DOI: 10.22122/jims.v37i515.11087 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و هفتم/شماره‌ی ۵۱۵/هفته‌ی سوم فروردین ۱۳۹۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۹/۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۲۲ تاریخ چاپ: ۱۳۹۸/۱/۱۵

# تأثیر همگرایی فاکتور رشد تغییر دهنده‌ی بتا (TGF-β) و هایپراسمولاریتی بر تمایز غضروفی و کاهش استخوانی شدن بافت تازه سنتز شده

الهام کنار[۱]، سعید رضا خاتمی[۲]، هنا حنایی اهواز[۳]، محمد شفیعی[۴]، محمدرضا حجاری[۴]

مقاله پژوهشی

## چکیده

**مقدمه:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal stem cells یا MSCs)، سلول‌های بنیادی چند توانه‌ای هستند که تمایز آن‌ها به کندروسیت‌ها در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است. پلاسمای غنی از پلاکت (Platelet-rich plasma یا PRP)، به دلیل غنی بودن از فاکتورهای رشد متعدد و عامل هایپراسمولاریتی، به دلیل نزدیک کردن محیط تمایزی به محیط اصلی کندروسیت‌ها، می‌تواند بر این تمایز مؤثر باشد. با توجه به ایجاد عامل نامطلوب هایپرتروفی و استخوانی شدن، پژوهش حاضر با هدف دستیابی به یک محیط بهینه‌ی تمایز غضروفی بر MSCs انسانی انجام شد.

**روش‌ها:** MSCs بافت چربی انسانی استخراج و به رده‌ی سلولی غضروف تمایز داده شد. اثر محیط‌های پایه حاوی فاکتور رشد تغییر دهنده‌ی بتا (Transforming growth factor beta یا TGF-β)، PRP، هایپراسمولاریتی، محیط پایه + هایپراسمولاریتی و PRP + هایپراسمولاریتی بر تمایز غضروفی با استفاده از رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی شامل Alcian blue، هماتوکسیلین ائوزین (Hematoxylin and Eosin یا H&E) و ایمونوسیتوشیمی کلاژن نوع ۲ و ۱۰ بررسی گردید. شاخص‌های بیوشیمیایی شامل فعالیت Alkaline phosphatase (ALP) و رسوب کلسیم و بررسی بیان ژن‌های Col2، Sox9، Smad2 و Aggrecan نیز با استفاده از روش Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) مورد سنجش قرار گرفت.

**یافته‌ها:** MSCs بافت چربی انسانی با دارا بودن قدرت تمایز به رده‌ی سلولی چربی و استخوان، ویژگی‌های سلول‌های غضروفی را در همه‌ی گروه‌های تمایزی نشان داد. فعالیت ALP و میزان رسوب کلسیم در گروه تمایزی پایه + هایپراسمولاریتی نسبت به سایر گروه‌ها کمتر بود.

**نتیجه‌گیری:** گروه تمایزی پایه + هایپراسمولاریتی می‌تواند محیط بهتری جهت تمایز غضروفی باشد.

**واژگان کلیدی:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تمایز سلولی، پلاسمای غنی از پلاکت، کندروسیت

**ارجاع:** کنار الهام، خاتمی سعید رضا، حنایی اهواز هنا، شفیعی محمد، حجاری محمدرضا. **تأثیر همگرایی فاکتور رشد تغییر دهنده‌ی بتا (TGF-β) و هایپراسمولاریتی بر تمایز غضروفی و کاهش استخوانی شدن بافت تازه سنتز شده.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۸؛ ۳۷ (۵۱۵): ۱۰۷-۱۰۱

## مقدمه

غضروف مفصلی به عنوان یک بافت فاقد رگ، توانایی محدودی برای خودترمیمی دارد. در سال‌های اخیر مهندسی بافت با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal stem cells یا MSCs)، چشم‌اندازهای امیدبخشی برای ترمیم و بازآرایی غضروف ارایه داده است (۱). MSCs سلول‌های بنیادی چند توانه‌ای هستند که قادر به تمایز به انواع سلول‌های عملکردی مانند سلول‌های غضروفی، استخوانی، چربی و... می‌باشند (۲).

