

## تأثیر پیاسکلیدین بر القای کندروژنز از سلول‌های بنیادی مشتق از چربی انسان در داربست فیبرین

مجتبی اسماعیلی<sup>۱</sup>، دکتر بتول هاشمی بنی<sup>۲</sup>، دکتر علی والیانی<sup>۳</sup>، دکتر نوشین امیرپور<sup>۴</sup>، بابک پورملاعباسی<sup>۴</sup>، محمد کاظمی<sup>۵</sup>

## مقاله پژوهشی

## چکیده

**مقدمه:** آسیب‌های بافت غضروف یکی از مشکلات موجود در کلینیک است و روش‌های درمانی رایج منجر به ترمیم کامل آسیب‌ها نمی‌شود. از این رو، مهندسی بافت در این جهت مورد توجه است. در مهندسی بافت از مواد زیستی، عوامل رشد و سلول مناسب استفاده می‌شود. از آن جایی که عوامل رشد مانند  $TGF-\beta$  (Transforming growth factor beta) منجر به هایپرتروفه شدن بافت غضروف تهیه شده می‌گردد، دستیابی به عوامل القا کننده‌ی مناسب‌تر ضرورت دارد. مطالعات نشان داده است که پیاسکلیدین بر کندروسیت‌های کشت یافته تأثیر مثبت داشته است. از این رو، در این تحقیق تأثیر پیاسکلیدین بر القای کندروژنز و غضروف‌سازی از سلول‌های بنیادی مورد بررسی قرار گرفت.

**روش‌ها:** نمونه‌های چربی از سه بیمار، طی جراحی لیپوساکشن به دست آمد. سلول‌های بنیادی مشتق از چربی (Adipose tissue-derived stem cells یا ADSCs) از بافت چربی استخراج و تا پاساژ سوم تکثیر داده شد. سپس، سلول‌ها در داربست فیبرین تحت تأثیر محیط کشت القای کندروژنیک به مدت ۲۱ روز کشت داده شد. میزان تکثیر و بقای سلول‌ها با 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 PCR (Real-time polymerase chain reaction) مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** میزان تکثیر و بقای سلول‌ها در داربست فیبرین، در گروه‌های مختلف، تفاوت قابل توجهی نداشت ( $P > 0.05$ )؛ اما میزان بیان ژن‌های کلاژن II و اگریکان تحت پیاسکلیدین به طور چشم‌گیری در مقایسه با گروه دارای  $TGF-\beta$  افزایش و بیان ژن کلاژن X به طور معنی‌داری کاهش نشان داد ( $P < 0.01$ ).

**نتیجه‌گیری:** ترکیب پیاسکلیدین در روند القای غضروف‌سازی از سلول‌های بنیادی به طور کامل مؤثر است و بر کاهش هایپرتروفه شدن سلولی نیز تأثیر چشم‌گیری دارد.

**واژگان کلیدی:** کندروژنز، سلول بنیادی، پیاسکلیدین

**ارجاع:** اسماعیلی مجتبی، هاشمی بنی بتول، والیانی علی، امیرپور نوشین، پورملاعباسی بابک، کاظمی محمد. تأثیر پیاسکلیدین بر القای کندروژنز از

سلول‌های بنیادی مشتق از چربی انسان در داربست فیبرین. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۵۷): ۱۸۷۰-۱۸۶۲

درمان آسیب‌های مفصلی به بدن انتقال دهد (۲). در مهندسی بافت، از منابع سلولی مختلفی از جمله سلول‌های بنیادی مشتق از چربی و سلول‌های بنیادی مغز استخوان استفاده می‌شود (۳).

سلول‌های بنیادی مشتق از چربی، دارای پتانسیل بالایی برای غضروف‌سازی می‌باشد که از طریق اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌های ویژه‌ی غضروف از جمله کلاژن II، کلاژن X و اگریکان و نیز تولید پروتئین‌های ماتریکس مشخص می‌شود (۴).

مواد زیستی، نقش اساسی در مهندسی بافت جهت ساخت

## مقدمه

آسیب‌های بافت غضروف، یکی از معضلات گسترده‌ی جهانی است و انسان‌های زیادی را درگیر می‌نماید (۱). درمان‌های رایج مورد استفاده برای این بیماری‌ها، هنوز راضی کننده نمی‌باشد. امروزه، مهندسی بافت ترکیبی از اصول مهندسی و دانش بیولوژی است که در زمینه‌ی ترمیم غضروف مورد توجه قرار گرفته است (۲). مهندسی بافت، به دنبال مشخص نمودن داربست‌ها و عوامل رشد مناسب برای تحریک تولید غضروف مفصلی هیالین است که بتواند آن را به منظور

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

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

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

۴- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مهندسی بافت، دانشکده‌ی مهندسی پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نجف‌آباد، نجف‌آباد، ایران

۵- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: hashemibeni@med.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر بتول هاشمی بنی

از آن جایی که هدف مهندسی غضروف دستیابی به بافت مشابه با غضروف هیالین طبیعی است و اثرات منفی TGF-Bs و هایپرتروفه شدن بافت غضروفی در روند کندروژنز مطرح است، در پژوهش حاضر، تأثیر پیاسکلیدین بر روند القای کندروژنز از سلول‌های بنیادی مشتق از چربی انسانی در داربست فیبرین مورد ارزیابی قرار گرفت.

