

## بررسی تأثیر فاکتورهای رشد $\beta$ -Transforming Growth Factor و Bone Morphogenetic Protein-6 بر روند تمایز کندروژنیک سلول‌های بنیادی مشتق از چربی بر داربست آلژینات

دکتر بقول هاشمی بنی<sup>۱</sup>، دکتر شهناز رضوی<sup>۲</sup>، دکتر ابراهیم اسفندیاری<sup>۳</sup>، دکتر سعید کرباسی<sup>۴</sup>، دکتر محمد مردانی<sup>۵</sup>، فرزانه صادقی<sup>۶</sup>، دکتر محمدحسین نصر اصفهانی<sup>۷</sup>، دکتر فاطمه نادعلی<sup>۸</sup>، دکتر حمید شفیع زاده<sup>۸</sup>

### خلاصه

**مقدمه:** آسیب‌های مفاصل و از جمله استئوآرتریت، در همه‌ی جوامع شیوع فراوانی دارند. به علاوه، غضروف مفصلی توانایی بسیار محدودی در ترمیم آسیب‌ها دارد. روش‌های درمان مختلف مورد استفاده جهت ترمیم آسیب‌های غضروفی منجر به تشکیل بافت فیبروز، آپوتوز و تخریب بیشتر غضروف می‌شوند. از این رو، طراحی بافت غضروفی از سلول‌های بنیادی ضروری به نظر می‌رسد. بر این اساس، هدف از تحقیق حاضر بررسی تأثیر فاکتورهای رشد BMP-6 و TGF- $\beta$ 3 بر روند تمایز کندروژنیک سلول‌های بنیادی مشتق از چربی بر داربست آلژینات بود.

**روش‌ها:** بافت چربی زیر جلدی انسانی تحت تأثیر آنزیم کلاژناز تجزیه شد و سلول‌های بنیادی جهت القای کندروژنز بر داربست آلژینات در محیط کشت کندروژنیک تحت تأثیر فاکتورهای رشد TGF- $\beta$ 3 و BMP-6 به مدت سه هفته کشت داده شد. نمونه‌های حاصل از تمایز با روش‌های هیستولوژیکی، ایمنوهیستوشیمی و RT-PCR از نظر ویژگی‌های غضروف مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** فاکتورهای رشد TGF- $\beta$ 3 و BMP-6 موجب القای کندروژنز در سلول‌های بنیادی مشتق از چربی بر داربست آلژینات شد. مطالعات ایمنوهیستوشیمی وجود آگریکان و کلاژن نوع II را در ماتریکس خارج سلولی نشان داد. بررسی با روش RT-PCR نیز وجود فنوتیپ کندروسیتی را تحت تأثیر القای کندروژنیک توسط فاکتورهای رشد TGF- $\beta$ 3 و BMP-6 تأیید کرد. همچنین وجود توأم فاکتورهای رشد TGF- $\beta$ 3 و BMP-6 موجب افزایش بیان آگریکان در مقایسه با به کار گیری هر یک از این فاکتورها به تنهایی گردید.

**نتیجه‌گیری:** از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که فاکتورهای رشد BMP-6 و TGF- $\beta$ 3 در داربست آلژینات، هر یک به تنهایی به عنوان القا کننده غضروف سازی عمل می‌کنند و به کار گیری هر دو فاکتور با هم بیان آگریکان را افزایش می‌دهد.

**واژگان کلیدی:** سلول‌های بنیادی مشتق از چربی، آلژینات، مهندسی بافت غضروف، BMP-6، TGF- $\beta$ 3.

### مقدمه

بر روی یکدیگر می‌باشد. به دلیل فقدان عروق خونی و تراکم سلولی پایین، غضروف توانایی محدودی در ترمیم آسیب‌ها دارد (۱-۲).

غضروف نوعی بافت همبند اختصاصی است که وظیفه‌ی اصلی آن ایجاد نرمی و راحتی لغزش مفاصل

<sup>۱</sup> استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

<sup>۲</sup> دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

<sup>۳</sup> استاد، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

<sup>۴</sup> استادیار، گروه فیزیک و مهندسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

<sup>۵</sup> کارشناس ارشد، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

<sup>۶</sup> دانشیار، مرکز تحقیقاتی علوم سلولی، پژوهشکده‌ی رویان اصفهان، اصفهان، ایران.

<sup>۷</sup> استادیار، گروه پاتولوژی و هماتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

<sup>۸</sup> پزشک عمومی، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر شهناز رضوی، دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

کافی به راحتی ممکن نیست (۱۲-۱۱، ۹). بنابراین به دلایل گوناگون، از جمله آسیب رسیدن به بافت غضروفی سالم در هنگام برداشت نمونه، محدودیت تکثیر کندروسیت‌های بالغ، تعداد اندک سلول‌های جداسازی شده و پدیده‌ی برگشت پذیری، دستیابی به منابع سلولی دیگر در جهت طراحی بافت غضروفی و درمان بیماری‌های این بافت ضروری است. لازم به ذکر است که پیوند اندام و بافت جهت درمان آسیب‌ها و بیماری‌ها راه حل ارزشمندی به نظر نمی‌رسد. همچنین ضرورت مصرف داروی سرکوبگر ایمنی به مقدار زیاد و به صورت مادام‌العمر توسط افراد گیرنده‌ی پیوند از عوامل محدود کننده در به کار گیری این روش محسوب می‌شود (۱۴-۱۳). به علاوه، استفاده از وسایل مکانیکی یا اعضای مصنوعی نیز به دلیل خطر ایجاد عفونت، انسداد جریان خون و دوام پایین، دارای محدودیت است؛ از این رو، مهندسی بافت، به عنوان روشی برای جایگزین کردن بافت آسیب دیده با بافت سالم مورد توجه قرار گرفته است. داربست مناسب، سلول زنده‌ی ترمیم کننده، عوامل فیزیکیوشیمیایی و فاکتورهای رشد، عوامل مورد نیاز جهت طراحی بافت محسوب می‌شوند (۱۶-۱۵).

بیومتریال‌ها در طراحی بافت اهمیت ویژه‌ای دارند و اکثر مطالعات نشان داده است که داربست‌های این ترکیبات برای پیشرفت روند ترمیم و نوسازی بافت‌ها در بدن موجود زنده و شرایط آزمایشگاهی ضروری و اساسی می‌باشد. با ترکیب مواد زیستی و سلول‌ها می‌توان زمینه‌ی تعامل سه بعدی سلول-سلول را فراهم نمود و بافت مناسب تهیه کرد. در حقیقت، مواد مورد نظر یک فضای سه بعدی جهت تکثیر سلول‌ها، تولید و ترشح ماتریکس خارج سلولی و شکل‌گیری بافت

طبق گزارش‌های اخیر، ۲۱ میلیون نفر از مردم آمریکا با بیماری استئوآرتریت زندگی می‌کنند (۳). به علاوه، بررسی‌ها پیش‌بینی می‌کند که تا سال ۲۰۲۰ بیش از ۶۰ میلیون نفر به این بیماری مبتلا خواهند بود (۴). در کشورهای پیشرفته استئوآرتریت زانو، مهم‌ترین علت ناتوانی مزمن در سالمندان به شمار می‌رود (۵). اطلاعات بیوشیمیایی به دست آمده حاکی از وجود نقص در شبکه‌ی کلاژنی ماتریکس، شاید در اثر از هم گسیختگی اتصالات بین رشته‌های مجاور، می‌باشد. این دگرگونی از اولین تغییرات مشاهده شده در ماتریکس بوده، برگشت ناپذیر به نظر می‌رسد (۶).

