثبات رسید. با تمایز یافتن این سلول‌ها به استخوان و چربی چند توان بودن این سلول‌ها نیز به اثبات رسید.

سلول‌های مزانشیم انسانی در حقیقت سلول‌هایی هستند که بر اساس تعریف انجمن بین‌المللی سلول درمانی (International Society for Cellular Therapy [ISCT]) دارای سه ویژگی باشند، که آن‌ها عبارتند از:

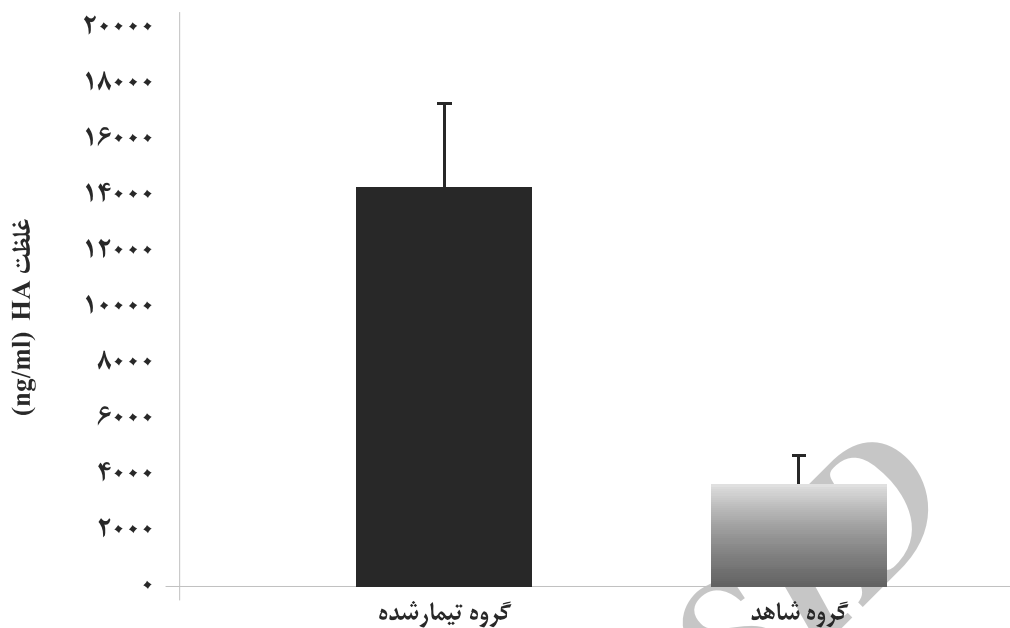
۱. در شرایط کشت معمولی در ظرف کشت پلاستیکی به کف ظرف بچسبند.
۲. شاخص‌های سطحی CD90، CD73، CD105.

توانایی شناسایی غلظت HA را فقط در بازه‌ی ۱۶۰۰ تا ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر دارد. برای حصول اطمینان از این که نمونه‌ها در این بازه‌ی غلظت هستند در ابتدا یک نمونه‌ی محیط رویی سلول‌های فیبروبلاست کشت داده شده در ADSC-CM با رقت‌های ۱، یک‌دوم، یک‌چهارم، یک‌هشتم، یک‌دهم، یک‌بیستم، یک‌پنجاهم، یک‌صدم و با استانداردهای مخصوص کیت که غلظت‌های ۱۶۰۰، ۸۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰ و ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر را داشتند سنجیده شدند. سپس مشخص شد که غلظت ۱/۲۰ از محیط رویی سلول‌های فیبروبلاست با دارا بودن غلظت متوسط ۴۰۰ ng/ml HA، دارای غلظت مناسبی برای سنجش آن با این کیت است. بنابر این همه‌ی نمونه‌ها ۲۰ برابر رقیق شدند تا غلظت آن‌ها برای کیت قابل تشخیص باشد.

بعد از این که رقیق شدن نمونه‌ها، هر نمونه و استانداردهای کیت به‌صورت تکرار دوتایی در خانه‌های مربوطه در کیت گذاشته شده و در نهایت با استفاده از دستگاه الیزا شرکت Thermo Scientific به‌نام micro plate reader و مدل multi scanner غلظت آن‌ها اندازه‌گیری شد.

نحوه‌ی شناسایی غلظت HA در این کیت بر اساس معکوس میزان جذب نور خوانده شده است. نمونه‌ها در پلیت جداگانه‌ای با پروتئین‌های متصل شونده به HA مخلوط می‌شدند. این مخلوط به پلیتی که در کف آن HA متصل است انتقال یافت. هر آن‌چه از پروتئین‌های متصل شونده که به نمونه اتصال نیافته به آن متصل شد. با شستشو HA موجود در نمونه‌ی اضافه شده و پروتئین‌های متصل به آن از پلیت حذف شد و آن‌چه باقی ماند HA متصل به کف پلیت و پروتئین‌های اتصال‌یافته به آن بود.