### روش‌ها

آماده‌سازی نمونه‌ها جهت کشت اولیه: بافت چربی زیر جلدی در لوله‌ی فالکون محتوی سرم فیزیولوژی از سه مریض سالم ۲۷-۴۵ ساله، که جهت عمل لیپوساکشن به بیمارستان مراجعه نموده بودند، تهیه گردید. قبل از تهیه‌ی چربی، فرم رضایت نامه از بیماران دریافت شد. جهت تجزیه‌ی بافت از آنزیم کلاژناز نوع IA (Sigma، آمریکا) استفاده شد. پس از اضافه شدن مقدار مناسب آنزیم، نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. پس از اطمینان از تجزیه شدن کامل بافت، هم حجم محلول آنزیم به کار رفته، محیط کشت Gibco (DMEM) Dulbecco's modified Eagle's medium (انگلیس) حاوی FBS (Fetal bovine serum) ۱۰ درصد (Sigma، آمریکا) و Penicillin/ Streptomycin ۱ درصد (Gibco، انگلیس) جهت خشتی کردن فعالیت آنزیم به سوسپانسیون سلولی اضافه گردید. در ادامه‌ی کار، سوسپانسیون در لوله‌های فالکون ۱۵ میلی‌لیتری به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی همراه با سلول‌های چربی تخلیه گردید. رسوب سلولی به دست آمده در فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربع در محیط کشت FBS ۱۰ درصد + Penicillin/Streptomycin ۱ درصد در DMEM + در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، CO<sub>2</sub> (Carbon dioxide) ۵ درصد و رطوبت نسبی کشت داده شد (۲۰). پس از گذشت چند ساعت، سلول‌های تک هسته‌ای شروع به چسبیدن به کف فلاسک کردند. با تعویض محیط کشت بعد از ۲۴ ساعت، سلول‌های اضافی تخلیه گردید (شکل ۱).

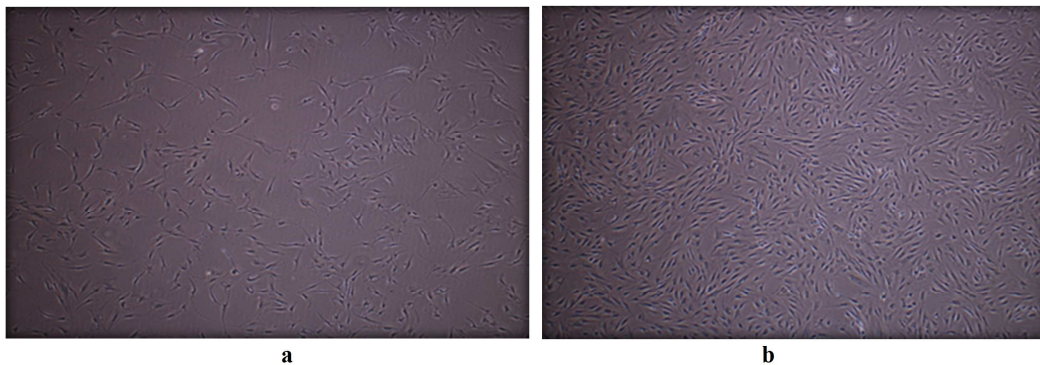
تهیه‌ی پیاسکلیدین: پیاسکلیدین از شرکت Experience فرانسه تهیه شد. ۰/۱ میلی‌گرم از این پودر در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۱۰۰ درجه حل گردید تا به غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برسد. تهیه‌ی ترومبین: یک کیسه‌ی FFP (Fresh frozen plasma) از بانک خون استان اصفهان تهیه و به آزمایشگاه کشت سلول منتقل شد و به مدت ۱۰ دقیقه در داخل دستگاه بن‌ماری در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد ذوب گردید. بعد از ضد عفونی سطح خارجی کیسه با الکل ۷۰ درصد در زیر هود کلاس II با استفاده از سرنگ ۵۰ میلی‌لیتری با رعایت شرایط استریل، محتویات داخل کیسه به لوله‌ی فالکون ۵۰ میلی‌لیتر منتقل گردید؛ به طوری که درون هر لوله‌ی

داربست دارند (۵). این داربست‌ها به صورت طبیعی یا مصنوعی جهت درمان یا ترمیم مفاصل ساخته می‌شوند. این داربست‌ها از نظر ساختار فیزیکی به دو نوع متخلخل و هیدروژل تقسیم می‌شوند (۶). داربست متخلخل به طور معمول از پلیمرهای زیست‌تخریب پذیر ساخته می‌شود (۷).

در این میان، داربست فیبرین یکی از ترکیبات مواد زیستی طبیعی محسوب می‌شود که از پروتئین فیبرین تشکیل شده است. فیبرین از فیبرینوژن و ترومبین ساخته می‌شود که شبکه‌ی تورمانندی ایجاد می‌نماید (۸). داربست فیبرین اجازه‌ی مهاجرت، تکثیر و همچنین انتقال مواد غذایی، انتقال پیام‌های مولکولی و دفع مواد متابولیکی را فراهم می‌کند (۹). مطالعات نشان می‌دهد زمانی که داربست فیبرین برای کشت سلول‌های بنیادی مغز استخوان در شرایط *In vitro* و *In vivo* استفاده می‌شود، امکان تکثیر و بقا برای سلول‌ها در این داربست وجود دارد (۱۰). این داربست، دارای خاصیت ویسکوالاستیک منحصر به فردی می‌باشد که همین خاصیت باعث تفاوت بین انواع ژل‌های فیبرین شده است (۱۱).

