مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و چهارم/شماره‌ی ۳۷۳/هفته‌ی اول اردیبهشت ماه ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۳

مقایسه‌ی تأثیر دو عامل Transforming Growth Factor Beta1 (TGF-ß1) و پیاسکلیدین بر بیان ژن‌های کلاژن II، X و اگریکان در روند کندروژنز سلول‌های بنیادی مشتق از چربی انسان در داربست کامپوزیتی فیبرین آلژینات

هادی دیده‌ور[۱]، فرهاد گلشن ایران‌پور[۲]، علی والیانی[۲]، بتول هاشمی بنی[۳]، 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، فیبرین 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 فیبرین 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 فیبرین 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 فیبرین آلژینات، در گروه حاوی پیاسکلیدین نسبت به سایر گروه‌ها، افزایش داشت؛ اما این افزایش به صورت معنی‌دار نبود ($P > ۰/۰۵۰$). همچنین، پیاسکلیدین باعث افزایش میزان بیان ژن کلاژن II ($P < ۰/۰۰۱$) و کاهش میزان بیان ژن کلاژن X در مقایسه با TGF-β1 گردید.

نتیجه‌گیری: احتمال می‌رود پیاسکلیدین در روند القای کندروژنز ADSCs در داربست فیبرین 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-ß1) و پیاسکلیدین بر بیان ژن‌های کلاژن II، X و اگریکان در روند کندروژنز سلول‌های بنیادی مشتق از چربی انسان در داربست کامپوزیتی فیبرین آلژینات.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۵؛ ۳۴ (۳۷۳): ۱۶۵-۱۵۷

مقدمه

غضروف مفصلی، یکی از بافت‌های همبند 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، ترمیم ضایعات غضروفی با محدودیت زیادی روبه‌رو است (۲-۱).

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

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
نویسنده‌ی مسؤول: بتول هاشمی بنی
Email: hashemibeni@med.mui.ac.ir

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 تهاجمی 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 (۷-۶).

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 فیبرین و آلژینات به دست می‌آید (۸). داربست فیبرین از فیبرینوژن و ترومبین 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 ژل، دارای تخلخل است و انتشار ماکروملکول‌ها را تسهیل می‌نماید، اما از لحاظ خاصیت کشسانی (Elasticity) ضعیف و شکننده است؛ با ترکیب این داربست با فیبرین، می‌توان کشسانی آن را افزایش داد (۱۰).

عوامل رشد، نقش مهمی را در تکثیر، آپوپتوز و تمایز سلولی و همچنین، تنظیم چرخه‌ی سلولی و سیستم ایمنی دارند. از میان این عوامل، می‌توان به خانواده‌ی Transforming growth factor beta (TGF-ß) 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 (۱۲-۱۱). TGF-ßs اثر القا 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 (۷۲-۲۴ ساعت)، بر هایپرتروفه شدن کندروسیت‌ها نیز تأثیر دارند (۱۳).

پیاسکلیدین تهیه شده از عصاره‌ی آواکادو و سویا به نسبت ۱ (آواکادو) 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 مهاری روی کلاژناز نوع II و پروستاگلاندین و اثر تحریکی روی سنتز پروتئوگلیکان‌ها و کلاژن و نیز کاهش سنتز فیبرونکتین، به بازگرداندن ساختمان غضروف به حال طبیعی کمک می‌کند. به علاوه، پیاسکلیدین اثر مهاری بر Interleukin-1 beta (IL-1β) دارد و سبب تحریک سنتز کلاژن II در کندروسیت‌ها می‌گردد (۱۵)؛ همچنین، تولید TGF-β1 را نیز تحریک می‌کند (۱۶).

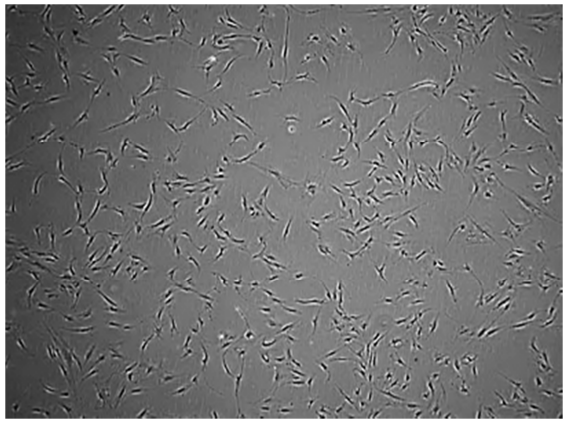
از آن جایی که در روند کندروژنز اثرات منفی TGF-βs و هایپرتروفه شدن بافت غضروفی و ضعیف بودن داربست‌ها مطرح است، در این تحقیق، تأثیر ترکیب گیاهی پیاسکلیدین بر روند القای کندروژنز سلول‌های بنیادی مشتق از چربی انسانی در داربست فیبرین آلژینات با عامل رشد TGF-β1 مورد مقایسه قرار گرفت.

