

مقایسه‌ی تأثیر دو عامل Transforming Growth Factor Beta1 (TGF-β1) و پیاسکلیدین بر بیان ژن‌های کلاژن II، X و اگریکان در روند کندروژنز سلول‌های بنیادی مشتق از چربی انسان در داربست کامپوزیتی فایبرین آلژینات

هادی دیده‌ور^۱، فرهاد گلشن ایران‌پور^۲، علی والیانی^۳، بتول هاشمی بنی^۴، مجتبی اسماعیلی^۱

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: آسیب‌های بافت غضروف در کشورهای پیشرفته، مهم‌ترین علت ناتوانی در سالمندان است. علاوه بر آن، غضروف مفصلی توانایی محدودی در ترمیم دارد. روش‌های درمانی رایج قادر به ترمیم این آسیب‌ها نمی‌باشد؛ چرا که منجر به ایجاد بافت فیبروزی در غضروف می‌شوند. سلول درمانی، یکی از روش‌های درمان است که در آن، سلول‌های بنیادی با کمک مهندسی بافت می‌توانند به کندروسیت تمایز یابند و جهت دستیابی به این هدف، از عوامل رشد و داربست‌ها استفاده می‌شود. به دلیل هایپرتروفه شدن بافت غضروف و عدم پایداری داربست‌ها، ضرورت دستیابی به عوامل القا کننده و داربست مناسب احساس می‌گردد. بر اساس مطالعات، فایبرین آلژینات از لحاظ پایداری و کشسانی (Elasticity) مناسب است و پیاسکلیدین، باعث افزایش بیان ژن‌های مخصوص غضروف می‌گردد. از این رو، در تحقیق حاضر، تأثیر پیاسکلیدین و Transforming growth factor beta1 (TGF-β1) بر القای کندروژنز سلول‌های بنیادی در داربست فایبرین آلژینات مورد مقایسه قرار گرفت.

روش‌ها: Adipose derived stem cells (ADSCs) از بافت چربی سه بیمار استخراج و تکثیر داده شد. سپس به مدت ۲۱ روز در داربست فایبرین آلژینات تحت تأثیر مدیوم کندروژنیک کشت داده شدند. میزان تکثیر و بقای سلول‌ها به روش MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide] و میزان بیان ژن‌های اگریکان، کلاژن II و X با استفاده از تکنیک Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: میزان تکثیر و بقا در داربست فایبرین آلژینات، در گروه حاوی پیاسکلیدین نسبت به سایر گروه‌ها، افزایش داشت؛ اما این افزایش به صورت معنی‌دار نبود ($P > 0/050$). همچنین، پیاسکلیدین باعث افزایش میزان بیان ژن کلاژن II ($P < 0/001$) و کاهش میزان بیان ژن کلاژن X در مقایسه با TGF-β1 گردید.

نتیجه‌گیری: احتمال می‌رود پیاسکلیدین در روند القای کندروژنز ADSCs در داربست فایبرین آلژینات مؤثر بوده و بر افزایش بیان ژن‌های ویژه‌ی غضروف تأثیر داشته باشد.

واژگان کلیدی: سلول بنیادی، پیاسکلیدین، کندروژنز، Transforming growth factor beta1

ارجاع: دیده‌ور هادی، گلشن ایران‌پور فرهاد، والیانی علی، هاشمی بنی بتول، اسماعیلی مجتبی. مقایسه‌ی تأثیر دو عامل Transforming Growth Factor Beta1 (TGF-β1) و پیاسکلیدین بر بیان ژن‌های کلاژن II، X و اگریکان در روند کندروژنز سلول‌های بنیادی مشتق از چربی انسان در داربست کامپوزیتی فایبرین آلژینات. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۵؛ ۳۴ (۳۷۳): ۱۶۵-۱۵۷

ترمیم ضایعات غضروفی با محدودیت زیادی روبه‌رو است (۱، ۲).

مهندسی بافت که ترکیبی از اصول مهندسی و دانش زیست‌شناختی است، به دنبال دستیابی به داربست‌ها و عوامل مناسب برای تحریک تولید غضروف مفصلی است که بتواند آن را به منظور درمان آسیب‌های مفصلی به بدن انتقال دهد (۳). در مهندسی بافت، از

مقدمه

غضروف مفصلی، یکی از بافت‌های مهمند اختصاصی است که شامل کندروسیت و ماتریکس خارج سلولی است و ممکن است به دلایل مختلف از جمله استئوآرتریت دچار آسیب شود. از آن جایی که در بافت غضروف، عروق خونی و اعصاب وجود ندارد و تغذیه‌ی سلول‌ها از طریق انتشار انجام می‌شود، از این رو،

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشیار، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: hashemibeni@med.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: بتول هاشمی بنی

پیاسکلیدین تهیه شده از عصاره‌ی آوآکادو و سویا به نسبت ۱ (آوآکادو) به ۳ (سویا) به صورت غیر صابونی (ASU یا Avocado-soybean unsaponifiables)، در بیماری‌های مفصلی به ویژه استئوآرتریت برای کاهش درد و تورم مفصل استفاده می‌شود (۱۴). پیاسکلیدین، با اثر مهاري روی کلاژناز نوع II و پروستاگلاندین و اثر تحریکی روی سنتز پروتئوگلیکان‌ها و کلاژن و نیز کاهش سنتز فیرونکتین، به بازگرداندن ساختمان غضروف به حال طبیعی کمک می‌کند. به علاوه، پیاسکلیدین اثر مهاري بر Interleukin-1 beta ($IL-1\beta$) دارد و سبب تحریک سنتز کلاژن II در کندروسیت‌ها می‌گردد (۱۵)، همچنین، تولید $TGF-\beta 1$ را نیز تحریک می‌کند (۱۶).