عوامل رشد، نقش مهمی در تکثیر، آپوپتوز و تمایز سلولی دارند و در تنظیم چرخه‌ی سلولی و سیستم ایمنی دخالت دارند. از جمله‌ی این عوامل، می‌توان به خانواده‌ی  $\beta$ -Transforming growth factor (TGF- $\beta$ ) اشاره کرد که به طور وسیعی در مهندسی بافت غضروف و ترمیم استفاده می‌شود (۱۲). این عوامل، موجب بیان یک سری از ژن‌ها از جمله کلاژن II و ساخت گلیکوز آمینو گلیکان‌ها می‌شوند (۱۳). TGF- $\beta$  اثر القا کننده در روند کندروژنز از سلول‌های بنیادی مغز استخوان و بافت چربی (BM-MSCs) و سلول‌های بنیادی مشتق از چربی (Adipose tissue-derived stem cells) یا ADSCs دارند؛ به طوری که بیان کلاژن II و آگریکان را افزایش می‌دهند (۱۴-۱۵). با این حال، این عوامل رشد دارای قیمت زیادی هستند و نیمه‌ی عمر کوتاهی از ۲۴ ساعت تا ۳ روز دارند و همچنین باعث هایپرتروفه شدن بافت غضروف می‌شوند (۱۶).

پیاسکلیدین نوعی ترکیب گیاهی حاوی عصاره‌ی گیاه آواکادو و سویا به نسبت ۱/۳ آواکادو به ۲/۳ سویا است که به صورت غیرصابونی تهیه شده است (Avocado Soyabean unsaponifiable یا ASU) (۱۷). مطالعات نشان داده است که پیاسکلیدین باعث مهار IL-1B (Interleukin-1 beta) می‌شود. کاهش IL-1B باعث تحریک ساخت کلاژن II و پروتئوگلیکان‌ها و تولید آگریکان در کندروسیت‌ها می‌گردد (۱۸). مطالعات قبلی نشان می‌دهد که پیاسکلیدین باعث افزایش عوامل رشد از جمله TGF-B و کاهش عملکرد اینترلوکین‌ها می‌شود (۱۹).



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

(Sigma، آمریکا) و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر Linoleic acid (Sigma، آمریکا) حاوی ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر TGF- $\beta 1$ ، به گروه دوم محیط کشت القای کندروژنیک حاوی ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پیاسکلیدین و به گروه سوم محیط کشت القای کندروژنیک محتوی ۱۰ میکروگرم بر میلی‌متر پیاسکلیدین و ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر TGF- $\beta 1$  اضافه گردید. سلول‌ها در داربست فیبرین پس از گذشت ۲۱ روز بررسی شدند و هر ۳ روز یک بار محیط کشت القای آن‌ها تعویض گردید.

#### روش انجام تکنیک MTT

پس از ۲۱ روز القای کندروژنیک، محیط کشت چاهک‌ها تخلیه و با PBS (Phosphate buffered saline) شستشو داده شد. سپس، به میزان ۴۰۰ میکرولیتر DMEM HG خالص و ۴۰ میکرولیتر محلول MTT (Sigma، آمریکا) (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به هر چاهک اضافه شد. پلیت به مدت ۴ ساعت در انکوباتور  $CO_2$  با حرارت ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس، این مایع تخلیه و ۴۰۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyl sulfoxide) (Sigma، آمریکا) به چاهک‌ها اضافه و ۲ ساعت در تاریکی و دمای اتاق قرار داده شد. DMSO با حل کردن کریستال‌های فورمازان تولید رنگ ارغوانی می‌کند. در انتها، ۱۰۰ میکرولیتر از هر چاهک را به پلیت ۹۶ خانه منتقل و میزان جذب نوری (OD یا Optical density) با دستگاه ELISA reader (Enzyme-linked immunosorbent assay reader) (Hyperion MPR4) و طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. برای هر نمونه سه بار تکرار (Triplicate) صورت گرفت (۲۲-۲۳).

روش انجام تکنیک Real-time PCR (Real-time polymerase chain reaction): این روش برای بررسی بیان ژن‌های آگریکان، کلاژن نوع II و X در روند کندروژنز سلول‌های بنیادی مشتق از چربی (ADSCs) در روز ۲۱ انجام گرفت.

فالکون ۱۶ میلی‌لیتر FFP بود. سپس به هر لوله‌ی فالکون، یک ویال ۱۰ میلی‌لیتری از آمپول گلوکونات کلسیم اضافه شد. پس از آن در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۹۰-۶۰ دقیقه انکوبه شدند. پس از سانتریفیوژ لوله‌های فالکون با سرعت ۲۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، مایع رویی شفاف حاوی ترومبین که برای هر لوله حدود ۱-۱/۵ میلی‌لیتر بود، به دست آمد و در حجم ۱ میلی‌لیتر الیکوت و در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۱).

انتقال سلول‌ها به داربست فیبرین: کیسه‌ی Cryocipitate تهیه شده از بانک خون استان اصفهان، به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد گذاشته شد؛ پس از ضد عفونی سطح خارجی کیسه با الکل ۷۰ درصد، به هود کلاس II منتقل گردید و تحت شرایط استریل با استفاده از سرنگ ۱۰ میلی‌لیتر، محتویات درون آن در سرنگ کشیده شد. میزان ۳۰۰ میکرولیتر (به ازای هر چاهک) از آن که حاوی فیبرینوژن فراوان است، به چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه، منتقل شد. بعد از جدا کردن سلول‌های حاصل از پاساژ سوم از فلاسک‌ها، سوپانسیون سلول شمارش شد و به هر چاهک از پلیت ۲۴ خانه، ۳۰ میکرولیتر محیط کشت خالص دارای یک میلیون سلول اضافه شد و به هر چاهک ۳۰۰ میکرولیتر ترومبین اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه پلیت در زیر هود بی‌حرکت ماند تا ترومبین، فیبرینوژن را به شکل شبکه‌ی فیبرین تبدیل کند و داربست فیبرین تشکیل گردد (۲۱).