ترکیباتی همچون فاکتور رشد تغییر دهنده‌ی بتا (Transforming growth factor beta یا TGF-β)، دگزامتازون و ویتامین C، از جمله رایج‌ترین عوامل اصلی القای تمایز غضروفی محسوب می‌شوند (۱). طی دهه‌ی گذشته، پلاسمای غنی شده با پلاکت (Platelet-rich plasma یا PRP)، در جراحی‌های فک و دهان، آسیب‌های استخوانی، غضروفی، رباط و تاندون‌ها مورد استفاده

۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳- استادیار، مرکز تحقیقات فن‌آوری بن‌یاخته، گروه سلول‌های بنیادی، تهران، ایران

۴- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

**نویسنده‌ی مسؤول:** هنا حنایی اهواز

Email: hana5122001@yahoo.com

قرار گرفته است (۳). PRP قسمتی از بخش پلاسمایی خون است که غلظت پلاکت بالاتری (کمتر از ۲ تا ۸/۵ برابر) نسبت به میزان پایه دارد. اهمیت استفاده از PRP، مقدار فراوان فاکتورهای رشد و پروتئین می‌باشد (۳). از جمله مزایای دیگر آن می‌توان به جمع‌آوری سریع و آسان و غیر تهاجمی و ایمن بودن آن از نظر واکنش‌های ایمنی‌شناسی اشاره کرد (۴). اهمیت استفاده از PRP در زمینه‌ی مهندسی بافت غضروف آن است که PRP غنی از فاکتورهای رشدی مانند TGF-β، فاکتور رشد مشتق شده از پلاکت (Platelet-derived growth factor یا PDGF)، فاکتور رشد شبه انسولین (Insulin-like growth factor یا IGF)، فاکتور رشد فیبروبلاست پایه (basic fibroblast growth factor یا bFGF) و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (Vascular endothelial growth factor یا VEGF) می‌باشد (۳)که بعد از اضافه شدن به محیط کشت در آزمایشگاه، سبب افزایش رشد، و تکثیر (۶-۵) و تمایز سلول‌های بنیادی به کندروسیت‌ها (۱۱-۷) و ترشح ماتریکس غضروفی (۱۲) می‌گردد.

در غضروف مفصلی، کندروسیت‌ها در محیطی با فشار اسمزی بالا قرار دارند. اسمولاریتی خارج سلولی غضروف مفصل سالم بین ۳۵۰ تا ۴۸۰ میلی‌اسمول می‌باشد که به مقدار قابل ملاحظه‌ای از اسمولاریتی محیط کشت استاندارد (۲۸۰ میلی‌اسمول) بیشتر است (۱۳). نتایج تأثیر اسمولاریتی بر سنتز ماتریکس خارج سلولی کندروسیت‌ها متناقض می‌باشد (۱۴). هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر، دستیابی به یک محیط بهینه‌ی تمایز غضروفی بر MSCs انسانی بود.

## روش‌ها

*جداسازی و کشت سلول:* بافت چربی از سه فرد به روش لیپوماتیک به دست آمد. نمونه گیری در مرکز جراحی ارم تهران و با رضایت کامل افراد دهنده، مطابق با راهنمای اخلاقی مرکز تحقیقات فن‌آوری بن‌یاخته انجام گرفت. نمونه در محلول Phosphate buffered saline (PBS) حاوی پنی‌سیلین، استرپتومایسین و آمفوتریسین و بر روی ظرف یخ به آزمایشگاه انتقال یافت. روش استخراج سلول‌های بنیادی بر اساس شیوه‌نامه‌ی تحقیقات پیشین صورت گرفت (۱۵). سلول‌ها به فلاسک‌های ۲۷۰ سانتی‌متری حاوی محیط کشت Fetal bovine serum (FBS) منتقل گردید و سپس درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد شامل ۵ درصد دی‌اکسید کربن و ۹۵ درصد رطوبت قرار گرفت و جهت به دست آمدن تعداد مورد نیاز، به دفعات پاساژ داده شد.

*آماده‌سازی PRP:* خون کامل با یک عامل ضد لختگی از دهندگان داوطلب با رضایت جمع‌آوری و سپس هر نمونه با سرعت ۳۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. فاز پلاسمای رویی جمع‌آوری و مجدد با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. پلاکت‌های تغلیظ شده با ۰/۱ حجم کلرید کلسیم ۲۰ درصد فعال و در فریزر با دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۵).

*تعیین اسمولاریتی:* به منظور رسیدن به اسمولاریتی مورد نظر(۳۵۰ میلی‌اسمول) برای محیط‌های تمایزی، از نمک ۳ مولار NaCl استفاده شد. رقت‌های مختلف از نمک در میکروتیوب‌های مجزا با محیط کشت گلوکز بالا و ۱ درصد Insulin-Transferrin-Selenium (ITS) ترکیب و اسمولاریتی آن‌ها با دستگاه اسمومتر (OSMOMAT 030، شرکت Gonotec، آلمان) قرائت گردید. محیط کشت بدون نمک به عنوان نمونه‌ی کنترلی اسمولاریتی در نظر گرفته شد. سپس منحنی استاندارد رسم شد و مقدار نمک مورد نیاز جهت ایجاد اسمولاریته‌ی مشخص به دست آمد.