روش‌های درمان مختلف، از جمله پیوند بافت غضروف به صورت آلوگرافت و اتوگرافت، ممکن است به تشکیل بافت فیروز، آپوپتوز و تخریب بافت منجر شوند (۷-۶).

طی سال‌های اخیر، جهت درمان آسیب‌های مفاصل روش پیوند کندروسیت‌های اتولوگ به کار گرفته شده است. در این روش، قطعه‌ای از بافت غضروفی از ناحیه‌ی دنده یا محل‌هایی در مفاصل، که وزن بالایی بر آن‌ها وارد نمی‌شود، جدا می‌گردد و با تجزیه‌ی آنزیمی، کندروسیت‌ها جدا شده، تکثیر می‌یابند. در مرحله‌ی بعد، کندروسیت‌ها به ناحیه‌ی آسیب دیده پیوند داده می‌شوند. برای نخستین مرتبه، جداسازی و کشت کندروسیت از بافت غضروفی در دهه‌ی ۶۰ گزارش شد (۸) و از آن زمان، پیشرفت‌های قابل ملاحظه‌ای در فن‌آوری کشت کندروسیت، روش‌های ارزیابی میزان تکثیر آن‌ها و سنجش فعالیت‌های بیوسنتزی این سلول‌ها به دست آمده است (۱۰-۹).

لازم به ذکر است که روش پیوند کندروسیت‌های اتولوگ محدودیت‌هایی دارد و دستیابی به تعداد سلول

طبیعی را فراهم می‌سازند (۱۸-۱۵).

داربست باید زیست تخریب پذیر و قابل جذب شدن تدریجی پس از پیوند در بدن باشد؛ از این رو لازم است سرعت جذب داربست با سرعت تشکیل ماتریکس خارج سلولی هماهنگی داشته باشد (۲۰-۱۸، ۲). داربست و محصولات تخریب آن نباید موجب واکنش التهابی شوند و در حقیقت باید زیست سازگار باشند (۲۰-۱۸، ۲). ساختار داربست باید به گونه‌ای طراحی شود که انتقال مولکول‌های تنظیم‌کننده، مواد مغذی و متابولیت‌ها را تسهیل نماید و دارای منافذ مناسب با تخلخل کنترل شده باشد (۲۱). لازم است ویژگی‌های سطح داربست برای چسبندگی، تکثیر، مهاجرت و رشد سلولی مناسب باشد و شرایط مناسب جهت تشکیل و جایگزین شدن ماتریکس توسط سلول‌ها را فراهم کند (۲۲) و قابلیت استریل کردن و تثبیت شدن در موضع پیوند را داشته باشد (۲۲).

پلی‌مرهای طبیعی، که ساختار پلی‌پپتیدی یا پلی‌ساکاریدی دارند، از مشتقات موجود زنده هستند که در مهندسی بافت به عنوان داربست به کار می‌روند (۱۹). آلژینات یک بیوپلی‌مر طبیعی است که به طور عمده از جلبک قهوه‌ای و به میزان کمتر از باکتری‌ها استخراج می‌شود. این ماده ۴۰ درصد وزن خشک جلبک‌ها را تشکیل می‌دهد. در واقع آلژینات در ماتریکس خارج سلولی این جلبک‌ها به صورت ترکیب با کاتیون‌های کلسیم، منیزیم و سدیم وجود دارد. آلژینات پلی‌مر دو گانه از گلوکونیک اسید و مانورونیک اسید است که به صورت زنجیره‌هایی با الگوی خلاف حرکت عقربه‌های ساعت مرتب شده است (۲۳).

در هنگام تهیه‌ی ژل آلژینات، وجود اسمولیت‌های باردار، مانند سدیم کلرید، بر هموزن بودن و یکنواختی

ژل تأثیر می‌گذارد. از ویژگی‌های جالب محلول آلژینات مایع این است که در حضور کاتیون‌هایی مانند یون‌های کلسیم، منیزیم و باریم به حالت ژل در می‌آید و اتصالات بین واحدهای G رشته‌های آلژینات مجاور، پل‌های یونی بین زنجیره‌ای پدید می‌آورد (۲۴-۲۵). بررسی‌ها نشان داده است که ژل آلژینات شرایطی فراهم می‌سازد که کندروسیت‌ها، فنوتیپ تمایز یافته‌ی خود را حفظ نموده، ماکرو مولکول‌های مخصوص غضروف را تولید می‌نمایند (۲۶).

Stevens و همکاران نشان دادند که سیستم ژل آلژینات، روند کندروژنز سلول‌های مشتق از پریوستیوم را حمایت می‌کند (۲۷). به علاوه، القای کندروژنیک بر روی داربست آلژینات در سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان و بافت چربی نیز گزارش شده است. در روند تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کندروسیت، وجود آلژینات موجب حفظ شکل کروری سلول‌ها و پیشرفت تمایز آن‌ها می‌شود (۲۸-۲۹).

تحقیقات نشان داده است که از بین رفتن عوامل رشد پروتئینی در تخریب غضروف مؤثر است. بنابراین رشد، تقسیم سلولی، تشکیل ماتریکس خارج سلولی و روند کندروژنز تحت تأثیر عوامل رشد مختلف قرار می‌گیرد.

پروتئین‌های خانواده‌ی فاکتور رشد تغییر شکل دهنده‌ی بتا (TGF- $\beta$ ) به عنوان تنظیم‌کننده‌ی کندروژنز عمل می‌کنند. TGF- $\beta$  توسط کندروسیت‌های مفصلی تولید شده، در زمینه‌ی غضروف باقی می‌ماند و در حفظ کندروسیت‌های مفصلی و تکثیر استئوبلاست نقش مؤثری دارد (۳۰).

مطالعات نشان داده است که این پروتئین‌ها نقش اصلی و تعیین‌کننده در تکامل سیستم عضلانی-اسکلتی بر عهده دارند و در رشد و تکثیر سلول‌های غضروفی

افزایش تولید گلوکوکورتیکوئیدها استخوان سازی درون غضروفی را پیش می‌برد و نقش اساسی در تشکیل استخوان دارد (۳۷)؛ همچنین گزارش دیگر نشان داد که BMP-6 به تنهایی قادر به القای کندروژنز به طور کامل نیست (۳۸).

مطالعات انجام شده، نتایج مختلف و حتی متناقضی در سیستم کشت سه بعدی در زمینه‌ی کندروژنز سلول‌های بنیادی نشان می‌دهد و اثرات انواع فاکتورهای رشد نیز متفاوت گزارش شده است. از این رو، تصمیم گرفته شد در این تحقیق سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی زیرجلدی انسانی جدا گردد و پس از تکثیر، بر روی داربست آلژینات تحت تأثیر فاکتورهای رشد TGF- $\beta$ 3 و BMP-6 جهت ایجاد بافت غضروف به مدت ۲۱ روز کشت داده شود. هدف از این تحقیق، بررسی تأثیر این دو فاکتور رشد بر روند تمایز کندروژنیک سلول‌های بنیادی مشتق از چربی بر داربست آلژینات بود.

### روش‌ها

**جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی از بافت چربی:** بافت چربی زیر جلدی انسانی از اتاق عمل از پنج نفر با سن ۵۰-۲۵ سال پس از کسب رضایت کتبی از بیماران به دست آمد. پس از توزین، بافت تحت شرایط استریل به قطعات چند میلی‌متری بریده شد. جهت تجزیه‌ی بافت، آنزیم کلاژناز نوع IA (Sigma) به میزان ۱/۵ میلی‌گرم به ازای هر گرم بافت چربی به کار گرفته شد. پس از تجزیه شدن کامل بافت، هم حجم محلول آنزیم، محیط کشت DMEM (Gibco) حاوی ۱۰ FBS درصد (Sigma) و Penicillin/streptomycin ۱ درصد (Gibco) جهت خشتی کردن فعالیت آنزیم به

مؤثر هستند (۳۱). به علاوه، در سیستم کشت سه‌بعدی در هیدروژل آلژینات BMP-2 و BMP-9 می‌توانند در روند غضروف سازی مؤثر باشند (۳۲).