روش‌ها

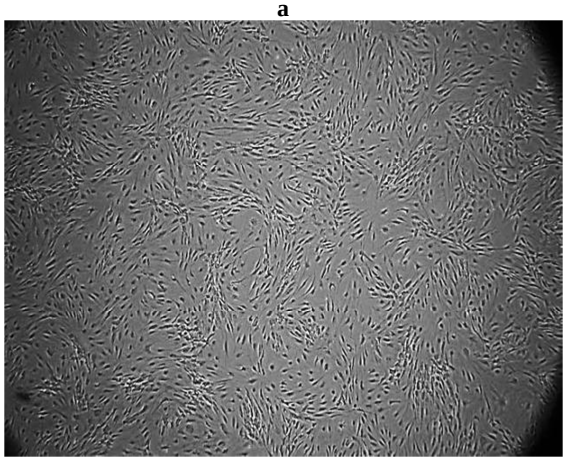
بافت چربی زیر جلدی انسانی از سه نفر با سن ۴۰-۲۵ سال پس از اخذ رضایت کتبی از بیمارستان تهیه شد. پس از توزین، بافت تحت شرایط استریل به قطعات چند میلی‌متری تقسیم شد. جهت تجزیه‌ی بافت، از آنزیم کلاژناز نوع IA (Sigma) به میزان ۱/۵ میلی‌گرم به ازای هر گرم بافت چربی استفاده شد. پس از اضافه شدن مقدار مناسب آنزیم،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

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

در پایان، رسوب سلولی حاصل در فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربع در محیط کشت Penicillin/Streptomycin (Gibco) ۱ درصد + FBS (Sigma) ۱۰ درصد + DMEM (Gibco) در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، Carbon dioxide (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).



a



b

شکل ۱. تصویر میکروسکوپ اینورت از سلول‌های بنیادی مشتق از چربی زنده در کشت تک لایه‌ای در پاساژ سوم (بزرگ‌نمایی ۴۰ ×)
(a: روز دوم و b: روز ششم)

تهیه‌ی ترکیب گیاهی پیاسکلیدین: یک کپسول ۳۰۰ میلی‌گرمی محتوی ترکیب گیاهی پیاسکلیدین (پرآیین 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.

تهیه‌ی ترومبین: جهت تهیه‌ی 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 ۹۰-۶۰ دقیقه انکوباسیون، با شتاب ۱۴۰۰ به مدت ۸ دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول رویی حاوی ترومبین در حجم ۱ میلی لیتر الیکوت و در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۷).

تهیه‌ی فیبرینوژن: کیسه‌ی Cryoprecipitate به صورت آماده از بانک خون استان اصفهان تهیه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۳۷ درجه‌ی 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).

تهیه‌ی آلژینات: جهت تهیه‌ی آلژینات، ۱/۵ گرم پودر آلژینات (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 آلژینات: پس از جدا کردن سلول‌های حاصل از پاساژ سوم از فلاسک‌ها، سوسپانسیون سلولی شمارش شد. به ازای هر ۵ میلیون سلول، ۱ سی‌سی آلژینات ۱/۵ درصد اضافه شد. سپس، سوسپانسیون سلول- آلژینات 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 آلژینات 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 فیبرینوژن و ۳۰۰ میکرولیتر ترومبین اضافه گردید. پس از چند دقیقه، لخته‌ی فیبرین حاوی آلژینات بید- سلول تشکیل شد.