*تیمار غضروف‌زایی:* کشت‌های غضروفی به صورت توده‌های سلولی در فالکون‌های ۱۵ سی‌سی مخروطی شامل ۲۵۰ هزار سلول به ازای هر پلیت در همه‌ی گروه‌ها تشکیل شد. در مطالعه‌ی حاضر، شش گروه تمایزی مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱) و محیط‌های تمایزی هر ۳ روز یک‌بار تعویض شد.

**جدول ۱. گروه‌های تمایزی و مواد موجود در آن‌ها**

| گروه | DMEM | سدیم پیروات (۱ درصد) | ITS (۱ درصد) | پرولین (۱ درصد) | اسید آسکوربیک (۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) | دگزامتازون (۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) | TGF-β (۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) | PRP (۵ درصد) | سدیم کلراید (۲۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| شاهد (A) | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | | | | |
| پایه‌ی غضروف (B) | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | | |
| PRP (C) | ✓ | | | | | | | ✓ | |
| هایپراسمولاریتی (D) | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | | | | ✓ |
| پایه + هایپراسمولاریتی (E) | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | | ✓ |
| PRP + هایپراسمولاریتی (F) | ✓ | | | | | | | ✓ | ✓ |

PRP: Platelet-rich plasma; ITS: Insulin-Transferrin-Selenium; TGF-β: Transforming growth factor beta; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

جدول ۲. پرایمرهای مورد استفاده در Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)

| توالی | پرایمر |
|---|---|
| CCT GGC GTC GTG ATT AGT G | HPRT1-F |
| TCA GTC CTG TCC ATA ATT AGT CC | HPRT1-R |
| AAG ACG GCT TCC ACC AGT G | Agc1-F (Aggrecan) |
| AAA GAC CTC ACC CTC CAT CTC | Agc1-R (Aggrecan) |
| GTA CCC GCA CTT GCA CAA C | H-Sox-F |
| TCG CTC TCG TTC AGA AGT CTC | HSox-R |
| GGT CTT GGT GGA AAC TTT GCT | H-COL2A1-F |
| GGT CCT TGC ATT ACT CCC AAC | H-COL2A1-R |
| AGC AGA ATA CCG AAG GCA GAC G | H-SMAD2-F |
| TTG AGC AAC GCA CTG AAG GG | H-SMAD2-R |

***بررسی‌های ایمونوسیتوشیمی و بیوشیمیایی:*** جهت رنگ‌آمیزی بافت های تمایز یافته، پلیت ها پس از دو هفته در پارافرمالدهید ۴ درصد تثبیت گردید و سپس از آن‌ها بلوک پارافینی تهیه (در آزمایشگاه پاتوبیولوژی دکتر جمالی) و با ضخامت ۵ میکرومتر مقطع‌گیری شد. به منظور رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین (Hematoxylin and Eosin یا H&E)، ابتدا لام‌ها با استفاده از زایلین، دپارافینه و سپس آبدهی شد. جهت رنگ آمیزی هسته و سیتوپلاسم، لام‌ها به ترتیب به مدت ۲۰ دقیقه در رنگ هماتوکسیلین (۰/۵ درصد در حلال اتانول و اسید استیک) و ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در رنگ ائوزین قرار گرفت و با کمک میکروسکوپ نوری (مدل TE2000-S، Nikon-Eclipse، آمریکا) دوربین‌دار از آن‌ها عکس‌برداری گردید. رنگ‌آمیزی Alcian blue و ایمونوسیتوشیمی نیز بر اساس شیوه‌نامه‌ی موجود در تحقیقات قبلی انجام شد (۱۶).

***سنجش فعالیت Alkaline phosphatase (ALP):*** فعالیت ALP از طریق اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر بافر Radioimmunoprecipitation Assay (RIPA) به هر پلیت ارزیابی گردید. پس از لیز سلولی، نمونه‌ها با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی جمع‌آوری و فعالیت ALP با کیت سنجش ALP (پارس‌آزمون، ایران)، بر طبق دستورالعمل و خواندن میزان جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر، با استفاده از دستگاه Enzyme-linked immunosorbent assay reader (ELISA reader) (شرکت Biotech، آمریکا) مورد سنجش قرار گرفت. پروتئین تام برای هر گروه نیز با استفاده از کیت BCA (Life Technologies، آمریکا) نرمالیزه شد.

***بررسی رسوب کلسیم:*** میزان رسوب کلسیم سلولی از طریق اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر اسید کلریدریک ۰/۶ نرمال به هر پلیت و استفاده از کیت سنجش غلظت کلسیم (پارس آزمون، ایران) در طول موج ۶۳۰ نانومتر به دست آمد. سپس با استفاده از منحنی استاندارد، در هر نمونه محاسبه و پروتئین تام نیز نرمالیزه شد.