همچنین مشخص شده است که افزودن پروتئین BMP-6 به محیط القا کننده، در روند تمایز سلول‌های مزانشیمی بنیادی مشتق از مغز استخوان به کندروسیت، تولید پروتئوگلیکان‌های ماتریکس را افزایش می‌دهد (۳۳).

مطالعات در زمینه‌ی چگونگی کندروژنز در دوران جنینی نشان داده است که سلول‌های مزانشیمی در مراحل ابتدایی به صورت توده‌ای متراکم تجمع می‌یابند و تعامل بین سلولی همراه با دیگر فاکتورهای مؤثر سرانجام به تشکیل غضروف منجر می‌گردد (۷). ضمن این که تحقیقات در جهت حفظ فنوتیپ کندروسیت‌ها در کشت تک لایه‌ای، ضرورت کشت سه بعدی در روند کندروژنز را مشخص می‌کند (۱۱). از این رو، مطالعات گسترده‌ای در زمینه‌ی ایجاد بافت غضروفی از سلول‌های بنیادی با روش‌های گوناگون در شرایط آزمایشگاهی با کمک گرفتن از سیستم کشت سه بعدی انجام شده است.

لازم به ذکر است که علاوه بر شرایط سه بعدی، دستیابی به فاکتورهای رشد و محیط کشت مناسب نیاز به بررسی گسترده دارد و با وجود مطالعات وسیع در زمینه‌ی کندروژنز، نقش فاکتورهای رشد و انواع داربست‌ها به خوبی روشن نشده است.

با وجود تعدادی از گزارش‌ها مبنی بر تأثیر القا کنندگی برخی از اعضای خانواده‌ی TGF- $\beta$  در روند کندروژنز (۳۴-۳۳، ۲۸) گروهی از محققین این عوامل را جهت القای غضروف سازی و به دست آوردن کندروسیت بالغ کافی نمی‌دانند (۳۶-۳۵).

برخی مطالعات نشان داده است که BMP-6 با

سلول در محلول کلرید کلسیم به حالت ژل در آمد و قطرات (Beads) ژل مانند دارای سلول شکل گرفت. پس از تخلیه‌ی کلرید کلسیم، به بیدهای آلزینات محلول کلرید سدیم ۰/۹ درصد به مدت ۱۰ دقیقه اضافه شد. سپس شستشوی مجدد با کلرید سدیم ۰/۹ درصد و محیط کشت DMEM-high glucose انجام گرفت. در پایان به قطرات آلزینات حاوی سلول مدیوم، کندروژنیک حاوی Penicillin/streptomycin ۱ درصد (Gibco)، Transferrin-selenious-insulin ۱ درصد (Sigma)، Dexamethason  $10^{-7}$  مگمول (Sigma)، Bovine serum albumin ۱ درصد (Sigma)، phosphate 2-Ascorbate  $50 \mu\text{g/ml}$  (Sigma)، Linoleic acid  $5 \mu\text{g/ml}$  (Sigma)، و growth factor- $\beta$ 3  $10 \text{ ng/ml}$  (Sigma) و Morphogenetic Protein-6  $500 \text{ ng/ml}$  (Sigma) اضافه گردید. به طور متوسط در هر قطره حدود ۱۰۰۰۰ سلول قرار داشت. قطرات در دیش‌های کشت ۳ سانتی‌متر درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و  $5\% \text{ CO}_2$  نگهداری شد. هر ۲-۳ روز محیط کشت تعویض می‌شد. پس از ۲۱ روز القای کندروژنیک، بیدها با روش‌های گوناگون بررسی گردید. لازم به ذکر است که به سلول‌های گروه شاهد محیط کشت فاقد فاکتور رشد، به گروه آزمایشی اول فاکتور رشد TGF- $\beta$ 3، گروه آزمایشی دوم BMP-6 و گروه سوم هر دو فاکتور رشد اضافه گردید.

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

**روش بافت شناسی:** جهت بررسی ساختارهای حاصل از القای کندروژنیک مطالعه‌ی هیستولوژیکی با روش معمولی هماتوکسیلین-ائوزین انجام شد. نمونه‌ها در

سوسپانسیون سلولی اضافه گردید. در ادامه، سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰ rpm سانتریفوژ شد و مایع رویی همراه با سلول‌های آدیپوسیت تخلیه گردید. به رسوب سلولی حاصل، محیط کشت DMEM و FBS ۱۰ درصد افزوده شد و جهت تجزیه گلبول‌های قرمز موجود در رسوب سلولی، محلول بافر لیز کننده‌ی دارای کلرید آمونیم (Merck)، بی‌کربنات پتاسیم (Merck) و EDTA (Merck) استفاده گردید. پس از ۱۰ دقیقه، هم حجم بافر لیز کننده، محیط کشت DMEM و FBS ۱۰ درصد اضافه شده، به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ با دور ۱۴۰۰ rpm انجام شد. در مرحله‌ی پایانی، سلول‌ها در فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربع در محیط کشت DMEM (Gibco) حاوی FBS ۱۰ درصد (Sigma) و Penicillin/streptomycin ۱ درصد (Gibco) در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد،  $5\% \text{ CO}_2$  درصد و رطوبت نسبی کشت داده شد. با تعویض محیط کشت بعد از ۲۴ ساعت سلول‌های اضافی تخلیه گردید.

#### تمایز کندروژنیک بر روی داربست آلزینات:

جهت کشت بر روی داربست آلزینات و القای تمایز کندروژنیک، سلول‌های بنیادی در پاساژ چهارم پس از تریپسینه شدن از فلاسک جدا شده، با PBS شستشو شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. پس از شمارش سلولی، حدود  $2 \times 10^5$  سلول بر میلی‌لیتر بار دیگر سانتریفوژ شده، حدود ۰/۴ میلی‌لیتر محلول آلزینات به رسوب سلولی افزوده شد. پس از مخلوط کردن سلول-آلزینات با سرنگ انسولین و سوزن Gage ۲۲، محلول آلزینات-سلول به صورت قطره قطره به محلول کلرید کلسیم ۱۰۵ میلی‌مولار اضافه گردید. طی مدت ۱۵ دقیقه قطرات آلزینات-

فرمالدئید ۱۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت فیکس گردید. سپس مراحل آماده سازی بافت با آب گیری در الکل های صعودی، شفاف کردن در گزلیل و سپس آغستگی در پارافین انجام گرفت. به دنبال قالب گیری هر نمونه در پارافین مذاب، مقاطع با ضخامت ۵ میکرومتر با استفاده از میکروتوم تهیه شد. سپس رنگ آمیزی در هماتوکسیلین و ائوزین انجام شد و بررسی مقاطع رنگ شده با میکروسکوپ نوری نیکون انجام گرفت.