آن‌گاه، برای هر گروه سه تکرار گذاشته شد. به گروه اول محیط کشت القای کندروژنیک شامل DMEM high glucose (Gibco)، Penicillin/Streptomycin ۱ درصد (Gibco، انگلیس)،  $10^{-8}$  میکروگرم Dexamethasone (Sigma، آمریکا)، Insulin, Transferrin, Selenium ۱ درصد (Sigma، آمریکا)، BSA (Bovine serum albumin) ۱ درصد (Sigma، آمریکا)، ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ASP (Ascorbate 2 phosphate)

دستگاه Real-time PCR طبق برنامه‌ی زیر منتقل گردید: برنامه‌ی اول برای Denaturation در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه شروع شد. Denaturation در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، Annealing در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و Extension در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و کل این فرایندها در ۴۰ چرخه صورت گرفت (۲۴-۲۵). در پایان، منحنی ذوب (Melt curve) رسم شد. این برنامه برای هر سه ژن به کار رفت. همه‌ی پرایمرهای مورد استفاده در Real-time PCR، با استفاده از نرم‌افزار Allele ID نسخه‌ی ۷/۶ طبق جدول ۱ طراحی شد. برای بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون Kolmogorov-Smirnov و برای آنالیز داده‌ها از روش One-way ANOVA و آزمون‌های LSD (Least significant difference)، Post-hoc و نرم‌افزار آماری SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) استفاده گردید.

### یافته‌ها

#### بررسی نتایج بقا و تکثیر سلول‌های بنیادی

به دنبال استفاده از محلول MTT، کریستال‌های فورمازان آبی تیره در ADSCs نشانگر فعالیت متابولیکی آن‌ها بود. با این وجود، استفاده از پیاسکلیدین، میزان تکثیر و بقای ADSCs تمایز یافته به کندروسیت‌ها را افزایش داد، اما تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه با گروه شاهد دیده نشد ( $P > 0/05$ ) (شکل‌های ۲ و ۳).

#### Real-time PCR

نتایج Real-time PCR نشان داد که بیان ژن‌های کلاژن II، X و اگریکان تفاوت معنی‌داری نسبت به یکدیگر داشتند ( $P < 0/01$ ). بیان ژن کلاژن II در روز ۲۱ به ویژه در گروه TP

در ابتدا، داربست فیبرین با PBS شستشو داده شد و برای استخراج RNA از سلول‌های ایمپلنت شده در داربست فیبرین، از RNeasy mini kit (Qiagen, Cat. No. 74101) استفاده شد. برای تجزیه‌ی سلول‌ها، ۹۹۰ میکرولیتر ترایزول به همراه ۱۰ میکرولیتر مرکاپتو اتانول به توده‌ی سلولی اضافه گردید و ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به این محلول اضافه و پس از تکان شدید به مدت ۱۵ ثانیه، به مدت ۲-۳ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه انجام شد.

محلول رویی شامل ۳ بخش، به یک اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و هم حجم آن الکل ۷۵ درصد به آن اضافه و با تکان دادن دست مخلوط گردید. محلول حاصل به تیوب فیلتردار داخل کیت (ستون) انتقال یافت (همین عمل برای باقی مانده‌ی محلول تکرار گردید). سپس، طبق دستور موجود در کیت، استخراج RNA صورت گرفت. برای از بین بردن DNAهای موجود، DNAase استفاده شد. تعیین میزان RNA استخراج شده با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر بررسی گردید.

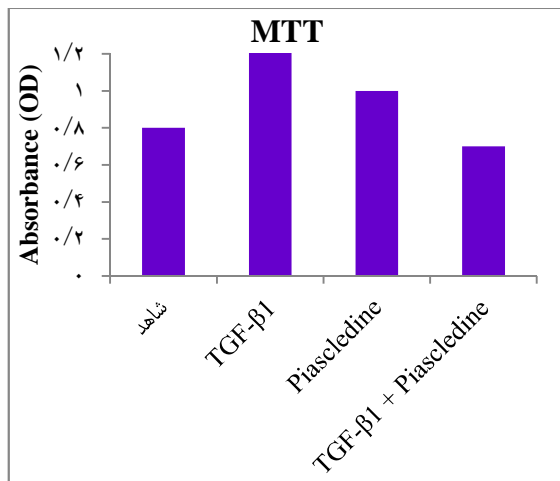
برای سنتز cDNA (Complementary DNA) مطابق دستور سازنده، از RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas، انگلیس) استفاده شد. اندازه‌گیری میزان بیان نسبی ژن‌های اگریکان، کلاژن II و X با استفاده از پرایمر GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) به عنوان شاهد داخلی و همچنین، با به کارگیری کیت Maxima SYBR®Green/RoxqPCR master Mix 2X (Fermentas، انگلیس) با روش Comparative Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) انجام شد. برای هر ژن، علاوه بر سه تکرار برای هر گروه، یک گروه شاهد منفی نیز در نظر گرفته شد. در آخرین مرحله نیز تیوب‌های نواری به