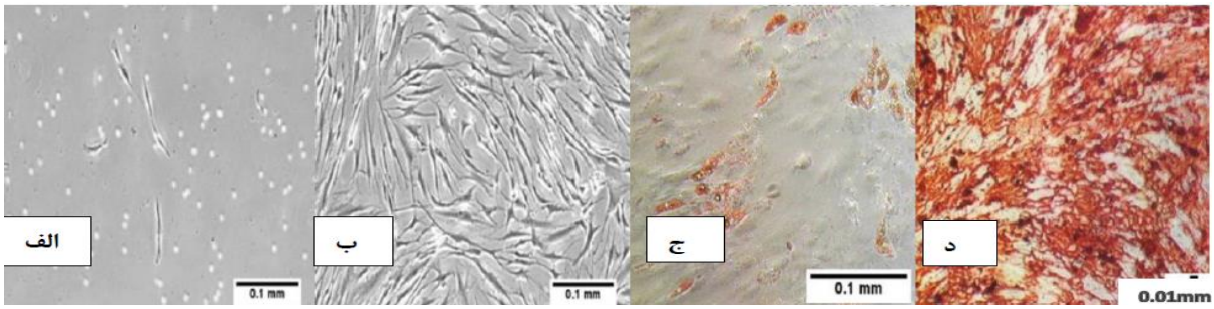
***Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR):*** بیان نسبی نشانگرهای اصلی غضروف زایی با استفاده از RT-PCR پس از گذشت دو هفته از القای تمایز ارزیابی شد. RNA تام با استفاده از ترایزول استخراج گردید و سنتز Complementary DNA (cDNA) و ارزیابی بیان ژن‌های Col2، Sox9، Smad2 و Aggrecan با استفاده از کیت (شرکت Fermentas، آمریکا) صورت گرفت. در نهایت، بیان هر ژن در مقابل ژن HPRT1 به عنوان کنترل داخلی، با استفاده از روش CTΔΔ نرمالیزه شد. پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۲ ارایه شده است.

***تجزیه و تحلیل آماری:*** اطلاعات توصیفی به دست آمده به صورت میانگین و انحراف معیار گزارش شد. داده‌های به دست آمده با استفاده از آزمون ANOVA در نرم‌افزار GraphPad Prism (version 6.07, GraphPad Software Inc., CA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. $P < ۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. تمام داده‌ها بر اساس سه تکرار بیولوژیک به دست آمد.

## یافته‌ها

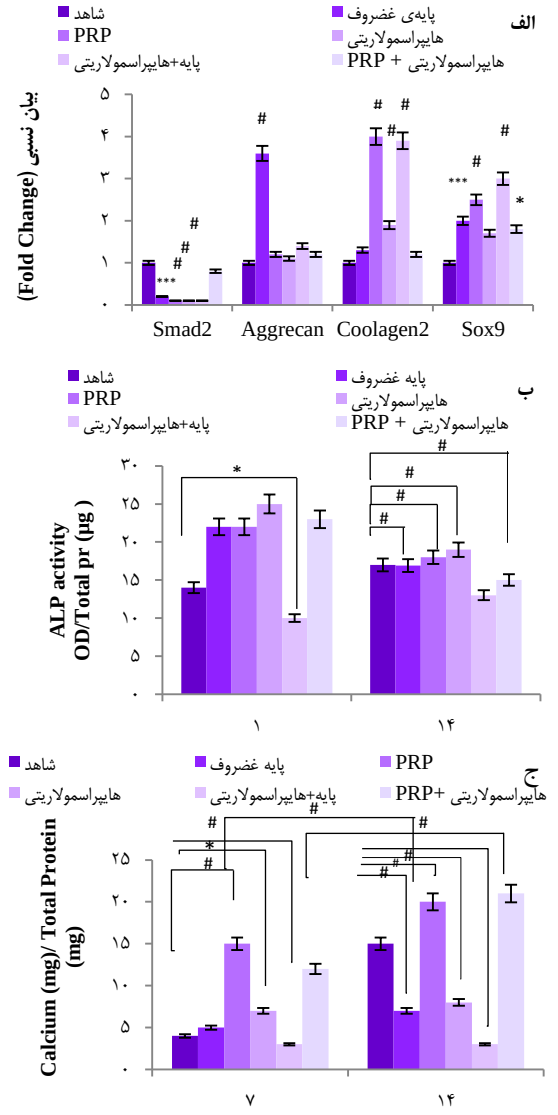
***ویژگی‌های سلولی:*** MSCs جدا شده از بافت چربی انسانی، در روز اول ظاهر گردی داشت و مورفولوژی آن پس از ۲ تا ۴ روز به صورت شبه فیبروبلاست قابل مشاهده بود و در محیط آزمایشگاه به دو رده‌ی سلولی آدیپوسیت و استئوبلاست متمایز گردید (شکل ۱). همچنین، بر اساس نتایج فلوسایتومتری، جمعیت نشانگرهای سطحی هماتوپویتیک CD۳۴ و CD۴۵ به ترتیب با ۰/۰۲۴ و ۰/۰۱۲ درصد و مزانشیمال به صورت CD۴۴ و CD۱۰ به ترتیب با ۹۹/۸ و ۹۲/۷ درصد بیان شد.