سپس آنتی‌بادی کونژوگه به آلکالین فسفاتاز اضافه شد که آن‌ها به پروتئین‌های متصل به HA کف پلیت اتصال یافتند و بعد سوپسترا (p-nitrophenyl phosphate) اضافه شد که آن با آنتی‌بادی کونژوگه به



شکل ۸: نمودار میزان ترشح HA. میانگین ترشح HA در گروه تیمار شده،  $3/96 \pm 0/39$  برابر گروه شاهد است با دارا بودن  $P=0/0001$

اثر هر کدام از ADSC-CM ها به صورت مستقل بر روی شش نمونه‌ی فیبروبلاست بررسی شد. دلیل استفاده از نمونه‌های متعدد و بررسی آن‌ها به صورت مجزا این است که تأثیر تفاوت‌های فردی در آزمایش حذف شود. این تأثیر با بهره‌گیری از quantitative real time PCR روی ۱۸ نمونه‌ی تیمار شده و ۶ نمونه‌ی کنترل بررسی شد و نشان داد که بعد از ۲۴ ساعت بیان ژن HAS1 و HAS2 به میزان معنی‌داری در این سلول‌ها نسبت به گروه شاهد که در محیط DMEM/F12 کامل کشت داده شده بودند افزایش پیدا کرده است این افزایش به ترتیب  $2/60 \pm 0/25$  و  $1/76 \pm 0/25$  با  $P < 0/001$  بود. این افزایش می‌تواند به دلیل وجود فاکتورهای رشد موجود در محیط رویی سلول‌های ADSC مانند PDGF، PIGF، FGF، 2، KGF، TGF- $\beta$ 1، HGF، VEGF باشد.

ژن HAS1 عضوی از خانواده‌ی ژنی در مهره‌داران است که آنزیم تولیدکننده‌ی مشهور HA را کد می‌کند و آمینواسیدهای آن با محصول ژن hasA در

CD44 را بیان کنند و نسبت به بیان شاخص‌های هماتوپویتیک بلاخص CD34، CD45 منفی باشند.

۳. می‌بایست توانایی تمایز به سلول‌های چربی، استخوان و یا غضروف را در شرایط آزمایشگاهی داشته باشند.<sup>۷</sup>

برای گرفتن ADSC-CM از سلول‌های پاساژ چهار استفاده شد. از سلول‌های پاساژ پایین‌تر استفاده نشد زیرا سلول‌ها به تعداد مورد نظر نرسیده بودند و از سلول‌های پاساژ بالاتر استفاده نشد زیرا تحقیقات نشان داده است که سلول‌های بنیادی پس از پاساژهای متوالی کم کم خاصیت بنیادی بودن خود مانند چند توان بودن و بوجود آوردن سلول‌های بنیادی با شرایط یکسان را از دست می‌دهند. سلول‌های بنیادی بعد از وارد شدن به پاساژ پنجم یا ششم سرعت بسیار کمتری برای رشد و تکثیر و تمایز از خود نشان می‌دهند. این مهم با تفاوت در بیان یک سری پروتئین‌ها قبل و بعد از پاساژ ۴ به اثبات رسیده است.<sup>۸</sup>

این mRNA با شماره‌ی NM\_033158 در بانک اطلاعاتی NCBI دارای ۲۴۱۳ جفت باز است که بر روی کروموزوم 3p21.3 واقع شده و دارای ۴ اگزون است که ساختار اگزون - اینترون آن در موش و انسان یکسان است.

اگرچه هریک از پروتئین‌های HAS در سلول‌های یوکاریوتی توانایی تولید HA را دارند ولی ویژگی‌های آن‌ها با یکدیگر متفاوت است. این ویژگی متفاوت آنزیمی ممکن است به دلیل عمل کردهای متفاوت فیزیولوژیکی باشد. ژن HAS3 به خودی خود از نظر واکنش کاتالیکی از HAS2 فعال‌تر است که آن هم از HAS1 فعال‌تر است. بعلاوه، بررسی اندازه‌ی محصول HA هر یک از پروتئین‌های HAS در *in vivo* نشان داده است که طول زنجیره‌ی HA به نوعی با میزان بیان پروتئین خاصی از HAS تعیین می‌شود. پروتئین‌های HAS1، HAS2، HA با طول یکسانی را پلیمر می‌کنند (تا  $2 \times 10^6$  دالتون)، در حالی که HAS3 زنجیره‌ی بسیار کوتاهتری را پلیمر می‌کند، در محدوده‌ی  $2 \times 10^5$  تا  $3 \times 10^5$  دالتون. زنجیره‌های HA با طول متفاوت تأثیرهای متفاوتی بر روی رفتار سلول دارند. HA با وزن مولکولی بالا فضا پرکن است که باعث آبدهی بافت می‌شود و مانع رگزایی می‌شود. این پلیمرها هم‌چنین مانع التهاب هستند و کاهنده‌ی سیستم ایمنی می‌باشند. این تا قسمتی به دلیل پلیمرهای فاصله پرکن است که مانع دسترسی لیگاندها به گیرنده‌های سطحی سلول می‌شود.<sup>۷</sup>