از آن جایی که در روند کندروژنز اثرات منفی $TGF-\beta s$ و هایپرتروفه شدن بافت غضروفی و ضعیف بودن داربست‌ها مطرح است، در این تحقیق، تأثیر ترکیب گیاهی پیاسکلیدین بر روند القای کندروژنز سلول‌های بنیادی مشتق از چربی انسانی در داربست فیرین آلژینات با عامل رشد $TGF-\beta 1$ مورد مقایسه قرار گرفت.

روش‌ها

بافت چربی زیر جلدی انسانی از سه نفر با سن ۴۰ تا ۲۵ سال پس از اخذ رضایت کتبی از بیمارستان تهیه شد. پس از توزین، بافت تحت شرایط استریل به قطعات چند میلی‌متری تقسیم شد. جهت تجزیه بافت، از آنزیم کلاژناز نوع IA (Σ) به میزان ۱/۵ میلی‌گرم به ازای هر گرم بافت چربی استفاده شد. پس از اضافه شدن مقدار مناسب آنزیم، نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند.

پس از تجزیه شدن کامل بافت، هم حجم محلول آنزیم، محیط کشت شامل $Gibco$ Penicillin/Streptomycin (۱ درصد + $Gibco$) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (۱۰ درصد + $Gibco$) Fetal bovine serum (FBS) (Σ) (۱۰ درصد جهت خنثی کردن فعالیت آنزیم به سوپانسیون سلولی اضافه شد. سپس، سوپانسیون در لوله‌های فالتون ۱۵ میلی‌لیتری به مدت ۱۵ دقیقه با شتاب ۱۴۰۰ دور در دقیقه سانتریفرز شد و مایع رویی همراه با آدیپوسیت‌ها تخلیه گردید.

در پایان، رسوب سلولی حاصل در فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربع در محیط کشت $Gibco$ Penicillin/Streptomycin (۱ درصد + $Gibco$) FBS + $Gibco$ DMEM (۱۰ درصد + $Gibco$) در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، CO_2 (۵ درصد و رطوبت نسبی کشت داده شد (۱۵). با تعویض محیط کشت بعد از ۲۴ ساعت، سلول‌های اضافی تخلیه گردید (شکل ۱).

منابع سلولی مختلفی نظیر سلول‌های بنیادی مشتق از چربی و سلول‌های بنیادی مغز استخوان استفاده می‌شود.

در گذشته، سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان به عنوان اصلی‌ترین منبع، برای مهندسی بافت محسوب می‌شدند، اما امروزه سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی به دلیل روش دستیابی آسان و حالت مهاجمی کم و پتانسیل کندروژنیک بالا، به عنوان یکی از منابع سلول‌های بنیادی در مهندسی بافت به صورت گسترده استفاده می‌شوند (۴). بنا بر این، در مطالعه‌ی حاضر، سلول‌های بنیادی از بافت چربی زیر جلدی انسانی ناحیه‌ی شکم جدا و کشت گردید و برای القای کندروژنز مورد استفاده قرار گرفت.

مواد زیستی، نقش اساسی در مهندسی بافت دارند. جهت ترمیم یا درمان بافت‌ها، از داربست‌های طبیعی و مصنوعی استفاده می‌شود (۵). داربست باید زیست‌تخریب‌پذیر، زیست‌سازگار و متخلخل باشد و شرایط مناسب برای چسبندگی، تکثیر و مهاجرت سلولی را فراهم کند (۶، ۷).

داربست کامپوزیتی فیرین آلژینات، یکی از داربست‌های طبیعی است که از زیست‌سازگاری و پایداری مناسبی برخوردار است و تهیه آن نیز آسان است. این داربست، از ترکیب فیرین و آلژینات به دست می‌آید (۸). داربست فیرین از فیبرینوزن و ترومین ساخته می‌شود و از لحاظ سازگاری زیستی، مناسب است و خاصیت ویسکوالاستیسیته‌ی ($Viscoelasticity$) منحصر به فردی دارد، اما از لحاظ پایداری ضعیف است و سریع تخریب می‌شود (۹).

با ترکیب این داربست با آلژینات، می‌توان پایداری داربست را افزایش داد. آلژینات، از جلبک‌های قهوه‌ای به دست می‌آید و در حالت زل، دارای تخلخل است و انتشار ماکرومولکول‌ها را تسهیل می‌نماید، اما از لحاظ خاصیت کشسانی ($Elasticity$) ضعیف و شکننده است؛ با ترکیب این داربست با فیرین، می‌توان کشسانی آن را افزایش داد (۱۰).

عوامل رشد، نقش مهمی را در تکثیر، آپوئوز و تمایز سلولی و همچنین، تنظیم چرخه‌ی سلولی و سیستم ایمنی دارند. از میان این عوامل، می‌توان به خانواده‌ی $TGF-\beta$ Transforming growth factor beta اشاره کرد که به طور وسیعی در مهندسی بافت غضروف استفاده می‌شود. مطالعات نشان داده است، این عوامل موجب بیان یک سری از ژن‌ها از جمله کلاژن II و اگرکان و ساخت گلیکوز آمینو گلیکان‌ها می‌شوند (۱۱، ۱۲). $TGF-\beta s$ اثر القای کننده در کندروژنز $Bone\ marrow\ mesenchymal\ stem\ cells$ (BM-MSCs) و $Adipose\ derived\ stem\ cells$ (ADSCs) دارند. با این حال، عوامل رشد علاوه بر قیمت زیاد و نیمه‌ی عمر کوتاه (۷۲ تا ۲۴ ساعت)، بر هایپرتروفه شدن کندروسیت‌ها نیز تأثیر دارند (۱۳).