***راندمان تمایز غضروفی:*** بیان نسبی ژن‌های نشانگر غضروف زایی در شکل ۲ و راندمان تمایز غضروفی ۱۴ روزه در MSCs با استفاده از رنگ‌آمیزی و تست ایمونوسیتوشیمی در شکل ۳ نشان داده شده است. ژن نشانگرهای غضروفی Sox9، کلاژن نوع ۲ و اگرکان در کلیه‌ی گروه‌ها بیان شد و Smad2 در تمام گروه‌ها کاهش بیان داشت.




**شکل ۱. مشخصات Mesenchymal stem cells (MSCs)**

الف: مورفولوژی پس از استخراج با بزرگنمایی ۱۰، ب: مورفولوژی در روز دهم پس از استخراج با بزرگنمایی۱۰، ج: MSCs متمایز شده به سلول‌های چربی با بزرگنمایی ۴۰ و د: MSCs متمایز شده به سلول‌های استخوان با بزرگنمایی ۴۰




**شکل ۲. بیان نسبی ژن‌های نشانگر غضروف‌زایی در روز ۱۴ (الف)، فعالیت Alkaline phosphatase یا ALP) (ب) و کلسیم تولید شده در حین تمایز غضروفی (ج) در گروه‌های مورد بررسی**

$P \leq ۰/۰۵۰^{*}$، $P \leq ۰/۰۱۰^{**}$، $P \leq ۰/۰۰۱^{***}$، $P \leq ۰/۰۰۰۱^{\#}$

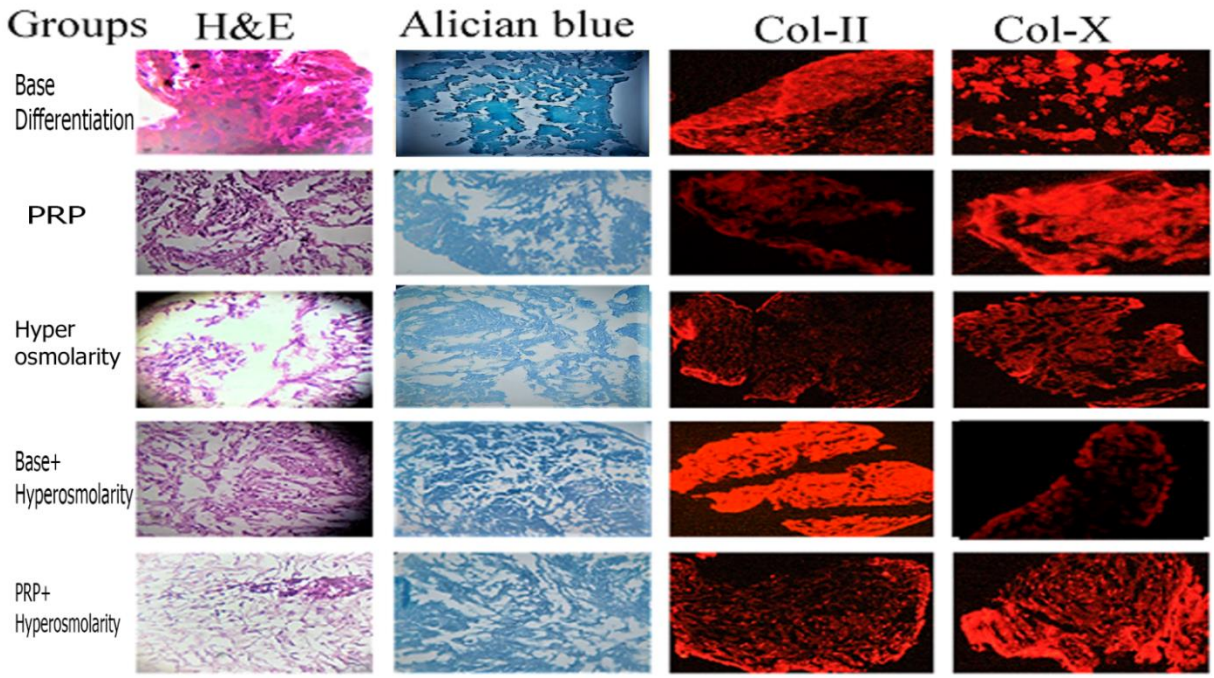
***بررسی هایپرتروفی حین تمایز غضروفی:*** میزان کلسیم رسوبی و فعالیت ALP در هر گروه در شکل ۲ نشان داده شده است. میزان رسوب کلسیم در کلیه‌ی گروه‌های تمایزی در روز ۱۴ نسبت به روز ۷ افزایش داشت که این افزایش در گروه PRP و PRP + هایپراسمولاریتی معنی‌دار بود ($P \leq ۰/۰۰۰۱$)، اما گروه پایه + هایپراسمولاریتی تنها گروهی بود که در آن رسوب کلسیم در هر دو نقطه‌ی زمانی ۷ و ۱۴ روز پس از تمایز، به طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود ($P \leq ۰/۰۰۰۱$). میزان فعالیت ALP در روز ۷ پس از تمایز در همه‌ی گروه‌ها به جزء گروه پایه + هایپراسمولاریتی نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد. کاهش فعالیت ALP در گروه پایه + هایپراسمولاریتی نسبت به گروه شاهد در روز ۱۴ معنی‌دار گزارش شد ($P \leq ۰/۰۰۰۱$) و در روز ۷ معنی‌دار نبود.