تمایز کندروژنیک روی داربست فیبرین آلژینات: تعداد ۱×۱۰^{۶} سلول بنیادی کشت شده در داربست فیبرین آلژینات تحت تأثیر محیط کشت القای کندروژنیک حاوی DMEM high glucose (Gibco)، Penicillin/Streptomycin (Gibco) ۱ درصد (Gibco)، $۱۰^{-۸}$ مول Dexamethasone (Sigma)، Insulin، Transferrin و Selenium (ITS) ۱ درصد (Sigma)، Bovine serum albumin (BSA) ۱ درصد (Sigma)، ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر Ascorbate 2 phosphate= (ASP) (Sigma) و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر Linoleic acid (Sigma) به کندروسیت تمایز داده شد. در گروه اول محیط کشت کندروژنیک دارای ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر TGF-ß1، در گروه دوم محیط کشت کندروژنیک دارای ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر Piasclidin و در گروه سوم محیط کشت کندوژنیک 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] (MTT) (Sigma) اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور با حرارت ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد قرار داده شد. سپس،

مـایع تخلیـه و ۴۰۰ میکرولیتـر Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma) بـه چاهـک‌هـا اضـافه گردیـد و بـه مـدت دو سـاعت در تاریکی و دمای اتاق قـرار داده شـد. در انتهـا، ۱۰۰ میکرولیتـر از هـر چاهـک، بـه پلیـت ۹۶ خانـه منتقـل و میـزان جـذب نـوری (Optical density یـا OD) بـا دسـتگاه (Hyperion MPR4) ELISA Reader (Enzyme-linked immunosorbent assay) و طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. بـرای هـر نمونـه سـه بـار تکـرار (Triplicate) صورت گرفت (۲۱-۲۰).

روش انجام تکنیک Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR): از روش Real-time PCR، برای ارزیـابی بیـان ژن‌های مربوط به مولکول‌های ماتریکس ویژه‌ی غضروف استفاده شد. در روز ۲۱، ابتدا داربست فیبرین آلژینات با PBS شستشـو داده شـد. سپس، جهت تجزیه‌ی بیدهای آلژینات، ۵۵ میلی‌مولار سدیم سیترات ۱/۵ درصـد (Sharlau) و ۰/۹ درصـد سـدیم کلریـد (Merck) اضـافه گردید و محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه و با شتاب ۱۲۰۰ دور در دقیقـه سانتریفوژ گردید.

سـلول‌هـای حاصـل، جهـت اسـتخراج RNA بـا کیـت RNeasy mini kit (Qiagen, Cat. No. 74101) مـورد اسـتفاده قـرار گرفتنـد. سـاخت DNA Complementary (cDNA) بـا اسـتفاده از پرایمرهـای Oligo و RevertAid™ First Strand cDNA synthesis kit انجام شد؛ به ایـن ترتیـب کـه ۱۰ میکرولیتـر RNA اسـتخراج شـده، ۱ میکرولیتـر Oligo، inhibitor Ribonuclease، Deoxynucleoside triphosphate (dNTP) و آنـزیم Reverstanscriptase به کار رفت. برای تکثیر cDNAهـای سـاخته شده، ۱۰ x buffer به میزان ۲/۵ میکرولیتر، dNTP ۱۰ میلی‌مولار بـه مقدار ۰/۵ میکرولیتر، FPrimer به میـزان ۱ میکرولیتـر، Rprimer بـه میزان ۱ میکرولیتر، نمونه‌ی DNA تهیه شـده بـه میـزان ۲ میکرولیتـر، Taq polymerase enzyme بـه میـزان ۰/۵ میکرولیتـر و dd H2O افزوده شد تا حجم نهایی به ۲۵ میکرولیتر رسید.

سـپس، تکثیـر در چنـد برنامـه انجـام شـد. برنامـه‌ی اول بـرای Denaturation در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد بـه مـدت ۱۰ دقیقـه شروع شد. Denaturation در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیـه، Annealing در دمای ۶۰ درجـه‌ی سـانتی‌گـراد بـرای یـک دقیقـه و Extension در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای یک دقیقـه ادامـه یافـت. کل این فرایندها در ۴۰ چرخه صورت گرفت (۲۴-۲۲).

در پایان، منحنی ذوب (Melt curve) رسم شد. این برنامه بـرای هـر سـه ژن بـه کـار رفـت. همـه‌ی پرایمرهـای مـورد اسـتفاده در Real-time PCR، بـا بـه کـارگیری نـرم‌افـزار Allele ID 7.6 طبـق جدول ۱ طراحی شد.