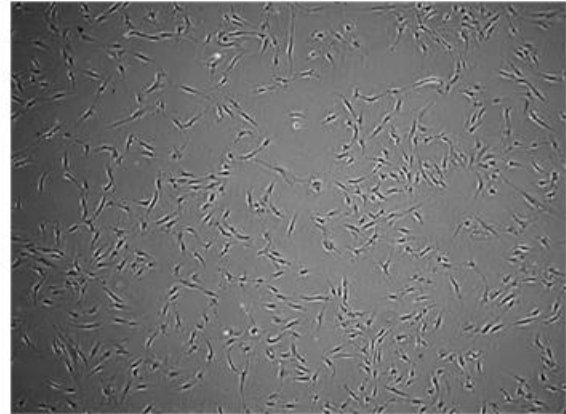
بانک خون استان اصفهان تهیه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس سطح خارجی کیسه با الکل ۷۰ درصد ضد عفونی گردید و تحت شرایط استریل با استفاده از سرنگ ۱۰ سی‌سی، محتویات درون آن کشیده شد (۱۸).

تهیه آلزینات: جهت تهیه آلزینات، ۱/۵ گرم پودر آلزینات (Sigma) در ۱۰۰ میلی‌لیتر کلرید سدیم ۰/۹ درصد حل گردید و سپس با فیلتر ۰/۲ میکرومتر استریل شد (۱۹).

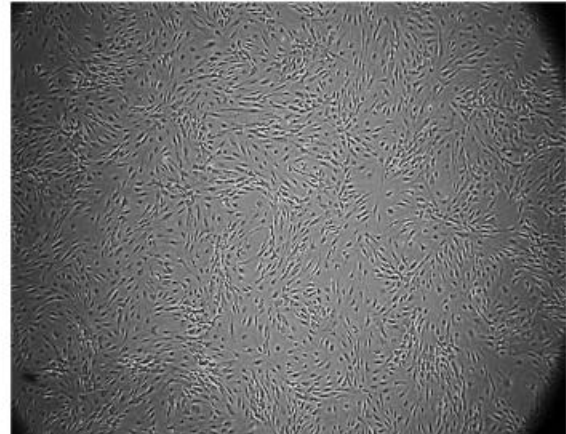
انتقال سلول‌ها به داربست فیبرین آلزینات: پس از جدا کردن سلول‌های حاصل از پاساز سوم از فلاسک‌ها، سوسپانسیون سلولی شمارش شد. به ازای هر ۵ میلیون سلول، ۱ سی‌سی آلزینات ۱/۵ درصد اضافه شد. سپس، سوسپانسیون سلول آلزینات به آرامی از طریق نیدل Gauge ۲۳ به محلول ۱۰۲ میلی‌مولار کلسیم کلرید (Merck) موجود در پلیت ۲۴ خانه اضافه شد. پس از این که محلول را به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار دادیم، بیدهای آلزینات تشکیل گردید. آن گاه، کلسیم کلرید خارج شد و بیدها سه مرتبه با استفاده از سدیم کلرید ۰/۹ درصد شستشو شدند (۱۹). سپس، به هر خانه ۳۰۰ میکرولیتر فیبرینوزن و ۳۰۰ میکرولیتر ترومبین اضافه گردید. پس از چند دقیقه، لخته فیبرین حاوی آلزینات پدید سلول تشکیل شد.

تمایز کندروژنیک روی داربست فیبرین آلزینات: تعداد 1×10^5 سلول بنیادی کشت شده در داربست فیبرین آلزینات تحت تأثیر محیط کشت القای کندروژنیک حاوی DMEM high glucose (Gibco)، Penicillin/Streptomycin (Gibco) ۱ درصد، ITS (Gibco)، 10^{-8} Dexamethasone (Sigma)، Selenium و Transferrin, Insulin (Sigma) ۱ درصد، BSA Bovine serum albumin (Sigma) ۵۰، Ascorbate 2 phosphate (ASP) (Sigma) میکروگرم بر میلی‌لیتر و Linoleic acid (Sigma) به کاندروسیت تمایز داده شد. در گروه اول محیط کشت کندروژنیک دارای ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر TGF- β 1، در گروه دوم محیط کشت کندروژنیک دارای ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر Piasclidin و در گروه سوم محیط کشت کندروژنیک دارای هر دو عامل پیش‌گفته و مدت القای محیط کشت، ۲۱ روز بود.

روش انجام تکنیک MTT: در روز ۲۱، ابتدا محیط کشت چاهک‌ها تخلیه گردید و داربست با Phosphate buffered saline (PBS) شستشو داده شد. سپس ۴۰۰ میکرولیتر DMEM high glucose خالص و ۴۰ میکرولیتر محلول ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide] (Sigma) (MTT) اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور با حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ CO₂ درصد قرار داده شد. سپس،



a



b

شکل ۱. تصویر میکروسکوپ اینورت از سلول‌های بنیادی مشتق از چربی زنده در کشت تک لایه‌ای در پاساز سوم (بزرگ‌نمایی $\times 40$) (a) روز دوم و (b) روز ششم

تهیه ترکیب گیاهی پیاسکلیدین: یک کپسول ۳۰۰ میلی‌گرمی محتوی ترکیب گیاهی پیاسکلیدین (پرایین پارس) در ۳۰ میلی‌لیتر اتانول خالص حل گردید تا غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به عنوان محلول ذخیره به دست آید. سپس جهت القای تمایز با استفاده از محیط کشت غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد.

تهیه ترومبین: جهت تهیه ترومبین، یک کیسه Fresh frozen plasma (FFP) از بانک خون استان اصفهان تهیه شد. سپس محتویات آن در داخل دستگاه بن ماری ذوب گردید. آن گاه، با سرنگ، محتویات داخل کیسه به داخل لوله‌ی فالکون ۵۰ میلی‌لیتری منتقل و به هر لوله‌ی فالکون ۱ ویال ۱۰ میلی‌لیتری آمپول گلوکونات کلسیم اضافه شد. پس از ۹۰ تا ۶۰ دقیقه انکوباسیون، با شتاب ۱۴۰۰ به مدت ۸ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی حاوی ترومبین در حجم ۱ میلی‌لیتر الیکوت و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۷).