**روش ایمینوهیستوشیمی:** پس از تهیه ی مقاطع، شفاف کردن و آب دهی، تثبیت بافت در استن انجام شد. جهت خنثی شدن فعالیت پراکسیداز هیدروژن درون بافت، نمونه ها در پراکسید هیدروژن ۳ درصد (Merck) در اتانل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. پس از شستشو با بافر فسفات جهت هویدا شدن آنتی ژن ها (Epitope retrieval) از آنزیم پیپسین (Sigma) به میزان ۱ میلی گرم در ۱ میلی لیتر اسید استیک ۰/۵ مولار به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه ی سانتی گراد استفاده گردید. در مرحله ی بعد، آنتی بادی های اولیه علیه مولکول های کلاژن نوع II (Serotec) و آگریکان (Abcame) انسانی به مقاطع اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه ی سانتی گراد نگهداری گردید. در مرحله ی بعد آنتی بادی ثانویه ی نشان دار با آنزیم Horse Radish Proxidase (DAKO cytomatic) به نمونه ها افزوده گردید و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. پس از شستشو با بافر PBS، کروموژن دی آمینو بنزیدین (DAKO cytomatic) به نمونه ها افزوده شد. جهت رنگ آمیزی زمینه از هماتوکسین (Merck) استفاده گردید. پس از شستشوی نمونه ها با بافر، مطالعه با میکروسکوپ نیکون انجام گرفت.

**تکنیک نسخه برداری معکوس - واکنش زنجیره ای پلی مرز RT-PCR** از روش RT-PCR برای ارزیابی بیان ژن های مربوط به مولکول های ماتریکس ویژه ی غضروف استفاده شد. جهت استخراج RNA از سلول های تمایز یافته از کیت جداسازی RNA isolation RNX plus (CinnaGen) استفاده شد. ساخت cDNA با استفاده از پرایمرهای الیگو و کیت RevertAid™ First strand cDNA synthesis kit (Fermentage) انجام شد؛ بدین ترتیب که ۱۰ میکرولیتر RNA استخراج شده، ۱ میکرولیتر (dT) Oligo، Reverse Transcriptase و dNTP inhibitor (RT) به کار رفت. برای تکثیر cDNA های ساخته شده مراحل افزودن ترکیبات به این ترتیب انجام گرفت؛ 10x buffer به میزان ۲/۵  $\mu$ l، 10mM dNTP به مقدار ۰/۵  $\mu$ l، F Primer به میزان ۱  $\mu$ l، R Primer به مقدار ۱  $\mu$ l، نمونه ی DNA تهیه شده به میزان ۲  $\mu$ l، Taq polymerase enzyme به مقدار ۰/۵  $\mu$ l و dd H<sub>2</sub>O تا ۲۵  $\mu$ l. سپس تکثیر تحت شرایط یک سیکل مقدماتی به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه ی سانتی گراد برای دناتور کردن ۳۰ سیکل هر سیکل شامل ۳۰ ثانیه با دمای ۹۵ درجه ی سانتی گراد، ۳۰ ثانیه با دمای ۵۶ درجه ی سانتی گراد، ۴۵ ثانیه با دمای ۷۲ درجه ی سانتی گراد و در پایان یک سیکل به مدت ۵ دقیقه با دمای ۷۲ درجه ی سانتی گراد انجام شد. توالی پرایمرهای به کار رفته در جدول ۱ آمده است.

الکتروفورز در ژل ۱ درصد با شدت جریان ۹۰ میلی آمپر و ولتاژ ۴۵ میلی ولت به انجام رسید. باندهای حاصل با نرم افزار Image J بررسی و از طریق آزمون آماری Analysis variance of one way مورد ارزیابی قرار گرفت.

فرمالدئید ۱۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت فیکس گردید. سپس مراحل آماده سازی بافت با آب گیری در الکل های صعودی، شفاف کردن در گزلیل و سپس آغستگی در پارافین انجام گرفت. به دنبال قالب گیری هر نمونه در پارافین مذاب، مقاطع با ضخامت ۵ میکرومتر با استفاده از میکروتوم تهیه شد. سپس رنگ آمیزی در هماتوکسیلین و ائوزین انجام شد و بررسی مقاطع رنگ شده با میکروسکوپ نوری نیکون انجام گرفت.

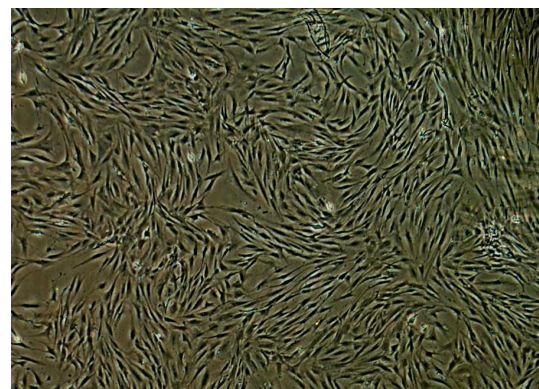
**روش ایمینوهیستوشیمی:** پس از تهیه ی مقاطع، شفاف کردن و آب دهی، تثبیت بافت در استن انجام شد. جهت خنثی شدن فعالیت پراکسیداز هیدروژن درون بافت، نمونه ها در پراکسید هیدروژن ۳ درصد (Merck) در اتانل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. پس از شستشو با بافر فسفات جهت هویدا شدن آنتی ژن ها (Epitope retrieval) از آنزیم پیپسین (Sigma) به میزان ۱ میلی گرم در ۱ میلی لیتر اسید استیک ۰/۵ مولار به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه ی سانتی گراد استفاده گردید. در مرحله ی بعد، آنتی بادی های اولیه علیه مولکول های کلاژن نوع II (Serotec) و آگریکان (Abcame) انسانی به مقاطع اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه ی سانتی گراد نگهداری گردید. در مرحله ی بعد آنتی بادی ثانویه ی نشان دار با آنزیم Horse Radish Proxidase (DAKO cytomatic) به نمونه ها افزوده گردید و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. پس از شستشو با بافر PBS، کروموژن دی آمینو بنزیدین (DAKO cytomatic) به نمونه ها افزوده شد. جهت رنگ آمیزی زمینه از هماتوکسین (Merck) استفاده گردید. پس از شستشوی نمونه ها با بافر، مطالعه با میکروسکوپ نیکون انجام گرفت.

جدول ۱. توالی پرایمرهای به کار رفته در این مطالعه

اندازه‌ی محصول	توالی پرایمرها	نام ژن
۳۵۰ bp	F- AGGAGGGCTGGAACAAGTACC R- GGAGGTGGTAATTCCAGGGAACA	Aggrecan
۳۷۰ bp	F- CAGGTCAAGATGGTC R- TTCAGCACCTGTCTCACCA	Collagen II
۶۸۰ bp	F- GGGCTGCTTTTAACTCTGGT R- GCAGGTTTTTCTAGACGG	GAPDH

## یافته‌ها

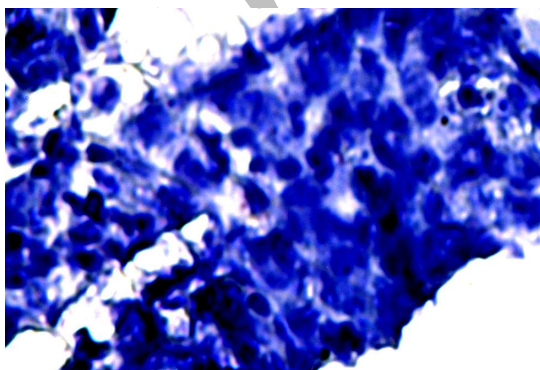
**مورفولوژی سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی:** در بررسی سلول‌های زنده و رنگ آمیزی نشده با استفاده از میکروسکپ فاز کتراست، سلول‌ها به صورت سلول‌های کوچک دارای سیتوپلاسم اندک، هسته‌ی مرکزی و بیضی شکل مشخص شدند. همچنین سلول‌ها در مرحله‌ی کشت اولیه دارای تعداد کمی زوائد سیتوپلاسمی کوتاه بودند. پس از رسیدن به پاساژ سوم، هموژنیستی و یکنواختی در کشت سلول‌های جدا شده به طور کامل مشخص گردید (شکل ۱).