جدول ۱. ژن‌ها و پرایمرهای به کار رفته در Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR)

نام ژن	توالی پرایمرها
Col II-F	CTGGTGATGATGGTGAAG
Col II-R	CCTGGATAACCTCTGTGA
Agre-F	GTGGGACTGAAGTTCTTG
Agre-R	GTTGTCATGGTCTGAAGTT
GAPDH-F	AAGCTCATTTCCTGGTATG
GAPDH-R	CTTCCTCTTGTGCTCTTG
Col X-F	AGAATCCATCTGAGAATATGC
Col X-R	AGAATCCATCTGAGAATATGC

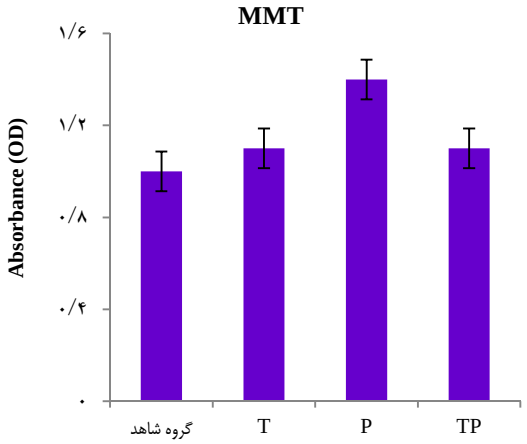
F: Forward; R: Revers; Col II: Type II Collagen; Agre: Aggrecan; Col X: Type X Collagen; GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

از آزمـون Kolmogorov-Smirnov بـرای بررسـی طبیعـی بـودن توزیع داده‌ها، و برای آنالیز داده‌ها از آزمون‌هـای One-way ANOVA و LSD post hoc (Least significant difference) و نـرم‌افـزار آماری SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) استفاده گردید.

یافته‌ها

بررسی نتایج بقا و تکثیر سلول‌های بنیادی

به دنبال استفاده از محلول MTT، مشخص شـد پیاسـکلیدین، میـزان تکثیر و بقای ADSCs تمایز یافته به کندروسـیت را افـزایش داد، امـا تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها با گروه شاهد دیده نشـد ($P > ۰/۰۵۰$) (شکل ۲).



شکل ۲. مقایسه‌ی نتایج MTT [3 (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide] در گروه‌های مورد مطالعه؛ تفاوت معنی‌داری بین این گروه‌ها با گروه شاهد وجود ندارد ($P > ۰/۰۵۰$).