در این تحقیق نشان داده شد که ADSC-CM باعث افزایش بیان ژن‌های HAS1، HAS2 می‌شود که در نتیجه منجر به افزایش تولید HA با وزن مولکولی بالا می‌شوند که خصوصیت‌های ذکر شده را دارد. از طرف دیگر با کاهش تولید هیالورونیداز مانع تخریب آن‌ها به رشته‌های کوچکتر می‌شود.

در کل افزایش بیان ژن تولیدکننده و کاهش بیان ژن تخریب‌کننده‌ی HA باعث افزایش تجمع HA در

استریتوکوکوس پیوجنس، یک تولیدکننده گلیکوزآمینوگلیکان (DG42) از زئوپوس لائویس و یک تولیدکننده‌ی HA به‌تازگی مشخص‌شده‌ی موشی، هومولوژی زیادی نشان می‌دهد.<sup>۹</sup>

HAS1 mRNA با شماره NM\_001523 در بانک اطلاعاتی NCBI دارای ۲۱۱۶ جفت باز است که روی کروموزوم 19q13.4 واقع است و دارای ۵ اگزون است که جایگاه شروع ترجمه به فاصله ۹ جفت باز از انتهای ۳ اگزون ۱ شروع می‌شود. سطح mRNA HAS معمولاً مسئول سرعت تولید HA است. بنابراین افزایش بیان HAS می‌تواند به تجمع HA در بافت کمک کند. از آنجایی که در تحقیق‌ها نشان داده شده است که TGF- $\beta$  می‌تواند میزان بیان HAS1 را افزایش دهد، افزایش آن در این آزمایش می‌تواند به دلیل وجود فاکتورهای رشدی مثل TGF- $\beta$  در ADSC-CM باشد.<sup>۹</sup> همان‌طور که سلول‌های جداشده از بافت چربی افراد مختلف با جنسیت، سن و ناحیه‌های مختلف متفاوت است، محیط روبی آن‌ها و میزان فاکتورهای رشد موجود در آن نیز می‌تواند متفاوت باشد و تأثیر متفاوتی بر میزان افزایش بیان ژن‌های تولیدکننده‌ی HA بگذارد. این محیط بعد از ۲۴ ساعت بر روی بیان ژن‌های HAS3 که کدکننده‌ی دیگر تولیدکننده‌ی HA هستند و یک ژن تخریب‌کننده‌ی آن به‌نام HYAL1 اثر معنی‌داری نداشت.

میزان بیان یکی از ژن‌های کدکننده‌ی هیالورونیداز به نام HYAL2 که تخریب‌کننده‌ی HA است به مقدار معنی‌داری کاهش پیدا کرد ( $0.8 \pm 0.08$ ) برابر گروه کنترل و  $P=0.02$ ). این کاهش می‌تواند سرعت تخریب HA تولیدشده را بکاهد. از سوی دیگر با اندازه‌گیری میزان ترشح HA از سلول‌ها این امر ثابت شد افزایش در دو ژن تولیدکننده و کاهش در یک ژن تخریب‌کننده در نهایت منجر به افزایش ترشح HA در نمونه‌های تیمار شده ( $39 \pm 3.96$ ) برابر با  $P < 0.001$  نسبت به گروه شاهد شد.

تمام مراحلش (چند هفته)، در حضور مقدار زیادی HA اتفاق می‌افتد، در حالی که در پوست افراد بزرگسال، افزایش HA در ۲ تا ۴ روز به قله‌ی خود رسیده و سپس به شدت افت می‌کند. تحقیق‌ها نشان داده است که HA برای بازسازی در دوران جنینی نقش حیاتی را ایفا می‌کند. بنابراین تلاش برای افزایش HA در محل جراحی اثر سودمندی دارد.<sup>۷</sup> علاوه بر مزایای ADSC-CM که در تحقیقات قبلی نشان داده شده است از قبیل افزایش بیان و ترشح Col I، Col III و Fn در سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان<sup>۸</sup>، اثر آن در افزایش HA نیز در این تحقیق به اثبات رسید که این مزیتی دیگر و تأیید بیشتر اثر مفید ADSC-CM در ترمیم جراحی می‌باشد.