شکل ۱. تصویر تهیه شده با میکروسکپ اینورت از سلول‌های بنیادی زنده جدا شده از بافت چربی در کشت تک لایه‌ای مربوط به پاساژ چهارم که سلول‌های دوکی به صورت یکنواخت قابل مشاهده هستند.  $\times 40$

۲۱ روز القای کندروژنیک تحت تأثیر فاکتورهای رشد TGF- $\beta$ 3 و BMP-6 به صورت قطرات کروی شکل مشخص گردید.

**بافت شناسی:** طی بررسی هیستولوژیک مقاطع رنگ آمیزی شده، سلول‌های کروی با هسته‌ی بازوفیل و سیتوپلاسم نامشخص درون داریست آلژینات شناسایی شد. ماتریکس بازوفیل و به میزان کم در اطراف سلول‌ها به چشم می‌خورد (شکل ۲). از آن جا که وجود داریست آلژینات از به هم پیوستن ماتریکس ساخته شده توسط سلول‌های در حال تمایز و پدید آمدن یک بافت هموژن جلوگیری می‌کند، طی بررسی مقاطع هیستولوژیک، ساختار شبه غضروف دارای لاکونا مشاهده نشد.



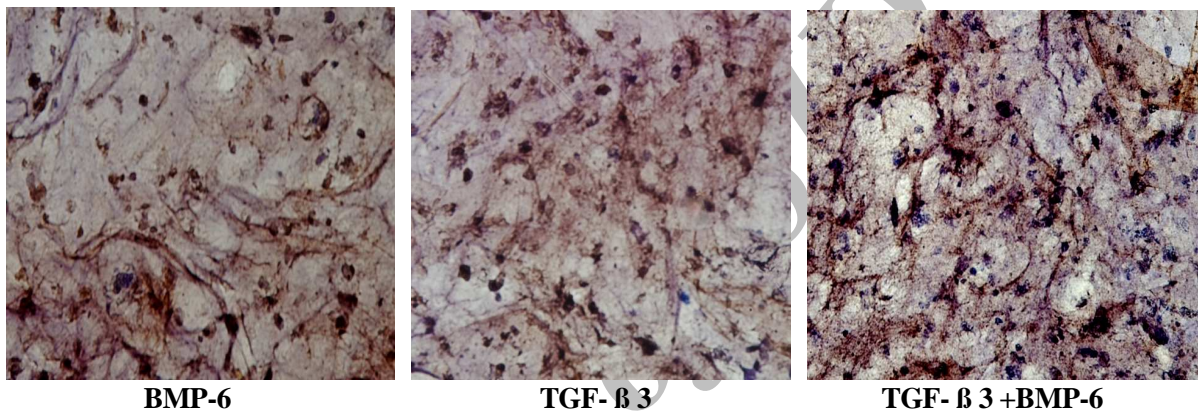
شکل ۲. فوتومیکروگراف مقطع تهیه شده از قطره آلژینات که سلول‌های بنیادی در حال تمایز با مورفولوژی کروی در آن مشخص است. رنگ آمیزی با هماتوکسیلین - ائوزین  $\times 400$

بررسی نتایج حاصل از تمایز کندروژنیک بر روی داریست آلژینات: قطرات آلژینات دارای سلول پس از

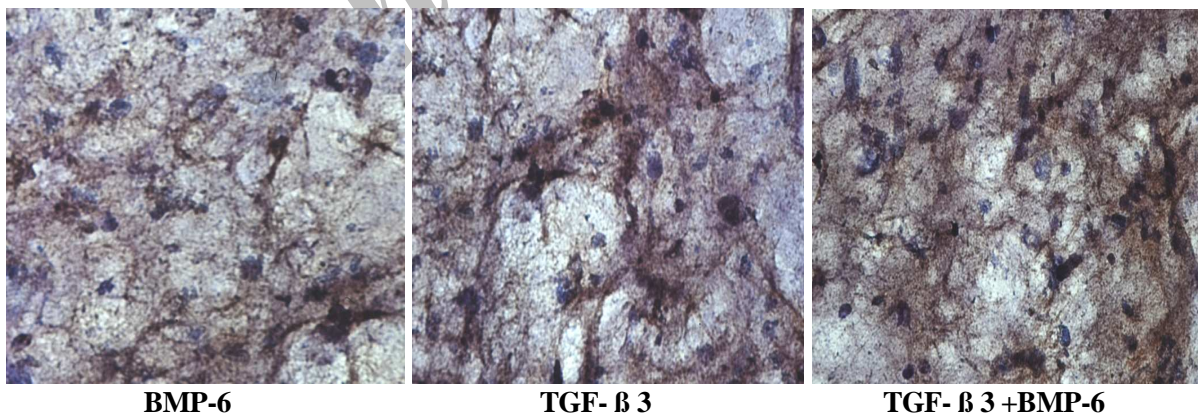


داربست از پدید آمدن ماتریکس هموژن و به هم پیوسته جلوگیری می‌کند؛ پراکندگی ماتریکس در نمونه‌ها به طور کامل مشهود بود (شکل ۳ و ۴). مشاهده‌ی نمونه‌ها نشان داد که شدت رنگ در گروه آزمایشی سوم نسبت به دو گروه دیگر بیشتر است.

**بررسی ایمینوهیستوشیمی:** نمونه‌ها جهت ارزیابی وجود ماتریکس ویژه‌ی غضروف با روش ایمینوهیستوشیمی بررسی شد. وجود ترکیبات آگریکان و کلاژن نوع II به صورت تشکیل رسوب قهوه‌ای رنگ حاصل از واکنش دی‌آمینو بنزیدین مشخص گردید. البته لازم به ذکر است به دلیل این که

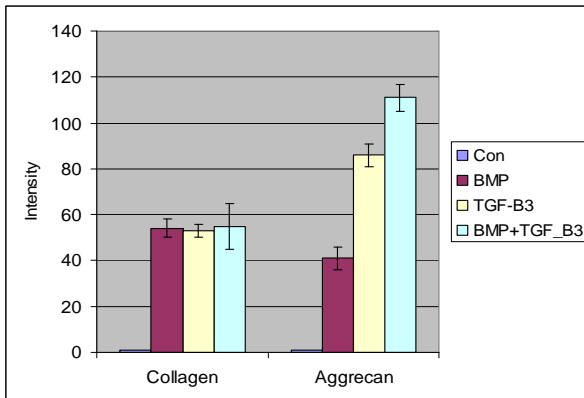


شکل ۳. فتومیکروگراف مقاطع تهیه شده از داربست آلژینات - سلول پس از القا تمایز کندروژنیک جهت بررسی وجود کلاژن نوع II با تکنیک ایمینوهیستوشیمی در گروه‌های آزمایشی دارای فاکتورهای رشد BMP-6 و TGF- $\beta$  3 و هر دو فاکتور توام. رسوب قهوه‌ای رنگ نشان دهنده وجود کلاژن نوع II است.  $\times 200$



شکل ۴. فتومیکروگراف مقاطع تهیه شده از داربست آلژینات - سلول پس از القا تمایز کندروژنیک جهت بررسی وجود پروتئوگلیکان آگریکان با تکنیک ایمینوهیستوشیمی در گروه‌های آزمایشی دارای فاکتورهای رشد BMP-6 و TGF- $\beta$  3 و هر دو فاکتور توام. رسوب قهوه‌ای رنگ نشان دهنده وجود پروتئوگلیکان آگریکان است.  $\times 200$





نمودار ۱. مقایسه نتایج RT-PCR به صورت نیمه کمی در گروه‌های آزمایشی تمایز یافته بر داربست آلژینات. بیان ژن آگریکان در گروه دارای BMP-6+TGF- $\beta$ 3 در مقایسه با گروه‌های دیگر اختلاف معنی‌داری نشان می‌دهد ( $P < 0.001$ ).