جدول ۱. ژن و پرایمرهای به کار رفته در Real-time Polymerase chain reaction

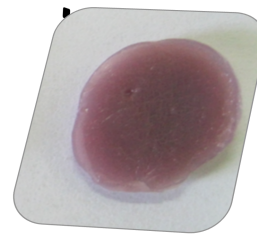
نام ژن	توالی پرایمر	Scale (میکرو مول)
Col II-F	CTGGTGATGATGGTGAAG	۰/۰۲
Col II-R	CCTGGATAACCTCTGTGA	
Aggre-F	GTGGGACTGAAGTTCTTG	۰/۰۲
Aggre-R	GTTGTCATGGTCTGAAGTT	
GAPDH-F	AAGCTCATTTCCTGGTATG	۰/۰۲
GAPDH-R	CTTCCTCTGTGCTCTTG	
Col X-F	AGAATCCATCTGAGAATATGC	۰/۰۲
Col X-R	AGAATCCATCTGAGAATATGC	

F: Forward primer; R: Reverse primer, Col II; Collagene type II; Col X; Collagene type X; Aggre: Aggrecan; GAPDH: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

نسبت به گروه T حدود ۲۰۰ برابر و نسبت به گروه TP حدود ۲۰ برابر بود (شکل ۴-۳).



شکل ۳. مقایسه‌ی نتایج MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-] MTT [2,5-diphenyltetrazolium bromide] در این سه گروه. تفاوت معنی‌داری بین این سه گروه و گروه شاهد وجود نداشت ( $P > 0.05$ ).

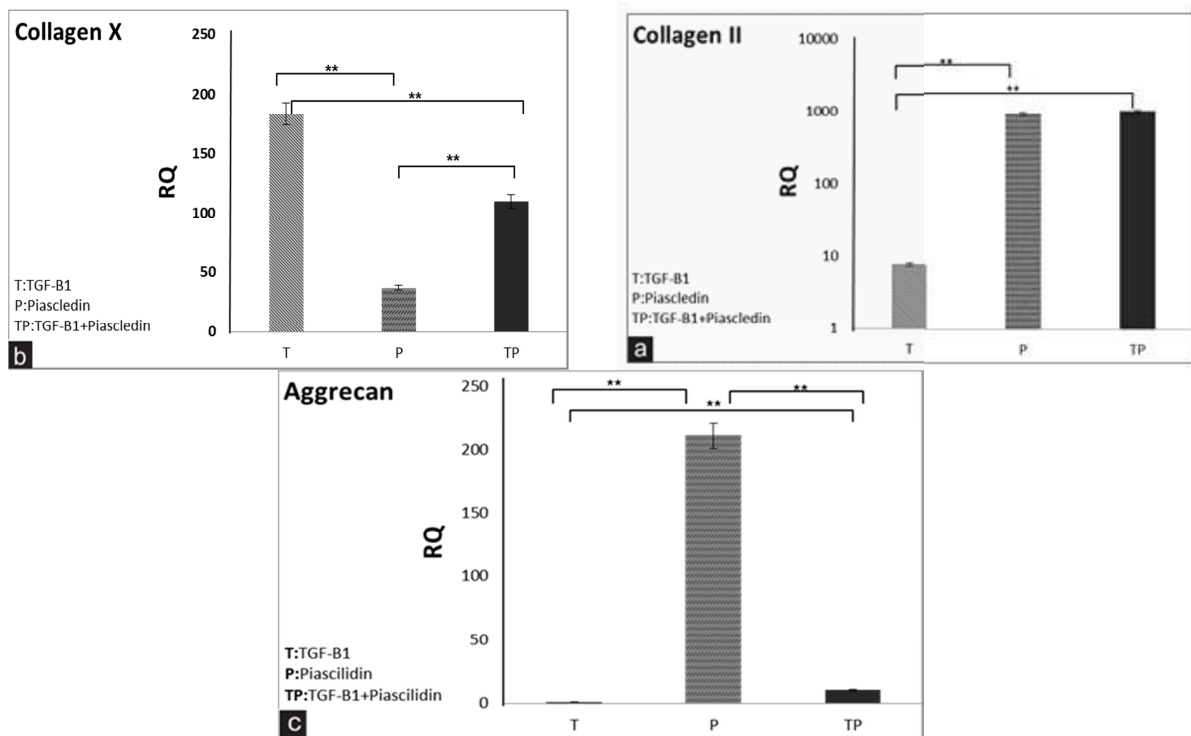


شکل ۲. نتایج حاصل از MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-] MTT [2,5-diphenyltetrazolium bromide]

رنگ بنفش حاصل از فعالیت متابولیسی سلول‌ها در داربست فیبرین

(TGF-β1 + Piascledine) نسبت به گروه T (TGF-β1) حدود ۱۰۰ برابر و بیان این ژن در گروه P (Piascledine) در مقایسه با گروه T (TGF-β1) حدود ۹۰ برابر بود (شکل ۴-۳). بیان ژن هایپرتروفی X کلاژن در گروه T نسبت به گروه P حدود ۵ برابر و نسبت به گروه TP حدود ۱/۵ برابر بود (شکل ۴-۲). نتایج Real-time PCR نشان داد که بیان ژن اگریکان در گروه تحت تأثیر پیاسکلیدین بیشتر از گروه‌های دیگر بود؛ بیان این ژن، در گروه P

#### Real-time PCR



شکل ۴. نتایج Real-time PCR (Real-time polymerase chain reaction) برای ژن کلاژن II (a)، کلاژن X (b) و اگریکان (c). در همی

گروه‌ها نتایج در روز ۲۱ مشاهده شده است. مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار مربوط به سه آزمایش است.

علامت \*\* نشان دهنده معنی‌دار بودن تفاوت گروه‌ها با یکدیگر است ( $P < 0.01$ ).