تهیه فیبرینوزن: کیسه Cryoprecipitate به صورت آماده از

جدول ۱. زن‌ها و پرایمرهای به کار رفته در

(Real-time PCR) Real-time polymerase chain reaction

نام زن	توالی پرایمرها
Col II-F	CTGGTGATGATGGTGAAG
Col II-R	CCTGGATAACCTCTGTGA
Agre-F	GTGGGACTGAAGTTCCTTG
Agre-R	GTTGTCATGGTCTGAAGTT
GAPDH-F	AAGCTCAATTCCTGGTATG
GAPDH-R	CTTCCTCTTGTGCTCTTG
Col X-F	AGAATCCATCTGAGAATAATGC
Col X-R	AGAATCCATCTGAGAATAATGC

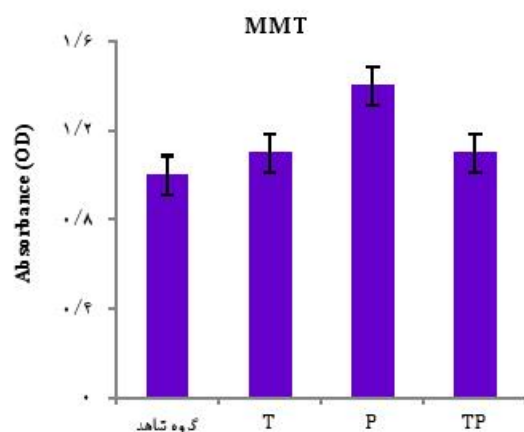
F: Forward, R: Revers; Col II: Type II Collagen, Agre: Aggrecan; Col X: Type X Collagen; GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

برای بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها، از آزمون Kolmogorov-Smirnov و برای آنالیز داده‌ها از آزمون‌های One-way ANOVA و LSD post hoc (Least significant difference) و نرم‌افزار آماری SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) استفاده گردید.

یافته‌ها

بررسی نتایج بقا و تکثیر سلول‌های بنیادی

به دنبال استفاده از محلول MTT، مشخص شد پیاسکلیدین، میزان تکثیر و بقای ADSCs تمایز یافته به کندروسیت را افزایش داد، اما تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها با گروه شاهد دیده نشد ($P > 0.05$) (شکل ۲).



شکل ۲. مقایسه‌ی نتایج MTT [2,5-dimethylthiazol-2-yl]-3

[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2-bromide در گروه‌های مورد مطالعه:

تفاوت معنی‌داری بین این گروه‌ها با گروه شاهد وجود ندارد

($P > 0.05$)

T: $TGF-\beta_1$; P: Piascladine, TP: $TGF-\beta_1$ + piascladine

صایع تخلیه و ۴۰۰ میکرولیتر Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma) به جامک‌ها اضافه گردید و به مدت دو ساعت در تاریکی و دمای اتاق فرار داده شد. در انتها، ۱۰۰ میکرولیتر از هر جامک، به پلیت ۹۶ خانه متفصل و میزان جذب نوری (Optical density یا OD) با دستگاه (Hyperion MPR4) (Enzyme-linked immunosorbent assay) ELISA Reader طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. برای هر نمونه سه بار تکرار (Triplicate) صورت گرفت (۲۱، ۲۰).

روش انجام تکنیک Real-time PCR از روش Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) برای ارزیابی بیان زن‌های مربوط به مولکول‌های ماتریکس ویژه‌ی غضروف استفاده شد. در روز ۲۱، ابتدا داربست فیبرین آلژینات با PBS شستشو داده شد. سپس، جهت تجزیه‌ی بیدهای آلژینات، ۵۵ میلی‌مولار سدیم سیترات ۱/۵ درصد (Sharlau) و ۰/۹ درصد سدیم کلرید (Merck) اضافه گردید و محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه و با شتاب ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید.

سلول‌های حاصل، جهت استخراج RNA با کیت RNeasy mini kit (Qiagen, Cat. No. 74101) مورد استفاده قرار گرفتند. ساخت Complementary DNA (cDNA) با استفاده از پرایمرهای Oligo و RevertAid™ First Strand cDNA synthesis kit انجام شد. به این ترتیب که ۱۰ میکرولیتر RNA استخراج شده، ۱ میکرولیتر Ribonuclease inhibitor، Oligo Deoxynucleoside triphosphate (dNTP) و آنزیم Revertanscriptase به کار رفت. برای تکثیر cDNAهای ساخته شده، ۱۰ x buffer به میزان ۲/۵ میکرولیتر، dNTP ۱۰ میلی‌مولار به مقدار ۰/۵ میکرولیتر، FPrimer به میزان ۱ میکرولیتر، Rprimer به میزان ۱ میکرولیتر، نمونه‌ی DNA تهیه شده به میزان ۲ میکرولیتر، Taq polymerase enzyme به میزان ۰/۵ میکرولیتر و dd H₂O افزوده شد تا حجم نهایی به ۲۵ میکرولیتر رسید.

سپس، تکثیر در چند برنامه انجام شد. برنامه‌ی اول برای Denaturation در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه شروع شد. Denaturation در ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه، Annealing در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای یک دقیقه و Extension در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای یک دقیقه ادامه یافت. کل این فرایندها در ۴۰ چرخه صورت گرفت (۲۴، ۲۲).