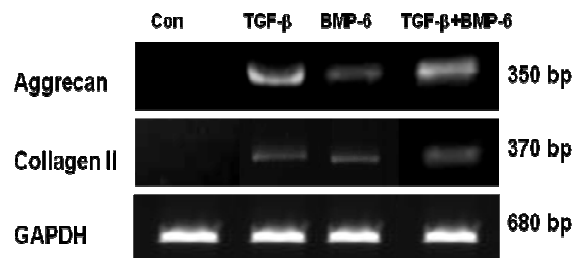
### بحث

از آن جا که بافت غضروفی فاقد عروق خونی و اعصاب است و آسیب‌های این بافت قابل ترمیم نیست، از طریق مهندسی بافت می‌توان به بافت غضروفی دست یافت. تحقیقات نشان داده است که جهت طراحی بافت غضروف وجود دانسیته‌ی سلولی بالا و تعامل بین سلولی مناسب ضروری است و از طریق سیستم کشت Pellet و کشت بر روی داربست‌های سه بعدی می‌توان تعامل بین سلولی مناسب جهت القای کندروژنز فراهم کرد (۴۰-۳۹، ۳۴، ۲۸). به علاوه، فاکتورهای رشد و عدم وجود سرم از ضروریات القای غضروف سازی محسوب می‌شوند (۳۹، ۳۱، ۲۸).

لازم به ذکر است که جهت تمایز کندروژنیک در تحقیقات گسترده از داربست‌های متنوعی استفاده شده است که هر یک محاسن و معایبی دارند. پلی‌مرهای مصنوعی، گرچه ویژگی‌های مکانیکی مناسبی جهت طراحی بافت دارند، لیکن از زیست سازگاری مناسب برخوردار نیستند و چسبندگی سلولی ایجاد نمی‌کنند. به علاوه، در شرایط ساده‌ی آزمایشگاهی تهیه‌ی آن‌ها به

### بررسی نتایج RT-PCR: برای تأیید نتایج

بررسی‌های هیستولوژیک و ایمنوهیستوشیمی، بیان ژن‌های مولکول‌های اختصاصی غضروف از طریق RT-PCR ارزیابی گردید و مشخص شد که تحت تأثیر فاکتور رشد BMP-6 بر داربست آلژینات، سلول‌های بنیادی مشتق از چربی طی روند تمایز، ترکیبات ویژه‌ی غضروف مانند آگریکان و کلاژن نوع II را بیان می‌کنند (شکل ۵). لازم به ذکر است که بیان ژن‌های آگریکان و کلاژن نوع II در سلول‌های بنیادی پیش از القای کندروژنز و سلول‌هایی که در داربست آلژینات بدون افزودن فاکتور رشد کشت داده شدند نیز از طریق RT-PCR بررسی شد و تنها بیان ژن گلیسر آلدئید فسفات دهیدروژناز (GAPDH)، که به عنوان ژن House-keeping مورد بررسی قرار گرفت، در آن‌ها مشخص گردید (شکل ۵). با مقایسه‌ی آماری شدت باندها در گروه‌های آزمایشی، اختلاف معنی‌داری در میزان بیان ژن کلاژن نوع II مشخص نشد ( $P = 0.99$ ) ولی میزان بیان پروتئوگلیکان آگریکان در گروه‌های آزمایشی تفاوت معنی‌داری نشان داد ( $P < 0.001$ )؛ به طوری که در گروه دارای هر دو فاکتور رشد، بیشترین و در گروه دارای BMP-6، کمترین بیان مشخص گردید (نمودار ۱).



شکل ۵. نتایج RT-PCR مربوط به نمونه‌های کشت یافته بر داربست آلژینات. ژن‌های ویژه غضروف (کلاژن نوع II و آگریکان) در گروه کنترل بیان نگردید ولی در هر سه گروه آزمایشی بیان این ژن‌ها مشخص شد. ژن گلیسر آلدئید فسفات دهیدروژناز در همه سلول‌ها بروز می‌کند که به عنوان ژن house-keeping gene به کار برده شد.

راحتی امکان پذیر نیست (۴۲-۴۱).

در مورد انواع داربست‌های طبیعی نیز معایبی وجود دارد که پایداری کم، فقدان ویژگی‌های مکانیکی مناسب و سرعت بالای تخریب از آن جمله است (۴۵-۴۳). پلی‌ساکارید طبیعی آلژینات در شرایط آزمایشگاه بدون نیاز به وجود حلال‌های آلی به راحتی به حالت ژل در می‌آید و تهیه‌ی آن به عنوان داربست نیاز به تغییر pH، حرارت یا فعال‌کننده‌های سمی ندارد و به علاوه در حالت ژل، دارای تخلخل بوده، انتشار ماکرومولکول‌ها را تسهیل می‌نماید (۴۵، ۲۷). از آن جا که آلژینات به علت هیدروفیل بودن و داشتن مقادیر فراوان آب می‌تواند به عنوان ماده‌ی زمینه‌ی خارج سلولی بستری مناسب جهت رشد سلول‌ها فراهم کند، در تحقیق حاضر آلژینات به عنوان داربست انتخاب گردید.

در بین القاکننده‌های کندروژنیک، اعضای خانواده‌ی فاکتورهای رشد تغییر شکل دهنده‌ی بتا (TGF- $\beta$ ) از اهمیت خاصی برخوردارند. مبنای بررسی اعضای خانواده‌ی TGF- $\beta$  در روند کندروژنز بر این واقعیت استوار است که این فاکتورهای رشد در تنظیم رشد و تمایز رویان، به ویژه در روند تکامل غضروف و استخوان، تأثیر مهمی دارند (۴۷-۴۶). مطالعه‌ی Yoo و همکاران نشان داد که به کار بردن فاکتور رشد TGF- $\beta$ 1 موجب بیان کلاژن نوع II در روز چهارم القای کندروژنیک می‌شود؛ در حالی که در روز یازدهم بیان کلاژن نوع X را، که عامل هیپرتروفه شدن است، سبب می‌گردد (۴۸).

تحقیق Bai و همکاران نیز نشان داد که TGF- $\beta$ 1 در روزهای پایین جهت القای کندروژنز کافی نیست (۳۶) که با برخی تحقیقات مشابه بود (۴۹-۴۸).

مطالعات Barry و همکاران نشان داده است که TGF $\beta$ 2 و  $\beta$ 3 بیش از TGF- $\beta$ 1 موجب تجمع گلیکوز آمینوگلیکان‌ها در روند کندروژنز می‌شوند (۴۹). در بررسی دیگر مشخص شد که با حذف فاکتور رشد TGF- $\beta$ 3 و کاهش میزان دگزامتازون در روند کندروژنز حالت هیپرتروفی بافت رخ می‌دهد (۵۰).

برخی مطالعات نشان داده است که ایزوفرم‌های TGF- $\beta$  به تنهایی جهت تمایز سلول‌های مزانشیمی بنیادی کافی نیست و افزودن دیگر فاکتورها، مانند BMP-6، نه تنها وزن Pellet‌ها بلکه میزان پروتئوگلیکان‌های تولید شده را نیز افزایش می‌دهد (۳۳).