P: گروهی که تحت تأثیر پیاسکلیدین بوده است؛ T: گروهی که تحت تأثیر TGF-β1 بوده است؛ TP: گروهی که تحت تأثیر پیاسکلیدین و TGF-β1 بوده است.

## بحث

امروزه، یکی از چالش‌های موجود در مهندسی بافت، استفاده از داربست‌های مناسب است. این داربست‌ها، باید شباهت زیادی به ماتریکس خارج سلولی غضروف داشته باشند (۲۶، ۲۰). از طرفی، ثبات مکانیکی و غیر فعال بودن این داربست‌ها برای تحویل دادن سلول و حفظ مواد زیستی نیازمند کنترل چسبندگی سلول، تکثیر و تمایز در مکان آسیب دیده می‌باشد (۲۹-۲۷). در مهندسی بافت، مواد زیستی مورد استفاده برای هر بافت اختصاصی می‌باشد و اغلب از هیدروژل‌های مرکب از پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی مانند فیبرین به دفعات به عنوان داربست استفاده می‌شود (۲۹).

داربست فیبرین، دارای توزیع یکنواخت سلولی است و می‌تواند مولکول‌های زیستی را به راحتی در داخل خود جای دهد (۹). این داربست، از لحاظ زیست تخریب پذیری مناسب است و در ترمیم بافت‌های مختلف استفاده می‌شود (۳۰). علاوه بر این، میزان استحکام داربست فیبرین با به کار بردن آن به همراه مواد زیستی جامد دیگر قابل تقویت است (۳۱).

Dragoo و همکاران نشان دادند که داربست فیبرین مناسب‌ترین داربست برای ترمیم غضروف مفصلی خرگوش است (۳۲). Wei و همکاران گزارش کردند که مخلوط کردن کندرویتین سولفات به همراه داربست فیبرین در مقایسه با داربست فیبرین فاقد کندروایتین سولفات، باعث افزایش بیان ژن کلاژن II و GAG (Group-specific antigen) می‌شود (۳۳). Connelly و همکاران نشان دادند که داربست فیبرین باعث افزایش میزان سولفات گلیکوز آمینوگلیکان‌ها می‌شود (۳۱). در گزارش Thompson و همکاران، مشخص گردید که داربست فیبرین موقع تشکیل شدن و تخریب شدن باعث آزادسازی عوامل کموتاکتیک می‌شود (۳۴).

Ryan و همکاران نشان دادند که ترومبین تشکیل دهنده‌ی داربست فیبرین باعث تشکیل شبکه‌ای از فیبرهای کوتاه نازک و سوراخ‌های کوچک می‌شود (۳۵). Carr گزارش نمود که فیبرهای نازک با فضاهای کوچک به طور قابل توجهی باعث کاهش مهاجرت سلول‌ها در شرایط *In vitro* می‌شود و استفاده از فیبرهای ضخیم با فضاهای بزرگ مناسب‌تر است؛ چرا که، اندازه‌ی این فضاها به اندازه‌ی تهاجم سلول‌ها مهم است (۳۶).

مطالعه‌ی حاضر مشخص نمود زمانی که پیاسکلیدین، TGF- $\beta$ 1 و ترکیب هر دوی آن‌ها در سه محیط کشت جدا گانه اضافه شد، میزان تکثیر و بقای آن‌ها نسبت به گروه شاهد که فاقد این ترکیبات بود، تفاوت قابل توجهی نداشت. نتایج به دست آمده مشابه نتایج مطالعات Bensaïd و همکاران (۳۷) و Lin و همکاران (۳۸) بود. آن‌ها مشخص نمودند که بقا و تکثیر BMSCs (Bone marrow stromal cells)

در داربست فیبرین حفظ می‌شود. همچنین Girandon و همکاران نشان دادند که ADSCs قادر به تکثیر و بقا در داربست فیبرین هستند (۳۹). در تحقیق حاضر، بر خلاف مطالعات قبلی که بیشتر از فیبرین تجاری تهیه شده از خون حیوان استفاده می‌شد، از فیبرین با منشأ انسانی که به صورت دستی تهیه شد، استفاده گردید.

در تحقیق حاضر، تجزیه و تحلیل نتایج 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 در حضور پیاسکلیدین، TGF- $\beta$ 1 و ترکیب هر دوی آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. نکته‌ی قابل توجه در نتایج به دست آمده این است که پیاسکلیدین به عنوان یک القا کننده‌ی قوی کندروژنیک عمل کرد. لازم به ذکر است که در زمینه‌ی القای کندروژنز سلول‌های بنیادی تحت تأثیر پیاسکلیدین، هیچ گونه گزارشی به دست نیامد و این مطالعه، اولین مورد در به کارگیری پیاسکلیدین در مهندسی بافت غضروف بود.