در پایان، منحنی ذوب (Melt curve) رسم شد. این برنامه برای هر سه زن به کار رفت. همه‌ی پرایمرهای مورد استفاده در Real-time PCR، با به کارگیری نرم‌افزار Allele ID 7.6 طبق جدول ۱ طراحی شد.

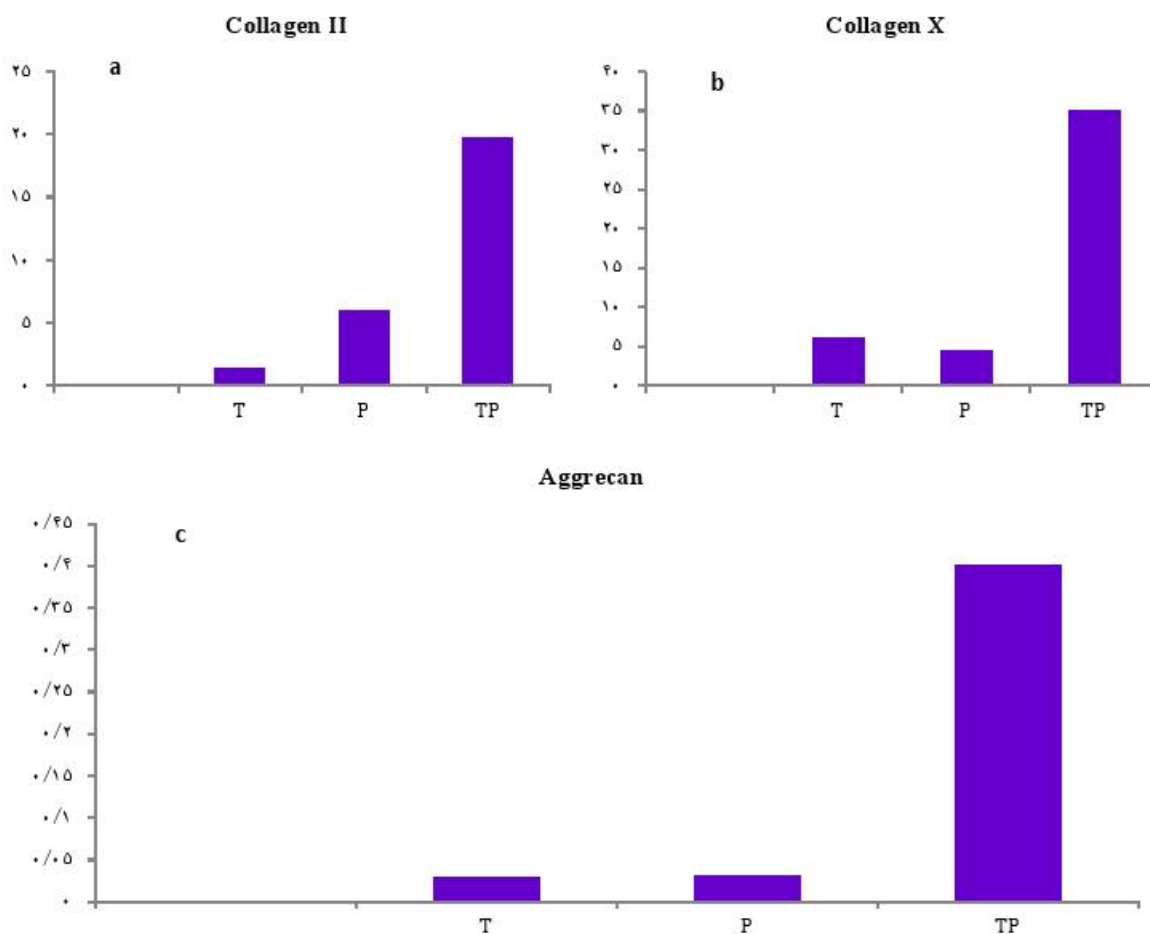
بحث

در مهندسی بافت، جهت طراحی بافت غضروف وجود تراکم سلولی بالا و تعامل بین سلولی مناسب، ضروری است و از طریق کشت سلول‌ها بر روی داربست سه بعدی، می‌توان تعامل بین سلولی مناسب جهت القای کندروژنز را فراهم کرد. لازم به ذکر است که عوامل رشد نیز جهت القای کندروژنز ضروری هستند (۲۶، ۲۵).

جهت تمایز کندروژنیک، از داربست‌های گوناگونی استفاده شده است که هر یک، معایب و مزایایی دارند. داربست‌های مصنوعی، زیست‌سازگاری خوبی ندارند و تهیهی آن‌ها مشکل است، اما از لحاظ ویژگی‌های مکانیک مناسب هستند. داربست‌های طبیعی نیز دارای معایبی نظیر پایداری کم هستند (۲۸، ۲۷).

Real-time PCR

نتایج Real-time PCR نشان داد که بیان ژن کلاژن II در روز ۲۱ در گروه TGF- β 1 + پیاسکلیدین نسبت به گروه TGF- β 1 به تنهایی، حدود ۱۴ برابر و بیان این ژن در گروه پیاسکلیدین در مقایسه با گروه TGF- β 1 حدود ۵ برابر بود ($P < 0/001$) (شکل ۳ a). بیان ژن کلاژن X در گروه پیاسکلیدین کمتر از گروه TGF- β 1 شد ($P > 0/050$) (شکل ۳ b). همچنین، بیان ژن آگریکان در گروه TGF- β 1 و گروه پیاسکلیدین به طور تقریبی با هم برابر شد و بیان این ژن در گروه TGF- β 1 + پیاسکلیدین نسبت به گروه‌های TGF- β 1 و پیاسکلیدین حدود ۱۳ برابر بیشتر گردید ($P < 0/001$) (شکل ۳ c).