## بحث

علاوه بر تأثیرات مثبت PRP و یا هایپراسمولاریتی بر تمایز غضروفی در مهندسی بافت، مشاهده شد که این دو عامل سبب هایپرتروفی غضروف نیز می‌شوند (۱۸-۱۷، ۱۳). بنابراین، هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر، بررسی تیمارهای مختلف تمایز غضروفی با کاربرد این دو عامل بود تا تیماری که دارای کمترین هایپرتروفی می‌باشد، به عنوان تیمار مناسب‌تر معرفی گردد.

اولین قدم در پژوهش، بررسی بنیادی و مزانشیمی بودن سلول‌های استخراج شده بود که از طریق چسبیدن سلول‌های جدا شده به کف ظرف کشت، تمایز مشخص آن‌ها به سلول‌های چربی و استخوان و بیان بالای نشانگرهای مزانشیمال و بیان جزیی نشانگرهای هماتوپویتیک تأیید شد.

در گام بعدی جهت بررسی راندمان غضروفی، در تمام گروه ها افزایش بیان ژن‌های Aggrecan، Sox9 و Col2 و کاهش بیان ژن Smad2 نسبت به گروه شاهد مشاهده گردید.




**شکل ۳. راندمان تمایز غضروفی در گروه‌های تمایزی در روز ۱۴ با استفاده از رنگ‌آمیزی Alcian blue، Hematoxylin and Eosin (H&E) و ایمونوسیتوشیمی**

گروه‌های تمایزی از بالا به پایین: پایه‌ی غضروف، Platelet-rich plasma (PRP)، هایپراسمولاریتی، پایه + هایپراسمولاریتی، PRP + هایپراسمولاریتی

همچنین، به دلیل اهمیت وجود کلاژن نوع ۲ و گلیکوزآمینوگلیکان ها در ساختار طبیعی غضروف و کلاژن نوع ۱۰ در هایپرتروفی آن، کلاژن‌ها به روش ایمونوسیتوشیمی، گلیکوزآمینوگلیکان‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی Alcian blue و هسته و سیتوپلاسم کندروسیت‌ها به کمک رنگ‌آمیزی H&E مشاهده شد.

بر اساس شکل ۳، گلیکوزآمینوگلیکان‌ها و کلاژن نوع ۲ در تمام گروه‌ها تولید شد که تأییدکننده‌ی تمایز غضروفی می‌باشد. در سلول‌های متمایز شده به کندروسیت که کلاژن نوع ۲ را بیان کردند، کلاژن نوع ۱۰ نیز مشاهده گردید که نشان می‌دهد TGF-β و یا هایپراسمولاریتی، تمایز غضروفی را به طور کامل انجام داده‌اند و مقداری تمایز به استخوان نیز صورت گرفته است.