در زمینه‌ی بررسی تأثیر پیاسکلیدین در کشت سلول‌های کندروسیت طبیعی، Henrotin و همکاران نشان دادند که این ترکیب، موجب افزایش تولید آگریکان در کندروسیت‌ها در شرایط *In vitro* می‌شود (۴۰). از نتایج مهم دیگر مطالعه‌ی حاضر، بیان ژن کلاژن نوع II که از ترکیبات مهم غضروف هیالین محسوب می‌شود، به میزان ۹۰ برابر در گروه حاوی پیاسکلیدین نسبت به گروه دارای TGF- $\beta$ 1 می‌باشد؛ مقایسه‌ی بیان ژن‌های مخصوص غضروف مانند آگریکان و کلاژن II نشان داد که پیاسکلیدین به عنوان یک ترکیب گیاهی، قادر است بهتر و بیشتر از عامل رشد TGF- $\beta$ 1 در القای سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی جهت مهندسی بافت غضروف مؤثر واقع شود. لازم به ذکر است بیان ژن کلاژن X که عامل هایپرتروفه شدن کندروسیت‌ها و مرگ این سلول‌ها است، در گروه پیاسکلیدین بسیار کمتر از گروه TGF- $\beta$ 1 بوده است و یک کاهش ۵ برابری نسبت به گروه TGF- $\beta$ 1 نشان می‌دهد. بررسی این نتایج نشان داد که ژن‌های ویژه‌ی غضروف مانند کلاژن نوع II و آگریکان در گروه‌های مختلف بیان متفاوتی دارند. لازم به ذکر است که جهت دستیابی به غضروف هیالین، باید در شرایط القای کندروژنز از سلول‌های بنیادی، بیان ژن کلاژن نوع X کاهش یابد تا از هایپرتروفه شدن جلوگیری به عمل آید و غضروف طراحی شده، دارای ثبات مناسبی باشد تا امکان استفاده‌ی بالینی فراهم گردد.

گرچه TGF- $\beta$ 1 عامل رشدی است که برای تمایز به کندروسیت در *In vitro* بیشترین استفاده را دارد و در شروع روند کندروژنز نقش اصلی را ایفا می‌کند (۴۱)، مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که افزودن پیاسکلیدین به TGF- $\beta$ 1 در بیان ژن‌های کلاژن II اثر مثبت داشته و میزان بیان این ژن را افزایش داده است. به طور کلی، می‌توان از نتایج

غضروف هیالین نزدیک‌تر و شبیه‌تر می‌باشد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب سپاسگزاری خود را از حمایت‌های معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان جهت تصویب طرح به شماره‌ی ۳۹۳۷۲۲ را اعلام می‌دارند.

تحقیق حاضر به این نکته رسید که گرچه همراهی دو عامل TGF- $\beta$ 1 و پیاسکلیدین تأثیر مثبتی بر افزایش ژن‌های غضروفی و کاهش ژن هایپرتروفه در روند کندروژنز دارد، اما به کارگیری پیاسکلیدین به تنهایی نقش مؤثرتری در این فرایند دارد و علاوه بر افزایش بیان کلاژن II و آگریکان به صورت قابل ملاحظه، موجب کاهش کلاژن X نیز می‌شود و غضروف به دست آمده، به کندروسیت‌های طبیعی

### References

- Fazelipour S, Kiaei SB, Egtesad AH, Tootian Z. The effect of soya bean meal on tibial articular cartilage growth in mice after suckling period: A histomorphometric and biochemical study. *Turk J Med Sci* 2012; 42(2): 253-8.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Zhao H, Ma L, Gong Y, Gao C, Shen J. A polylactide/fibrin gel composite scaffold for cartilage tissue engineering: fabrication and an in vitro evaluation. *J Mater Sci Mater Med* 2009; 20(1): 135-43.
- Ragetly GR, Griffon DJ, Lee HB, Fredericks LP, Gordon-Evans W, Chung YS. Effect of chitosan scaffold microstructure on mesenchymal stem cell chondrogenesis. *Acta Biomater* 2010; 6(4): 1430-6.
- 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.
- 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.
- Henrotin YE, Labasse AH, Jaspard JM, De Groot 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.
- Zhao H, Ma L, Gao C, Shen J. A composite scaffold of PLGA microspheres/fibrin gel for cartilage tissue engineering: fabrication, physical properties, and cell responsiveness. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009; 88(1): 240-9.
- Davidson EB, Vitters E, van Beuningen H, van de Loo F, van den Berg W, van der Kraan P. Osteophytes in experimental osteoarthritis resemble TGF- $\beta$ -induced osteophytes. limited role of BMP in early osteoarthritic osteophyte formation. In: Davidson EB, editor. *TGF- $\beta$  in osteoarthritis*. Nijmegen, Netherlands: Radboud University Nijmegen; 2007.
- Ab-Rahim S, Selvaratnam L, Raghavendran HR, Kamarul T. Chondrocyte-alginate constructs with or without TGF-beta1 produces superior extracellular matrix expression than monolayer cultures. *Mol Cell Biochem* 2013; 376(1-2): 11-20.
- Thorpe SD, Buckley CT, Vinardell T, O'Brien FJ, Campbell VA, Kelly DJ. The response of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to dynamic compression following TGF-beta3 induced chondrogenic differentiation. *Ann Biomed Eng* 2010; 38(9): 2896-909.
- 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.
- Saraf A, Mikos AG. Gene delivery strategies for cartilage tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58(4): 592-603.
- Pavelka K, Coste P, Geher P, Krejci G. Efficacy and safety of piacledine 300 versus chondroitin sulfate in a 6 months treatment plus 2 months observation in patients with osteoarthritis of the knee. *Clin Rheumatol* 2010; 29(6): 659-70.
- 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].
- 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.
- Hashemibeni B, Razavi Sh, Esfandiary E, Karbasi S, Mardani M, Nasresfahani M. Induction of chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells with TGF- $\beta$ 3 in pellet culture system. *Iran J Basic Med Sci* 2008; 11(1): 10-7.