شکل ۳. نتایج Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) برای ژن کلاژن II (a)، کلاژن X (b) و آگریکان (c) در روز ۲۱. مقادیر

میانگین \pm انحراف معیار مربوط به سه آزمایش است.

علامت *** نشان دهندهی معنی‌دار بودن اختلاف گروه‌ها با یکدیگر است ($P < 0/001$)، (b) هر سه گروه نسبت به یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارند. (b): اختلاف گروه پیاسکلیدین و

TGF- β 1 با دو گروه دیگر معنی‌دار است. (c): اختلاف گروه پیاسکلیدین و TGF- β 1 با دو گروه دیگر معنی‌دار است

P: گروه تحت تأثیر پیاسکلیدین؛ T: گروه تحت تأثیر TGF- β 1؛ TP: گروه تحت تأثیر پیاسکلیدین و TGF- β 1

(RQ) Relative quantity: نشان دهندهی میزان نسبی بیان ژن‌ها است.

نسبت به گروه دارای TGF- β 1 بیشتر می‌باشد و بیان ژن آگریکان در گروه حاوی پیاسکلیدین نسبت به گروه دارای TGF- β 1 به طور تقریبی برابر است. لازم به ذکر است جهت دستیابی به غضروف هیالین، باید در شرایط القای کندروژنز سلول‌های بنیادی، بیان ژن کلاژن نوع X کاهش یابد تا از هایپرتروفه شدن جلوگیری به عمل آید.

در مطالعه‌ی حاضر مشخص شد که بیان این ژن در گروه پیاسکلیدین کمتر از گروه TGF- β 1 بوده است. با مقایسه‌ی بیان ژن‌های آگریکان، کلاژن II و X، می‌توان به این نتیجه پی برد که پیاسکلیدین، قادر است بهتر و بیشتر از عامل رشد TGF- β 1 در القای سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی مؤثر واقع شود. لازم به ذکر است در زمینه‌ی بررسی تأثیر پیاسکلیدین در تمایز سلول‌های بنیادی تا زمان اجرای مطالعه‌ی حاضر، مطالعه‌ی منتشر نشده بود.

همچنین، مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که TGF- β 1 به همراه پیاسکلیدین در بیان ژن‌های کلاژن II و آگریکان تأثیر بسیار چشمگیری داشته است. به طوری که میزان بیان ژن کلاژن نوع II در گروه TGF- β 1 به همراه پیاسکلیدین به میزان ۳ برابر بیشتر از گروه حاوی پیاسکلیدین و ۱۴ برابر بیشتر از گروه حاوی TGF- β 1 است و همچنین، میزان بیان ژن آگریکان در گروه TGF- β 1 به همراه پیاسکلیدین، به میزان ۱۳ برابر بیشتر از گروه‌های TGF- β 1 و پیاسکلیدین است. بر اساس این نتایج، احتمال می‌رود پیاسکلیدین اثر تحریکی روی TGF- β 1 داشته باشد. این یافته‌ها با نتایج مطالعه‌ی Altinel و همکاران همخوانی دارد (۳۵).

همراهی دو عامل TGF- β 1 و پیاسکلیدین، همچنین باعث افزایش بیان ژن کلاژن X عامل هایپرتروفه شدن کندروسیت‌ها به میزان ۷ برابر نسبت به پیاسکلیدین شد که این اثر منفی نیز به دلیل وجود TGF- β 1 می‌باشد.

از تحقیق حاضر، می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در داربست فیبرین آلژینات، تحت تأثیر پیاسکلیدین قابلیت تمایز به کندروسیت‌هایی را دارند که ژن‌های ویژه غضروف‌ساز مانند کلاژن نوع II و آگریکان را بیان می‌کنند. این نتایج نشان می‌دهد که این ترکیب گیاهی در مقایسه با عامل رشد TGF- β 1 تأثیر بهتری در روند القای کندروژنز دارد.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد هادی دیده‌دور با شماره‌ی ۳۹۴۲۶۳ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است. از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان جهت حمایت و تأمین بودجه‌ی این طرح سپاسگزار می‌گردم.

داربست کامپوزیتی فیبرین آلژینات، یکی از داربست‌های طبیعی است که از زیست‌سازگاری و پایداری مناسبی برخوردار است و تهیه‌ی آن نیز آسان است. این داربست، از ترکیب داربست فیبرین و آلژینات به دست می‌آید (۲۹). داربست فیبرین، از فیبرینوزن و ترومین ساخته می‌شود و از لحاظ سازگاری زیستی، مناسب است و خاصیت ویسکوالاستیک منحصر به فردی دارد اما از لحاظ پایداری ضعیف است و سریع تخریب می‌شود. با ترکیب این داربست با آلژینات، می‌توان پایداری داربست را افزایش داد (۳۰، ۲۹).

آلژینات، از جلبک‌های قهوه‌ای یا از کپسول‌های پلی‌ساکاریدی باکتری‌ها به دست می‌آید. پلی‌ساکارید طبیعی آلژینات، در شرایط آزمایشگاه بدون نیاز به وجود حلال‌های آلی به راحتی به حالت ژل در می‌آید و تهیه‌ی آن نیاز به تغییر pH، حرارت یا فعال‌کننده‌های سمی ندارد و در حالت ژل، دارای تخلخل است و انتشار ماکرومولکول‌ها را تسهیل می‌نماید، اما از لحاظ خاصیت کشسانی ضعیف و شکننده است که با ترکیب این داربست با فیبرین، می‌توان کشسانی آن را افزایش داد (۳۳، ۳۱).