در بررسی Indrawattana و همکاران گزارش شده است که BMP-6 به تنهایی قادر به القا کندروژنز نیست (۳۸)؛ به علاوه، تحقیقات دیگر وجود BMP-6 را برای استخوان سازی داخل غضروفی لازم می‌دانند و نقش اساسی این فاکتور را در تشکیل استخوان گزارش کرده‌اند (۳۹).

همچنین بررسی‌ها نشان داده است که طی تکامل رویان در مرحله‌ی پیش از هیپرتروفه شدن کندروسیت‌ها، BMP-6 بیان می‌شود. به علاوه، BMP-6 میزان mRNA مربوط به کلاژن نوع X را در کشت تک لایه‌ای در کندروسیت‌های نابالغ افزایش می‌دهد (۵۱).

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

گردید که دو فاکتور رشد BMP-6 و TGF- $\beta$ 3 هر یک به تنهایی بر داربست آلزینات به عنوان عامل القا کننده کندروژنز عمل می کنند؛ همچنین، تأثیر آن ها در میزان تولید کلاژن نوع II تفاوت معنی داری نشان نداد لیکن بر میزان تولید پروتئوگلیکان آگریکان تأثیر متفاوتی داشتند؛ در حالی که Estes و همکاران تأثیر فاکتور رشد BMP-6 را بیش از TGF- $\beta$ 3 گزارش کردند (۲۸). در تحقیق حاضر مشخص شد که به کار گیری هم زمان دو فاکتور تولید آگریکان را با اختلاف معنی داری افزایش داده و فاکتور رشد BMP-6 حداقل تأثیر را در روند تولید پروتئوگلیکان آگریکان داشته است.

در نهایت از تحقیق حاضر می توان نتیجه گرفت که سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی زیرجلدی انسانی در داربست آلزینات تحت تأثیر فاکتورهای رشد BMP-6 و TGF- $\beta$ 3 قابلیت تمایز به بافت غضروفی را دارند و می توان جهت طراحی بافت غضروفی از آن ها استفاده نمود.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از مساعدت های صمیمانه ی جناب آقای دکتر حمید زرکش، سرکار خانم زهرا شفیعی، سرکار خانم کربلایی و سرکار خانم تنهایی ابراز می دارند.

آمینوگلیکان ها بیشتر نماید (۳۳). گرچه برخی محققین وجود TGF- $\beta$ 3 را جهت پیشرفت کندروژنز ضروری می دانند (۲۸)، لیکن Indrawattana و همکاران در بررسی خود به این موضوع اشاره می کنند که TGF- $\beta$ 3 تمایز کندروژنیک سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان را القا می کند ولی تأثیر آن اندک است و کندروسیت به طور کامل بالغ تشکیل نمی شود (۳۸).

نتایج مطالعه ی ما نشان داد که فاکتورهای رشد BMP-6 و TGF- $\beta$ 3 هر یک به تنهایی قادر به القای سلول های بنیادی مشتق از چربی به غضروف هستند و به کار گیری هم زمان دو فاکتور موجب افزایش تولید پروتئوگلیکان آگریکان می شود. همان گونه که در گزارش Sekiya و همکاران مشخص شده است، با افزودن BMP-6 به محیط کشت کندروژنیک تولید پروتئوگلیکان ها افزایش می یابد (۳۳).

تمایز کندروژنیک سلول های ADSCs بر داربست آلزینات تحت تأثیر TGF- $\beta$ 3 و BMP-6 به طور گسترده گزارش نشده است. تنها مورد به دست آمده مربوط به مطالعه ی Estes و همکاران می باشد (۲۸).

با توجه به تفاوت های تحقیق حاضر و مطالعه ی Estes و همکاران از نظر دانسیته ی سلولی، وجود دگزامتازون و عدم به کار گیری FGF و EGF نتایج متفاوت دور از انتظار نیست. در این بررسی مشخص

### References

1. Junqueira LC, Carneiro J. Basic histology: text & atlas. New York: McGraw-Hill; 2005. p. 120-33
2. Hardingham T, Tew S, Murdoch A. Tissue engineering: chondrocytes and cartilage. Arthritis Res 2002; 4 Suppl 3: S63-S68.
3. Fautrel B, Hilliquin P, Rozenberg S, Allaert FA, Coste P, Leclerc A, et al. Impact of osteoarthritis: results of a nationwide survey of 10,000 patients consulting for OA. Joint Bone Spine 2005; 72(3): 235-40.
4. Anonymous prevalence and impact of arthritis by race and ethnicity-US, 1989-1991. Morb Mortal Wkly Rep 2010; 10: 373-8.
5. Kuo CK, Li WJ, Mauck RL, Tuan RS. Cartilage tissue engineering: its potential and uses. Curr Opin Rheumatol 2006; 18(1): 64-73.
6. Casper D, Harrison Principles of Internal Medicine 2005. Trans. Interpreters Publishing Group Teymurzadeh. Tehran: Teymurzadeh; 2006.
7. Tew SR, Kwan AP, Hann A, Thomson BM, Ar-

- cher CW. The reactions of articular cartilage to experimental wounding: role of apoptosis. *Arthritis Rheum* 2000; 43(1): 215-25.
8. Holtzer H, Abbott J, Lash J, Holtzer S. The loss of phenotypic traits by differentiated cells in vitro. I dedifferentiation of cartilage cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1960; 46(12): 1533-42.
  9. Homicz MR, Chia SH, Schumacher BL, Masuda K, Thonar EJ, Sah RL, et al. Human septal chondrocyte redifferentiation in alginate, polyglycolic acid scaffold, and monolayer culture. *Laryngoscope* 2003; 113(1): 25-32.
  10. Esfandiary E, Amirpour N, Fesharaki M, Nasr Esfahani MH, Molavi F, Molavi F, et al. Access to chondrocyte culture with alginate, In Iran. *Yakhteh Med J* 2008; 10(1): 73-7.
  11. Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 1982; 30(1): 215-224.
  12. Vacanti CA, Upton J. Tissue-engineered morphogenesis of cartilage and bone by means of cell transplantation using synthetic biodegradable polymer matrices. *Clin Plast Surg* 1994; 21(3): 445-62.
  13. Lee JD, Hwang O, Kim SW, Han S. Primary cultured chondrocytes of different origins respond differently to b-FGF and TGF- $\beta$ . *Life Sciences* 1997; 61(3): 293-9.
  14. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331(14): 889-95.
  15. Bronzino JD. Tissue Engineering and Artificial Organs. In: Bronzino JD, Editor. *The Biomedical Engineering Handbook*. New York: CRC Press; 2006. p. 1-8.
  16. Vunjak-Novakovic G, Freshney RI. Culture of cells for tissue engineering. New Jersey: John Wiley and Sons; 2006. p. 131-55.
  17. Tabato Y. Recent progress in tissue engineering. *Drug Discovery Today* 2001; 6(9): 483-7.
  18. Tsuchiya K, Chen G, Ushida T, Matsuno T, Tateishi T. The effect of coculture of chondrocytes with mesenchymal stem cells on their cartilaginous phenotype in vitro. *Mat Sci Eng* 2004; 24(3): 391-6.
  19. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260(5110): 920-6.
  20. Freed LE, Vunjak-Novakovic G. Tissue engineering of cartilage. In: Bronzino JD, Editor. *The Biomedical Engineering Handbook*. New York: CRC Press, 2006. p. 124-6.
  21. Yamamoto M, Tabata Y, Kawasaki H, Ikada Y. Promotion of fibrovascular tissue ingrowth into porous sponges by basic fibroblast growth factor. *J Mater Sci Mater Med* 2000; 11(4): 213-8.
  22. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 2000; 21(24): 2529-43.
  23. Morris VJ. Gelation of polysaccharides. In: Hill SE, Ledward DA, Mitchell JR, Editors. *Functional properties of food macromolecules*. New York: Elsevier; 1986: 121-8.
  24. Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* 1999; 20(1): 45-53.
  25. Wang Z, Zhang Q, Konno M, Saito S. Sol-gel transition of alginate solution by the addition of various divalent cations. *Biopolymers* 1993; 33(4): 703-11.
  26. Aydelotte MB, Kuettner KE. Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. I. Morphology and cartilage matrix production. *Connect Tissue Res* 1988; 18(3): 205-22.
  27. Stevens MM, Qanadilo HF, Langer R, Prasad S, V. A rapid-curing alginate gel system: utility in periosteum-derived cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2004; 25(5): 887-94.
  28. Estes BT, Wu AW, Guilak F. Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6. *Arthritis Rheum* 2006; 54(4): 1222-32.
  29. Yang IH, Kim SH, Kim YH, Sun HJ, Kim SJ, Lee JW. Comparison of phenotypic characterization between "alginate bead" and "pellet" culture systems as chondrogenic differentiation models for human mesenchymal stem cells. *Yonsei Med J* 2004; 45(5): 891-900.
  30. Coutts RD, Sah RL, Amiel D. Effects of growth factors on cartilage repair. *Instr Course Lect* 1997; 46: 487-94.
  31. O'Connor WJ, Botti T, Khan SN, Lane JM. The use of growth factors in cartilage repair. *Orthop Clin North Am* 2000; 31(3): 399-410.
  32. Majumdar MK, Wang E, Morris EA. BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1. *J Cell Physiol* 2001; 189(3): 275-84.
  33. Sekiya I, Colter DC, Prockop DJ. BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284(2): 411-8.
  34. Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, Gimble JM, Guilak F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials* 2004; 25(16): 3211-22.
  35. Hanada K, Solchaga LA, Caplan AI, Hering TM, Goldberg VM, Yoo JU, et al. BMP-2 induction and TGF-beta 1 modulation of rat periosteal cell chondrogenesis. *J Cell Biochem* 2001; 81(2): 284-94.