بافت می‌شود که این به حفظ رطوبت پوست کمک کرده و نه تنها باعث بهبود ترمیم بافت آسیب دیده می‌شود بلکه به ترمیم بدون برجای ماندن اثر جای زخم (scar) نیز کمک می‌کند.

HA، از طریق اثر بر روی سلول‌های التهابی و قسمتی از مرحله‌ی ترمیم یعنی تکثیر، مهاجرت و تمایز سلول‌ها، ترمیم را بهبود می‌بخشد. هم‌چنین نقش اصلی آن که حفظ رطوبت پوست است اثر مثبتی بر ترمیم پوست دارد.

بنابر گزارش‌ها و تحقیقات، ترمیم پوست جنین از نوعی است که جای اثر زخم در آن برجای نمی‌ماند که می‌توان نتیجه گرفت که این ترمیم از نوع شبه بازسازی (regenerative-like) است. این نوع ترمیم در

## References

1. Singer A J, Simon M. Wound healing and skin substitutes. In: Battler A, Leor J, (eds.). Stem cell and gene-based therapy: frontiers in regenerative medicine. 1st ed. United States of America: Springer; 2006. p. 372-5.
2. Alberts BR Johnson A, Lewis J, et al. Molecular biology of the cell. 4th ed. New York: Garland Science; 2002.
3. Lodish HBA, Zipursky SL, Matsudaira P, et al. Integrating cells into tissues. Molecular Cell Biology. New York: NY: WH Freeman & Co; 2000. p. 968-1002.
4. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. N Engl J Med 2006; 355: 1210-21.
5. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, et al. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. Eur Heart J 2006; 27: 2775-83.
6. Kim WS, Park BS, Sung JH, et al. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. J Dermatol Sci 2007; 48: 15-24.
7. Park BS, Kim WS. Adipose-derived stem cells and their secretory factors for skin aging. In: Farage MA, Miller KW, Maibach HI, (eds.). Textbook of aging skin. Berlin: Springer; 2010. p. 201-12.
8. Perkel JM. Rites of (stem cell) passage. J Proteome Res 2009; 8: 2137.
9. Lee JY, Spicer AP. Hyaluronan: a multifunctional, megadalton, stealth molecule. Curr Opin Cell Biol 2000; 12: 581-6.



## Effects of adipose derived stem cell-conditioned medium (ADSC-CM) on synthesis and degradation of hyaluronic acid in human dermal fibroblasts

Mona Malekmohammadi, MSc<sup>1</sup>  
Hossein A. Tehrani, PhD<sup>1</sup>  
Nasser Aghdami, MD, PhD<sup>2</sup>

1. Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Tarbiat-Modarres University, Tehran, Iran.
2. Department of Stem Cells, Rooyan Research Institute, Tehran, Iran.

**Background and Aim:** Synthesis of extracellular matrix (ECM) is a key factor in wound healing. The predominant component of ECM is hyaluronic acid (HA). Recent studies have shown that adipose derived stem cell-conditioned medium (ADSC-CM) can increase the expression and synthesis of collagen I, III and fibronectin which are the components of ECM. The purpose of this study was to investigate the effects of ADSC-CM on the expression of HA synthase and degrading genes in human dermal fibroblasts (HDF).

**Methods:** ADSCs were isolated from three liposuction samples and their conditioned medium was collected. Skin biopsies were isolated from six patients and their fibroblasts were isolated. These cells were cultured in 100% of ADSC-CM. Expression of three HA synthase and two hyaluronidase genes were assessed with the use of real time PCR, with ELISA and final amounts of secreted HA were measured in the treated and control groups.

**Results:** Gene expression of two HA synthase genes HAS1 and HAS2 were upregulated in treated samples compared to the control group. The expression of one hyaluronidase gene, HYAL2, was downregulated in them. Final amount of HA was increased in the treated samples.

**Conclusion:** The expression and synthesis of HA can be increased by the stimulatory effect of growth factors present in ADSC-CM. Thus, secretomes of ADSCs could play a crucial role in wound healing by up-regulating the production of ECM's components in HDFs.

**Keywords:** extracellular matrix, human dermal fibroblast, adipose derived stem cell-conditioned medium, hyaluronic acid, wound healing

**Corresponding Author:**  
Hossein A. Tehrani, PhD

Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Jalale Al-e- Ahmad Avenue, Tehran, Iran. P.O.Box 14115-331  
Email: h.tehrani@modares.ac.ir

**Conflict of interest:** None to declare

Received: Nov 27, 2011      Accepted: Feb 13, 2012

Dermatology and Cosmetic 2012; 3 (1): 45-61