در واقع، جهت ایجاد تعادل بین روند تخریب‌پذیری و خاصیت کشسانی، می‌توان از ترکیبی از فیبرین و آلژینات به عنوان ماده‌ی زمینه‌ی خارج سلولی بستی مناسب برای رشد سلول‌ها فراهم نمود. Ma و همکاران برای کندروژنز سلول‌های Bone marrow stromal cells (BMSCs) از داربست ترکیبی فیبرین آلژینات استفاده کردند و نشان دادند که فیبرین، قدرت کشسانی داربست و همچنین، تکثیر سلولی را افزایش می‌دهد و آلژینات، ثبات و بیان ژن‌های کندروسیت و تولید اجزای ماتریکس خارج سلولی را پس از تمایز افزایش می‌دهد (۳۴).

در مطالعه‌ی حاضر، زمانی که پیاسکلیدین، TGF- β 1 و ترکیب هر دوی آن‌ها در سه محیط کشت جداگانه اضافه شدند، میزان تکثیر و بقا در گروه پیاسکلیدین نسبت به گروه‌های دیگر بیشتر گردید اما این افزایش، معنی‌دار نبود ($P > 0.05$).

نتایج به دست آمده، مشابه نتایج مطالعات Shikanov و همکاران (۸) و نیز Ma و همکاران (۳۴) بود. آن‌ها مشخص نمودند که بقا و تکثیر BMSCs در داربست فیبرین آلژینات حفظ می‌شود.

در تحقیق حاضر، آنالیز Real-time PCR برای بیان ژن‌های کلاژن II و X و آگریکان برای سلول‌های بنیادی مشتق از چربی پس از کشت در محیط کشت کندروژنیک طی ۲۱ روز در داربست فیبرین آلژینات در حضور پیاسکلیدین، TGF- β 1 و ترکیب هر دوی آن‌ها به صورت جداگانه مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت، مشخص شد که بیان ژن کلاژن نوع II به میزان ۵ برابر در گروه حاوی پیاسکلیدین

References

- Hardingham T, Tew S, Murdoch A. Tissue engineering: Chondrocytes and cartilage. *Arthritis Res* 2002; 4(Suppl 3): S63-S68.
- Mitchell N, Shepard N. The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone. *J Bone Joint Surg Am* 1976; 58(2): 230-3.
- Mardani M, Hashemibeni B, Ansar MM, Zarkesh Esfahani SH, Kazemi M, Goharian V, et al. Comparison between chondrogenic markers of differentiated chondrocytes from adipose derived stem cells and articular chondrocytes in vitro. *Iran J Basic Med Sci* 2013; 16(6): 763-73.
- Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(14): 7841-5.
- Breen A, Dockery P, O'Brien T, Pandit A. Fibrin scaffold promotes adenoviral gene transfer and controlled vector delivery. *J Biomed Mater Res A* 2009; 89(4): 876-84.
- Chen G, Ushida T, Tateishi T. A biodegradable hybrid sponge nested with collagen microsponges. *J Biomed Mater Res* 2000; 51(2): 273-9.
- 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.
- Shikanov A, Xu M, Woodruff TK, Shea LD. Interpenetrating fibrin-alginate matrices for in vitro ovarian follicle development. *Biomaterials* 2009; 30(29): 5476-85.
- Zhou H, Xu HH. The fast release of stem cells from alginate-fibrin microbeads in injectable scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2011; 32(30): 7503-13.
- Morris VJ. Gelation of polysaccharides. In: Mitchell JR, Ledward DA, editors. *Functional properties of food macromolecules*. New York, NY: Elsevier; 1986. p. 121-8.
- Hashemibeni B, Razavi Sh, Esfandiary E, Karbasi S, Mardani M, Sadeghi F, et al. Effect of transforming growth factor- β 3 and bone morphogenetic protein-6 growth factors on chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells in alginate scaffold. *J Isfahan Med Sch* 2010; 28(112): 607-20. [In Persian].
- Hashemibeni B, Razavi Sh, Esfandiary E, Karbasi S, Mardani M, Nasresfahani M. Induction of chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells with TGF- β 3 in pellet culture system. *Iran J Basic Med Sci* 2008; 11(1): 10-7.
- Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260(5110): 920-6.
- Henrotin YE, Labasse AH, Jaspard JM, de Groote DD, Zheng SX, Guillou GB, et al. Effects of three avocado/soybean unsaponifiable mixtures on metalloproteinases, cytokines and prostaglandin E2 production by human articular chondrocytes. *Clin Rheumatol* 1998; 17(1): 31-9.
- Mauviel A, Daireaux M, Hartmann DJ, Galera P, Loyau G, Pujol JP. Effects of unsaponifiable extracts of avocado/soy beans (PIAS) on the production of collagen by cultures of synoviocytes, articular chondrocytes and skin fibroblasts. *Rev Rhum Mal Osteoartic* 1989; 56(2): 207-11. [In French].
- Hunter DJ. Pharmacologic therapy for osteoarthritis--the era of disease modification. *Nat Rev Rheumatol* 2011; 7(1): 13-22.
- Sadeghian M, Hashemibeni B, Mardani M, Amirpoor N, Aliakbari M. Comparing the effect of platelet rich plasma (PRP) and fetal bovine serum (FBS) on proliferation and survival of adipose-derived stem cells in fibrin scaffolds. *J Isfahan Med Sch* 2015; 32(317): 2299-2311. [In Persian].
- Yang SH, Wu CC, Shih TT, Chen PQ, Lin FH. Three-dimensional culture of human nucleus pulposus cells in fibrin clot: Comparisons on cellular proliferation and matrix synthesis with cells in alginate. *Artif Organs* 2008; 32(1): 70-3.
- Valiani A, Hashemibeni B, Esfandiary E, Ansar MM, Kazemi M, Esmaeili N. Study of carbon nano-tubes effects on the chondrogenesis of human adipose derived stem cells in alginate scaffold. *Int J Prev Med* 2014; 5(7): 825-34.
- Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* 1999; 20(1): 45-53.
- Wang ZY, Zhang QZ, Konno M, Saito S. Sol-gel transition of alginate solution by the addition of various divalent cations: 13C-nmr spectroscopic study. *Biopolymers* 1993; 33(4): 703-11.
- Esfandiary E, Valiani A, Hashemibeni B, Moradi I, Narimani M. The evaluation of toxicity of carbon nanotubes on the human adipose-derived-stem cells in-vitro. *Adv Biomed Res* 2014; 3: 40.
- Yan J, Dong L, Zhang B, Qi N. Effects of extremely low-frequency magnetic field on growth and differentiation of human mesenchymal stem cells. *Electromagn Biol Med* 2010; 29(4): 165-76.
- Creedy CM, O'Neill CF, Arulanandam BP, Sylvia VL, Navara CS, Bizios R. Mesenchymal stem cell osteodifferentiation in response to alternating electric current. *Tissue Eng Part A* 2013; 19(3-4): 467-74.
- Ruettger A, Neumann S, Wiederanders B, Huber R. Comparison of different methods for preparation and characterization of total RNA from cartilage samples to uncover osteoarthritis in vivo. *BMC Res Notes* 2010; 3: 7.
- Kuo CK, Li WJ, Mauck RL, Tuan RS. Cartilage tissue engineering: its potential and uses. *Curr Opin Rheumatol* 2006; 18(1): 64-73.
- Guilak F, Cohen DM, Estes BT, Gimble JM, Liedtke W, Chen CS. Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix. *Cell Stem Cell* 2009; 5(1): 17-26.
- 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.