رسوب کلسیم و فعالیت ALP، از جمله نشانگرهای تشکیل بافت استخوانی محسوب می‌شود (۱۹، ۱۵). از این‌رو، تمایز غیر اختصاصی به بافت استخوان، از طریق سنجش این دو شاخص ارزیابی می‌شود. در تحقیق حاضر، هرچه از روزهای اولیه‌ی تمایز به سمت روزهای پایانی نزدیک شد، میزان کلسیم در همه‌ی گروه‌های تمایزی به جزء گروه پایه + هایپراسمولاریتی افزایش یافت. از این یافته می‌توان نتیجه گرفت که تمایز با این روش نمی‌تواند طولانی باشد و یا این که باید از منبع سلولی دیگری استفاده نمود. در گروه PRP، رسوب کلسیم نسبت به گروه پایه بیشتر بود که این یافته با نتایج مطالعات پیشین (۱۶) هم‌راستا می‌باشد. همچنین، در گروه پایه + هایپراسمولاریتی، در روز ۷ و ۱۴تمایز، کلسیم به میزان کمتری نسبت به گروه PRP + هایپراسمولاریتی رسوب کرده بود که بیان می‌کند اگرچه اسمولاریتی بالا تأثیر مثبتی در تمایز غضروفی دارد، اما در صورت همراهی با محیط تمایزی پایه و در ترکیب با PRP، تأثیر منفی می گذارد و بیشترین میزان رسوب کلسیم را نسبت به سایر گروه‌ها نشان داد. در مجموع، فعالیت ALP و رسوب کلسیم در گروه تمایزی پایه + هایپراسمولاریتی نسبت به سایر گروه‌ها کمتر گزارش گردید. بنابراین، می‌توان گفت که این گروه برای تمایز غضروفی بهتر است. در نتیجه، برای استفاده از مزایای PRP و هایپراسمولاریتی جهت تمایز غضروفی و در عین حال، جلوگیری از هایپرتروفی شدن آن، پیشنهاد می گردد که این عوامل در یک روش وابسته به زمان به کار برده شود و از زمانی که استخوانی شدن آغاز گردید، روند تمایز متوقف شود و بافت مورد نظر در درمان‌های بالینی مورد استفاده قرار گیرد.

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مرکز تحقیقات فن‌آوری بن‌یاخته به جهت حمایت‌های مالی و همچنین، دانشگاه شهید چمران اهواز که در اجرای این پژوهش مشارکت نمودند، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

## References


1. Wang SZ, Chang Q, Kong XF, Wang C. The chondrogenic induction potential for bone marrow-derived stem cells between autologous platelet-rich plasma and common chondrogenic induction agents: A preliminary comparative study. Stem Cells Int 2015; 2015: 589124.
2. Almalki SG, Agrawal DK. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. Differentiation 2016; 92(1-2): 41-51.
3. Kabiri A, Esfandiari E, Esmaeili A, Hashemibeni B, Pourazar A, Mardani M. Platelet-rich plasma application in chondrogenesis. Adv Biomed Res 2014; 3: 138.
4. Andia I, Maffulli N. Platelet-rich plasma for managing pain and inflammation in osteoarthritis. Nat Rev Rheumatol 2013; 9(12): 721-30.
5. Kon E, Filardo G, Delcogliano M, Fini M, Salamanna F, Giavaresi G, et al. Platelet autologous growth factors decrease the osteochondral regeneration capability of a collagen-hydroxyapatite scaffold in a sheep model. BMC Musculoskelet Disord 2010; 11: 220.
6. Filardo G, Kon E, Pereira Ruiz MT, Vaccaro F, Guitaldi R, Di MA, et al. Platelet-rich plasma intra-articular injections for cartilage degeneration and osteoarthritis: single- versus double-spinning approach. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 2012; 20(10): 2082-91.
7. Mishra A, Tummala P, King A, Lee B, Kraus M, Tse V, et al. Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation. Tissue Eng Part C Methods 2009; 15(3): 431-5.
8. Mifune Y, Matsumoto T, Takayama K, Ota S, Li H, Meszaros LB, et al. The effect of platelet-rich plasma on the regenerative therapy of muscle derived stem cells for articular cartilage repair. Osteoarthritis Cartilage 2013; 21(1): 175-85.
9. Spreafico A, Chellini F, Frediani B, Bernardini G, Niccolini S, Serchi T, et al. Biochemical investigation of the effects of human platelet releasates on human articular chondrocytes. J Cell Biochem 2009; 108(5): 1153-65.
10. Smyth NA, Fansa AM, Murawski CD, Kennedy JG. Platelet-rich plasma as a biological adjunct for the surgical treatment of osteochondral lesions of the talus. Techniques in Foot and Ankle Surgery 2012; 11: 18–25.
11. Smyth NA, Murawski CD, Fortier LA, Cole BJ, Kennedy JG. Platelet-rich plasma in the pathologic processes of cartilage: Review of basic science evidence. Arthroscopy 2013; 29(8): 1399-409.
12. Akeda K, An HS, Okuma M, Attawia M, Miyamoto K, Thonar EJ, et al. Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis. Osteoarthritis Cartilage 2006; 14(12): 1272-80.
13. Caron MM, van der Windt AE, Emans PJ, van Rhijn LW, Jahr H, Welting TJ. Osmolarity determines the in vitro chondrogenic differentiation capacity of progenitor cells via nuclear factor of activated T-cells 5. Bone 2013; 53(1): 94-102.
14. Peffers MJ, Milner PI, Tew SR, Clegg PD. Regulation of SOX9 in normal and osteoarthritic equine articular chondrocytes by hyperosmotic loading. Osteoarthritis Cartilage 2010; 18(11): 1502-8.
15. Pakfar A, Irani S, Hanaee-Ahvaz H. Expressions of pathologic markers in PRP based chondrogenic differentiation of human adipose derived stem cells. Tissue Cell 2017; 49(1): 122-30.
16. Ramezanifard R, Kabiri M, Hanaee AH. Effects of platelet rich plasma and chondrocyte co-culture on MSC chondrogenesis, hypertrophy and pathological responses. EXCLI J 2017; 16: 1031-45.
17. Mardani M, Kabiri A, Esfandiari E, Esmaeili A, Pourazar A, Ansar M, et al. The effect of platelet rich plasma on chondrogenic differentiation of human adipose derived stem cells in transwell culture. Iran J Basic Med Sci 2013; 16(11): 1163-9.
18. Lee JC, Min HJ, Park HJ, Lee S, Seong SC, Lee MC. Synovial membrane-derived mesenchymal stem cells supported by platelet-rich plasma can repair osteochondral defects in a rabbit model. Arthroscopy 2013; 29(6): 1034-46.
19. O'Conor CJ, Case N, Guilak F. Mechanical regulation of chondrogenesis. Stem Cell Res Ther 2013; 4(4): 61.