T:TGF-β_1; P: Piascledine; TP: TGF-β_1 + piascledine

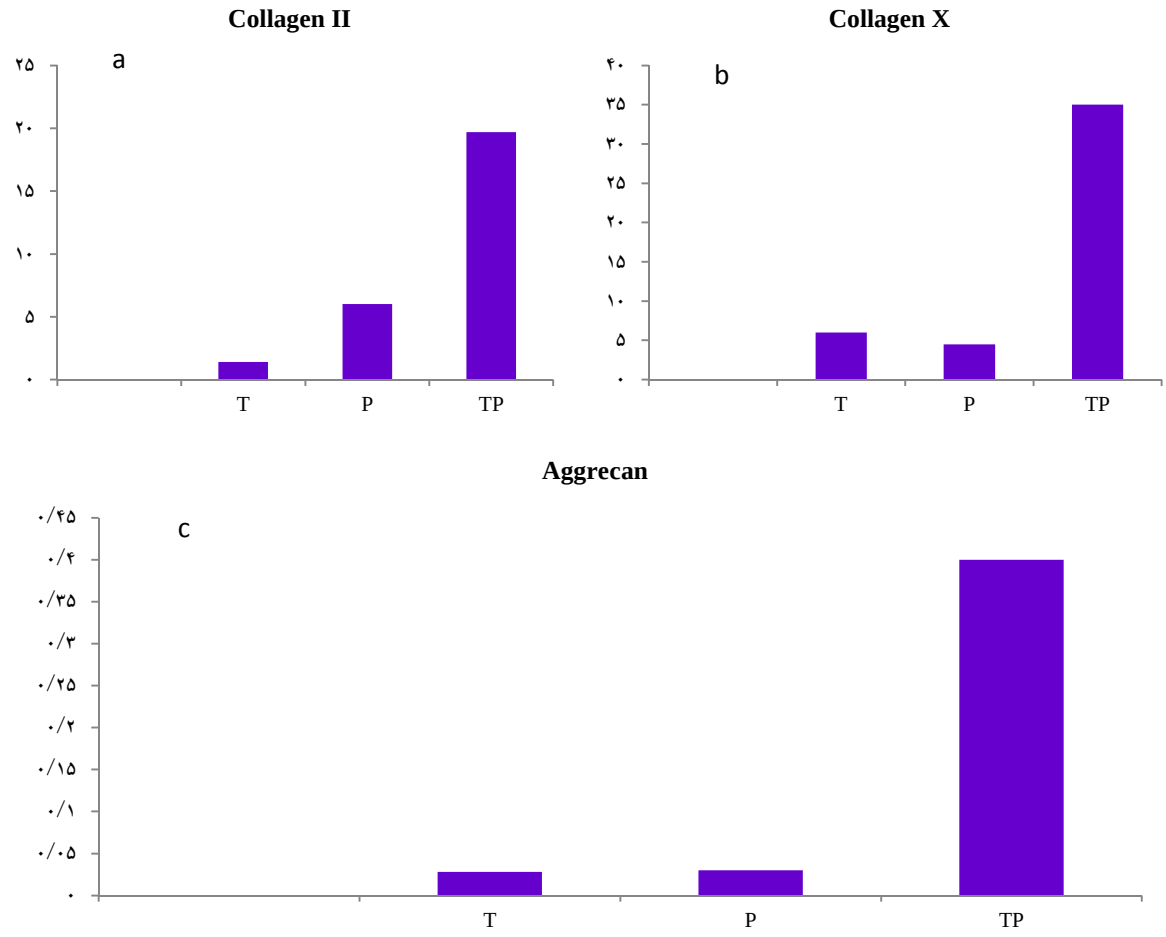
Real-time PCR

نتایج Real-time PCR نشان داد که بیان ژن کلاژن II در روز ۲۱ در گروه TGF-ß1 + پیاسکلیدین نسبت به گروه TGF-ß1 به تنهایی، حدود ۱۴ برابر و بیان این ژن در گروه پیاسکلیدین در مقایسه با گروه TGF-ß1 حدود ۵ برابر بود ($P < ۰/۰۰۱$) (شکل a–۳). بیان ژن کلاژن X در گروه پیاسکلیدین کمتر از گروه TGF-ß1 شد ($P > ۰/۰۵۰$) (شکل b–۳). همچنین، بیان ژن اگریکان در گروه TGF-ß1 و گروه پیاسکلیدین به طور تقریبی با هم برابر شد و بیان این ژن در گروه TGF-ß1 + پیاسکلیدین نسبت به گروه‌های TGF-ß1 و پیاسکلیدین حدود ۱۳ برابر بیشتر گردید ($P < ۰/۰۰۱$) (شکل c–۳).

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).



شکل ۳. نتایج Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) برای ژن کلاژن II (a)، کلاژن X (b) و اگریکان (c) در روز ۲۱. مقادیر میانگین ± انحراف معیار مربوط به سه آزمایش است.

علامت *** نشان دهنده‌ی معنی‌دار بودن اختلاف گروه‌ها با یکدیگر است ($P < ۰/۰۰۱$)، (a): هر سه گروه نسبت به یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارند. (b): اختلاف گروه پیاسکلیدین و TGF-β1 با دو گروه دیگر معنی‌دار است. (c): اختلاف گروه پیاسکلیدین و TGF-β1 با دو گروه دیگر معنی‌دار است

P: گروه تحت تأثیر پیاسکلیدین؛ T: گروه تحت تأثیر TGF-β1؛ TP: گروه تحت تأثیر پیاسکلیدین و TGF-β1.

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

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 فیبرینوژن و ترومبین 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 فعال کننده‌های سمی ندارد و در حالت ژل، دارای تخلخل است و انتشار ماکروملکول‌ها 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 بستری 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-β1 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 ($P > ۰/۰۵۰$).

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 اگریکان برای سلول‌های بنیادی مشتق از چربی پس از کشت در محیط کشت کندروژنیک طی ۲۱ روز در داربست فیبرین آلژینات در حضور پیاسکلیدین، TGF-β1 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 نسبت به گروه دارای TGF-β1 بیشتر می‌باشد و بیان ژن اگریکان در گروه حاوی پیاسکلیدین نسبت به گروه دارای TGF-β1 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-β1 بوده است. با مقایسه‌ی بیان ژن‌های اگریکان، کلاژن II و X، می‌توان به این نتیجه پی برد که پیاسکلیدین، قادر است بهتر و بیشتر از عامل رشد TGF-β1 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، مطالعه‌ای منتشر نشده بود.