21. 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.
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. Hunziker EB. Growth-factor-induced healing of partial-thickness defects in adult articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2001; 9(1): 22-32.
27. George M, Abraham TE. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan--a review. *J Control Release* 2006; 114(1): 1-14.
28. Rabie A, Esfandiari E, Fesharaki M, Sanaie M, Aminmansur B, Hashemibeni B. Access to a three dimensional osteoblasts culture originating human carvaria in Iran. *J Isfahan Med Sch* 2010; 27(102): 777-87. [In Persian].
29. Harrison P, Wilbourn B, Debili N, Vainchenker W, Breton-Gorius J, Lawrie AS, et al. Uptake of plasma fibrinogen into the alpha granules of human megakaryocytes and platelets. *J Clin Invest* 1989; 84(4): 1320-4.
30. Le Nihouannen D, Guehenec LL, Rouillon T, Pilet P, Bilban M, Layrolle P, et al. Micro-architecture of calcium phosphate granules and fibrin glue composites for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006; 27(13): 2716-22.
31. Connelly JT, Vanderploeg EJ, Mouw JK, Wilson CG, Levenston ME. Tensile loading modulates bone marrow stromal cell differentiation and the development of engineered fibrocartilage constructs. *Tissue Eng Part A* 2010; 16(6): 1913-23.
32. Dragoo JL, Carlson G, McCormick F, Khan-Farooqi H, Zhu M, Zuk PA, et al. Healing full-thickness cartilage defects using adipose-derived stem cells. *Tissue Eng* 2007; 13(7): 1615-21.
33. Wei Y, Hu Y, Hao W, Han Y, Meng G, Zhang D, et al. A novel injectable scaffold for cartilage tissue engineering using adipose-derived adult stem cells. *J Orthop Res* 2008; 26(1): 27-33.
34. Thompson WD, Smith EB, Stirk CM, Marshall FI, Stout AJ, Kocchar A. Angiogenic activity of fibrin degradation products is located in fibrin fragment E. *J Pathol* 1992; 168(1): 47-53.
35. Ryan EA, Mockros LF, Weisel JW, Lorand L. Structural origins of fibrin clot rheology. *Biophys J* 1999; 77(5): 2813-26.
36. Carr ME. Fibrin formed in plasma is composed of fibers more massive than those formed from purified fibrinogen. *Thromb Haemost* 1988; 59(3): 535-9.
37. Bensaid W, Triffitt JT, Blanchat C, Oudina K, Sedel L, Petite H. A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials* 2003; 24(14): 2497-502.
38. Lin N, Lin J, Bo L, Weidong P, Chen S, Xu R. Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells in an alginate scaffold. *Cell Prolif* 2010; 43(5): 427-34.
39. Girandon L, Kregar-Velikonja N, Bozikov K, Barlic A. In vitro models for adipose tissue engineering with adipose-derived stem cells using different scaffolds of natural origin. *Folia Biol (Praha)* 2011; 57(2): 47-56.
40. Henrotin YE, Deberg MA, Crielaard JM, Piccardi N, Msika P, Sanchez C. Avocado/soybean unsaponifiables prevent the inhibitory effect of osteoarthritic subchondral osteoblasts on aggrecan and type II collagen synthesis by chondrocytes. *J Rheumatol* 2006; 33(8): 1668-78.
41. Weiss S, Hennig T, Bock R, Steck E, Richter W. Impact of growth factors and PTHrP on early and late chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2010; 223(1): 84-93.



## Effect of Piasclidin on Induction of Chondrogenesis by Human Adipose-Derived Stem Cells in Fibrin Scaffold

Mojtaba Esmaeily<sup>1</sup>, Batool Hashemibeni PhD<sup>2</sup>, Ali Valiani PhD<sup>3</sup>, Noushin Amirpour PhD<sup>3</sup>, Babak Purmollaabbasi<sup>4</sup>, Mohammad Kazemi MSc<sup>5</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Cartilage tissue damage is one of the problems in the clinic and the current treatment methods would not be lead to full repair of damage; therefore, tissue engineering in this field is considered. In tissue engineering, biomaterials such as growth factors and appropriate cells are used. Since the growth factors such as transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) leads to hypertrophy of cartilage, it is essential to achieve the appropriate inducer factors. Studies have shown that piasclidine had a positive effect on cultured chondrocytes. In this study, the effect of the piasclidine on chondrogenesis of human adipose-derived stem cells was examined.

**Methods:** Fat samples were obtained from three liposuction surgeries. Stem cells were extracted from adipose tissue and proliferated via the third passage. Then, the cells were transferred to the fibrin scaffold and cultured for 21 days under the influence of the chondrogenic imedium in three groups. The rate of cell proliferation was evaluated using MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] method and the rate of gene expression of aggrecan and types II and X collagen was evaluated via real-time polymerase chain reaction (PCR) method.

**Findings:** The rate of proliferation and survival of cells in a fibrin scaffold was not different significantly between the groups ( $P > 0.05$ ); but the gene expression of type II collagen and aggrecan was significantly more expression of type X collagen was significantly less in piasclidine group compared to the of TGF- $\beta$  group ( $P < 0.01$ ).

**Conclusion:** Piasclidine is an effective factor in induction of chondrogenesis of stem cells and also has a significant effect on reduction of the cell hypertrophy.

**Keywords:** Adipose-derived stem cell, Chondrogenesis, Piasclidine

**Citation:** Esmaeily M, Hashemibeni B, Valiani A, Amirpour N, Purmollaabbasi B, Kazemi M. **Effect of Piasclidin on Induction of Chondrogenesis by Human Adipose-Derived Stem Cells in Fibrin Scaffold.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(357): 1862-70

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

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

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

4- MSC Student, Department of Tissue Engineering, School of Basic Engineering, Najafabad Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

5- PhD Student, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

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