**DOI:** *10.22122/jims.v37i515.11087* *Published by Vesnu Publications*

**Journal of Isfahan Medical School** **Vol. 37, No. 515, 3rd Week, April 2019**

Received: 29.11.2018 Accepted: 12.01.2019 Published: 04.04.2019

# Synergistic Effects of Hyperosmolarity and Transforming Growth Factor Beta (TGF-β) on Chondrogenic Differentiation and Reducing Neotissue Ossification

Elham Konar[1], Saeed Reza Khatami[2], Hana Hanaee-Ahvaz[3], Mohamad Shfiee[4], Mohamad Reza Hajari[4]

**Original Article**

## Abstract

**Background:** Mesenchymal stem cells (MSCs), are multipotent stem cells that their differentiation to chondrocytes is considered in recent years. Platelet-rich plasma (PRP), because of rich of several growth factors, and also hyperosmolarity, because of stimulating differentiation culture medium to original medium of chondrocytes, can affect this differentiation. Considering hypertrophy and ossification as resulted adverse factors, this study aimed to achieve an optimal medium for chondrogenic differentiation of human MSCs.

**Methods:** MSCs were extracted from adipose tissue, and differentiated to chondrocyte line. The effect of base medium containing transforming growth factor beta (TGF-β), PRP, hyperosmolarity, base + hyperosmolarity and PRP + hyperosmolarity on chondrogenic differentiation was assessed using special staining methods such as Alcian blue, hematoxylin and eosin (H&E), and collagen type II and X immunocytochemistry, measurement of biochemical indexes including alkaline phosphatase (ALP) activity and deposit of calcium, and study of expression of Col2, Smad2, Sox9, and Aggrecan genes using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR).

**Findings:** Human adipose tissue derived MSCs, with differentiation ability to adipocyte and osteocyte lines, were presented characterizations of chondrocytes in all differentiation groups. In base + hyperosmolarity group, ALP activity and deposit of calcium were less than other groups.

**Conclusion:** Base + hyperosmolarity differentiation group can be a better culture medium for chondrogenic differentiation.

**Keywords:** Mesenchymal stem cells, Cell differentiation, Platelet-Rich Plasma, Chondrocytes

**Citation:** Konar E, Khatami SR, Hanaee-Ahvaz H, Shfiee M, Hajari MR. **Synergistic Effects of Hyperosmolarity and Transforming Growth Factor Beta (TGF-β) on Chondrogenic Differentiation and Reducing Neotissue Ossification.** J Isfahan Med Sch 2019; 37(515): 101-7.

1- PhD Student, Department of Biology, School of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2- Associate Professor, Department of Biology, School of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
3- Assistant Professor, Department of Stem Cells, Stem Cell Technology Research Center, Tehran, Iran
4- Assistant Professor, Department of Biology, School of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
**Corresponding Author:** Hana Hanaee-Ahvaz, Email: hana5122001@yahoo.com