همچنین، مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که TGF-β1 به همراه پیاسکلیدین در بیان ژن‌های کلاژن II و اگریکان تأثیر بسیار چشمگیری داشته است؛ به طوری که میزان بیان ژن کلاژن نوع II در گروه TGF-β1 به همراه پیاسکلیدین به میزان ۳ برابر بیشتر از گروه حاوی پیاسکلیدین و ۱۴ برابر بیشتر از گروه حاوی TGF-β1 است و همچنین، میزان بیان ژن اگریکان در گروه TGF-β1 به همراه پیاسکلیدین، به میزان ۱۳ برابر بیشتر از گروه‌های TGF-β1 و پیاسکلیدین است. بر اساس این نتایج، احتمال می‌رود پیاسکلیدین اثر تحریکی روی TGF-β1 داشته باشد. این یافته‌ها با نتایج مطالعه‌ی Altinel و همکاران همخوانی دارد (۳۵).

همراهی دو عامل TGF-β1 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-β1 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 ویژه‌ی غضروف‌ساز مانند کلاژن نوع II و اگریکان را بیان می‌کنند. این نتایج نشان می‌دهد که این ترکیب گیاهی در مقایسه با عامل رشد TGF-β1 تأثیر بهتری در روند القای کندروژنز دارد.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد هادی دیده‌ور 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 سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Hardingham T, Tew S, Murdoch A. Tissue engineering: Chondrocytes and cartilage. Arthritis Res 2002; 4(Suppl 3): S63-S68.
2. 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.
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.
4. 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.
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.
6. Chen G, Ushida T, Tateishi T. A biodegradable hybrid sponge nested with collagen microsponges. J Biomed Mater Res 2000; 51(2): 273-9.
7. 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.
8. Shikanov A, Xu M, Woodruff TK, Shea LD. Interpenetrating fibrin-alginate matrices for in vitro ovarian follicle development. Biomaterials 2009; 30(29): 5476-85.
9. 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.
10. Morris VJ. Gelation of polysaccharides. In: Mitchell JR, Ledward DA, editors. Functional properties of food macromolecules. New York, NY: Elsevier; 1986. p. 121-8.
11. Hashemibeni B, Razavi Sh, Esfandiary E, Karbasi S, Mardani M, Sadeghi F, et al. Effect of transforming growth factor- β3 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].
12. Hashemibeni B, Razavi Sh, Esfandiary E, Karbasi S, Mardani M, Nasresfahani M. Induction of chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells with TGF-β3 in pellet culture system. Iran J Basic Med Sci 2008; 11(1): 10-7.
13. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. Science 1993; 260(5110): 920-6.
14. Henrotin YE, Labasse AH, Jaspar 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.
15. 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].
16. Hunter DJ. Pharmacologic therapy for osteoarthritis--the era of disease modification. Nat Rev Rheumatol 2011; 7(1): 13-22.
17. 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].
18. 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.
19. 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.
20. Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. Biomaterials 1999; 20(1): 45-53.
21. Wang ZY, Zhang QZ, Konno M, Saito S. Sol̄gel transition of alginate solution by the addition of various divalent cations: 13C-nmr spectroscopic study. Biopolymers 1993; 33(4): 703-11.
22. 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.
23. 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.
24. Creecy 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.
25. 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.
26. Kuo CK, Li WJ, Mauck RL, Tuan RS. Cartilage tissue engineering: its potential and uses. Curr Opin Rheumatol 2006; 18(1): 64-73.
27. 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.
28. 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, Thorne 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.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 03.12.2015
Vol. 34, No. 373, 1st Week, May 2016
Accepted: 23.01.2016

Comparing the Effects of Transforming Growth Factor Beta1 (TGF-ß1) and Piascledine on the Expression of Collagen II, X and Aggrecan Genes in Chondrogenesis of Human Adipose-Derived Stem Cells in Fibrin Alginate Composite Scaffold

Hadi Didehvar[1], Farhad Golshan-Iranpoor[2], Ali Valiani[2], Batool Hashemibeni[3], Mojtaba Esmaeeli[1]

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 piascledine increases the cartilage-specific genes expression. Therefore, in this study the chondrogenic effect of TGF-β1 and piascledine 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 MTT [3 (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide] 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 Piascledine increased compared to the other groups, but this increase is not significant ($P > 0.050$). Also, Piascledine increased collagen II gene expression ($P < 0.001$) and reduced collagen X gene expression when compared to TGF-β1.

Conclusion: Piascledine 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, Piascledine, Chondrogenesis, Transforming growth factor beta1

Citation: Didehvar H, Golshan-Iranpoor F, Valiani A, Hashemibeni B, Esmaeeli M. **Comparing the Effects of Transforming Growth Factor Beta1 (TGF-ß1) and Piascledine 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: hashembeni@med.mui.ac.ir