29. Zhao L, Weir MD, Xu HH. An injectable calcium phosphate-alginate hydrogel-umbilical cord mesenchymal stem cell paste for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2010; 31(25): 6502-10.
30. Buser Z, Liu J, Thome KJ, Coughlin D, Lotz JC. Inflammatory response of intervertebral disc cells is reduced by fibrin sealant scaffold in vitro. *J Tissue Eng Regen Med* 2014; 8(1): 77-84.
31. Chien CS, Ho HO, Liang YC, Ko PH, Sheu MT, Chen CH. Incorporation of exudates of human platelet-rich fibrin gel in biodegradable fibrin scaffolds for tissue engineering of cartilage. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2012; 100(4): 948-55.
32. 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.
33. Stevens MM, Marini RP, Martin I, Langer R, Prasad S, V. FGF-2 enhances TGF-beta1-induced periosteal chondrogenesis. *J Orthop Res* 2004; 22(5): 1114-9.
34. Ma HL, Hung SC, Lin SY, Chen YL, Lo WH. Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulated in alginate beads. *J Biomed Mater Res A* 2003; 64(2): 273-81.
35. Altinel L, Saritas ZK, Kose KC, Pamuk K, Aksoy Y, Serteser M. Treatment with unsaponifiable extracts of avocado and soybean increases TGF-beta1 and TGF-beta2 levels in canine joint fluid. *Tohoku J Exp Med* 2007; 211(2): 181-6.

Comparing the Effects of Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF-β1) and Piascladine on the Expression of Collagen II, X and Aggrecan Genes in Chondrogenesis of human Adipose-Derived Stem Cells in Fibrin Alginate Composite Scaffold

Hadi Didehvar¹, Farhad Golshan-Iranpoor², Ali Valiani², Batool Hashemibeni³, Mojtaba Esmaceli¹

Original Article

Abstract

Background: Cartilage injuries are the leading cause of disability in the elderly in developed countries. In addition, articular cartilage has a limited ability to repair. Current treatment methods for cartilage tissue injuries lead to fibrous tissue formation. Cell therapy is a treatment in which stem cells using tissue engineering can be differentiated into chondrocytes by using growth factors and scaffolds. Since growth factors such as transforming growth factor beta1 (TGF-β) leads to hypertrophy of cartilage chondrocytes tissue and many scaffolds are weak in terms of mechanics and stability, it is essential to achieve the appropriate scaffolds and inducing factors. Studies have shown that fibrin alginate scaffold is appropriate in terms of mechanical and stability and piascladine increases the cartilage-specific genes expression. Therefore, in this study the chondrogenic effect of TGF-β1 and piascladine on adipose derived stem cells in fibrin alginate scaffold was compared and evaluated.

Methods: Fat samples were obtained from three persons. Adipose derived stem cells (ADSCs) was extracted from adipose tissue and proliferated. Then the cells were transferred to the fibrin alginate scaffold and the cells were cultured for 21 days under the influence of the induction medium. The rate of proliferation and survival of cells was evaluated by [3 (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide] MTT method and the rate of gene expression of Aggrecan and Collagen II and X was evaluated with Real-time polymerase chain reaction (Real-Time PCR) method.

Findings: The results showed that proliferation rate and survival of cells in a fibrin alginate scaffold in the group containing Piascladine increased compared to the other groups, but this increase is not significant ($P > 0.050$). Also, Piascladine increased collagen II gene expression ($P < 0.001$) and reduced collagen X gene expression when compared to TGF-β1.

Conclusion: Piascladine was found as a proper effective inducer in chondrogenic differentiation of human adipose derived stem cells cultured in fibrin alginate scaffold.

Keywords: Adipose derived stem cell, Piascladine, Chondrogenesis, Transforming growth factor beta1

Citation: Didehvar H, Golshan-Iranpoor F, Valiani A, Hashemibeni B, Esmaceli M. **Comparing the Effects of Transforming Growth Factor Beta1 (TGF-β1) and Piascladine on the Expression of Collagen II, X and Aggrecan Genes in Chondrogenesis of human Adipose-Derived Stem Cells in Fibrin Alginate Composite Scaffold.** J Isfahan Med Sch 2016; 34(373): 157-65

1- MSc Student, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Batool Hashemibeni, Email: hashemibeni@med.mui.ac.ir