36. Bai X, Xiao Z, Pan Y, Hu J, Pohl J, Wen J, et al. Cartilage-derived morphogenetic protein-1 promotes the differentiation of mesenchymal stem cells into chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325(2): 453-60.
37. Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85-A(8): 1544-52.
38. Indrawattana N, Chen G, Tadokoro M, Shann LH, Ohgushi H, Tateishi T, et al. Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320(3): 914-9.
39. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13(12): 4279-95.
40. Cai X, Lin Y, Ou G, Luo E, Man Y, Yuan Q, et al. Ectopic osteogenesis and chondrogenesis of bone marrow stromal stem cells in alginate system. *Cell Biol Int* 2007; 31(8): 776-83.
41. Chen G, Ushida T, Tateishi T. A biodegradable hybrid sponge nested with collagen microsponges. *J Biomed Mater Res* 2000; 51(2): 273-9.
42. Lahiji A, Sohrabi A, Hungerford DS, Frondoza CG. Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. *J Biomed Mater Res* 2000; 51(4): 586-95.
43. Frenkel SR, Bradica G, Brekke JH, Goldman SM, Ieska K, Issack P, et al. Regeneration of articular cartilage--evaluation of osteochondral defect repair in the rabbit using multiphasic implants. *Osteoarthritis Cartilage* 2005; 13(9): 798-807.
44. Chen YL, Lee HP, Chan HY, Sung LY, Chen HC, Hu YC. Composite chondroitin-6-sulfate/dermatan sulfate/chitosan scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2007; 28(14): 2294-305.
45. Magnani A, Albanese A, Lamponi S, Barbucci R. Blood-interaction performance of differently sulphated hyaluronic acids. *Thromb Res* 1996; 81(3): 383-95.
46. Wall NA, Hogan BL. TGF-beta related genes in development. *Curr Opin Genet Dev* 1994; 4(4): 517-22.
47. Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop Relat Res* 1998; (346): 26-37.
48. Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM, et al. The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am* 1998; 80(12): 1745-57.
49. Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: Differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res* 2001; 268(2): 189-200.
50. Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 1998; 4(4): 415-28.
51. Denker AE, Hass AR, Nicoll SB, Tuan RS. Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: I. Stimulation by Bone morphogenetic protein-2 in high-density micromass culture. *Differentiation*. 2002; 64(2): 67-76.

## Effect of Transforming Growth Factor- $\beta$ 3 and Bone Morphogenetic Protein-6 Growth Factors on Chondrogenic Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells in Alginate Scaffold

Batool Hashemibeni PhD<sup>1</sup>, Shahnaz Razavi PhD<sup>2</sup>, Ebrahim Esfandiary PhD<sup>3</sup>,  
Saeed Karbasi PhD<sup>4</sup>, Mohammad Mardani PhD<sup>2</sup>, Farzane Sadeghi MSc<sup>5</sup>,  
Mohammadhosein Nasre Esfahani PhD<sup>6</sup>, Fatemeh Nadali PhD<sup>7</sup>, Hamid Shafieezade MD<sup>8</sup>

### Abstract

**Background:** Cartilage damages and diseases such as osteoarthritis are rather worldwide problems of many people. In addition, articular cartilage has a limited ability to repair. Current treatment methods for cartilage tissue injuries lead to formation of fibrous tissue, apoptosis, and further cartilage degeneration. Therefore, engineering of cartilage tissue with adult stem cells is considered necessary. This study aimed to investigate the effect of TGF- $\beta$ 3 and BMP-6 growth factors on chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells in alginate scaffold.

**Methods:** Stem cells were isolated from human subcutaneous adipose tissue with collagenase enzyme digestion. The isolated cells were treated with chondrogenic medium supplemented with TGF- $\beta$ 3 and BMP-6 on alginate scaffold then harvested after 3 weeks. Histological, immunohistochemical and RT-PCR methods were performed for assessment of cartilage-specific markers.

**Findings:** Our results revealed that chondrogenesis of ADSCs on alginate scaffold induced by TGF- $\beta$ 3 and BMP-6 growth factors. Immunohistochemical method was shown deposition of typical cartilage extracellular matrix components such as type II collagen and aggrecan in constructs. RT-PCR analysis of cartilage-specific genes, also confirmed the induction of the chondrocytic phenotype upon stimulation with TGF- $\beta$ 3 and BMP-6. Also, TGF- $\beta$ 3 and BMP-6 together increased the expression of aggrecan gene in compare with one growth factor alone.

**Conclusion:** It can be concluded that TGF- $\beta$ 3 and BMP-6 promote chondrogenesis of ADSCs in 3-D culture and the use of both growth factors together increase the expression of aggrecan gene in compare with one growth factor alone.

**Key words:** Adipose-derived stem cells, Alginate, Tissue engineering of cartilage, BMP-6, TGF- $\beta$ 3.

<sup>1</sup> Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

<sup>2</sup> Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

<sup>3</sup> Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

<sup>4</sup> Assistant Professor, Department of Physics and Medical Engineering, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

<sup>5</sup> Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

<sup>6</sup> Assistant Professor, Department of Embryology, Cell Sciences Research Center (ACECR), Royan Institute (Isfahan Campus), Isfahan, Iran.

<sup>7</sup> Assistant Professor, Department of Pathology and Hematology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

<sup>8</sup> General Practitioner, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

Corresponding Author: Shahnaz Razavi PhD, Email: razavi@med.mui.ac.ir