

بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی سیکریتا جمع‌آوری شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی بر کشت سلول‌های غضروفی انسانی C28I2 تحریک شده توسط غلظت بالای گلوکز

چکیده

دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۲۲ ویرایش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۷ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۱/۰۷ آنلاین: ۱۴۰۲/۰۱/۱۵

صدیقه صفری^۱، اکرم عیدی^۱، مهرناز مهربانی^۲، محمدجواد فاطمی^۳، علی محمد شریفی^{۴*}

- ۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران.
- ۲- مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.
- ۳- مرکز تحقیقات سوختگی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
- ۴- مرکز تحقیقات علوم دارویی رازی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
- ۵- گروه فارماکولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، مرکز تحقیقات علوم دارویی رازی، دپارتمان فارماکولوژی.

تلفن: ۰۲۱-۸۸۶۲۵۳۳
E-mail: sharifalim@gmail.com

مقدمه

استئوآرتروز (Osteoarthritis) یک بیماری مزمن مفصلی است که مشخصه بارز آن تخریب پیش‌رونده غضروف‌ها است و علت اصلی درد و ناتوانی در افراد مسن محسوب می‌شود.^۱ یافته‌های جدید در خصوص پاتوفیزیولوژی بیماری مشخص نموده که این عارضه یک حالت مرتبط با سن، جنس، ژنتیک، شرایط تروما و متابولیک است.

زمینه و هدف: استئوآرتروز یک بیماری دژنراتیو مفصلی و شایع‌ترین نوع آرتروز است که سبب درد، ناتوانی و اختلال در عملکرد بیماران می‌شود. قند خون بالا به واسطه استرس اکسیداتیو و افزایش میزان گونه‌های فعال اکسیژن و ایجاد واسطه‌های التهابی بر غضروف تاثیر می‌گذارد. از آنجایی که درمان‌های دارویی برای استئوآرتروز کوتاه مدت و غیرموثر هستند، نیاز به درمان‌های جدید جهت درمان استئوآرتروز وجود دارد. استفاده از محلول رویی سلول‌های بنیادی مزانشیمی یا سیکریتا که حاوی محصولات ترشحی از قبیل فاکتورهای رشد و سیتوکین‌ها است به‌عنوان یک جایگزین مناسب جهت درمان استئوآرتروز در نظر گرفته شود. هدف از این مطالعه اثرات سیکریتا بر استرس اکسیداتیو القا شده توسط غلظت بالای گلوکز در کندروسیت‌های انسانی C28I2 می‌باشد.

روش بررسی: تحقیق حاضر به‌صورت تجربی از اردیبهشت ۱۳۹۷ تا شهریور ۱۳۹۹ در گروه فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام شد. اثر سیکریتا و غلظت بالای گلوکز بر میزان بقای سلول‌های غضروفی C28I2 توسط آزمون WST1 بررسی گردید. سپس تاثیر سیکریتا بر بیان mRNA، کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD1) و گلوکاتیون اس ترانسفرازها (GSTP1) I در گروه‌های درمانی و غیردرمانی مقایسه شدند.

یافته‌ها: پیش‌درمانی کندروسیت‌های انسانی C28I2 با سیکریتا سبب افزایش بیان ژن‌های CAT، SOD1 و GSTP1 در سلول‌های مجاورت داده شده با غلظت گلوکز بالا نسبت به گروه درمان نشده می‌شود.

نتیجه‌گیری: سیکریتا می‌تواند در سلول‌های غضروفی تحریک شده توسط غلظت بالای گلوکز، استرس اکسیداتیو را از طریق افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کاهش دهد و چون استرس اکسیداتیو از مکانیسم‌های اصلی آسیب غضروف می‌باشند، سیکریتا می‌تواند در جلوگیری از پیشرفت استئوآرتروز مفید باشد.

کلمات کلیدی: سیکریتا، سلول بنیادی مزانشیمی، استئوآرتروز، استرس اکسیداتیو.

در پیدایش و پیشبرد این بیماری شرایط متابولیک همچون بالا بودن قند (دیابت)، تغییرات هورمونی و رادیکال‌های آزاد نقش مهم و عمده‌ای دارند که منجر به ایجاد این عارضه در سنین میان‌سالی (۴۵-۶۵ سالگی) شده و درد و ناتوانی را برای بیماران ایجاد می‌کنند.^۲ هایپرگلیسمی یکی از عوامل مهم در بروز استئوآرتروز شناخته می‌شود که به‌طور موضعی آسیب‌زایی آن بر غضروف به‌سبب ایجاد استرس اکسیداتیو و محصولات نهایی گلیکوزیلاسیون پیشرفته است

استوآرتريت به منظور جایگزینی سلول‌های ناحیه آسیب‌دیده می‌توان استفاده کرد.^{۱۴،۱۳}

علیرغم خواص مفید سلول‌های بنیادی، محدودیت‌های متعددی برای استفاده از آنها به‌عنوان درمان سلولی وجود دارد به‌طور مثال ممکن است این سلول‌ها دارای خاصیت تومورزایی باشند، پاسخ ایمنی ایجاد کنند، به بافت نامطلوب تمایز پیدا کنند، یا بقای کمی پس از پیوند نشان دهند.^{۱۶،۱۵} این خطرات سبب شد که مطالعات به سمت استفاده از محیط رویی سلول‌های بنیادی (سیکریتا، conditioned medium) معطوف شود.^۱ اثرات مفید سلول‌های بنیادی از طریق مکانیسم‌های پاراکرینی آنها انجام می‌شود.^{۱۸،۱۷}

با توجه به مزایای درمانی سیکریتا، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر محافظتی سیکریتا جمع‌آوری شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی در برابر استرس اکسیداتیو با واسطه غلظت گلوکز بالا بر روی سلول‌های غضروفی انسانی C28I2 انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه، برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بافت چربی به‌دست‌آمده از جراحی لیپوساکشن اهداکننده سالم (با کسب رضایت) در سرم فیزیولوژی حاوی آنتی‌بیوتیک و در دمای چهار درجه سانتیگراد از بیمارستان میلاد به آزمایشگاه منتقل و پس از چندین بار شستشو با فسفات‌بافر سالین حاوی پنی‌سیلین، استرپتومایسین، آمفی‌تریسین و نیز جنتامایسین شسته و با استفاده از قیچی و تیغ بیستوری به قطعات کوچک ۲-۱ mm تبدیل شد. سپس سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌وسیله هضم با آنزیم کلاژناز I از بافت چربی استخراج گردید. به‌این‌صورت که ابتدا نمونه‌ها در مجاورت کلاژناز تیپ ۱ (۰/۰۷۵٪) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. سپس تحت سانتریفوژ به مدت شش دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفته و در نهایت رسوب سلولی به‌منظور حذف گلبول‌های قرمز به مدت ۱۰ دقیقه در مجاورت ۱ cc کلرید آمونیوم (NH₄CL) بر روی یخ قرار داده شد. سپس مخلوط تحت سانتریفوژ قرار گرفت. دو بار با فسفات‌بافر سالین شستشو داده شد. در نهایت رسوب سلولی در محیط کشت α-MEM حاوی آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین و FBS ۱۰٪ به فلاسک مخصوص کشت

که منجر به سخت‌شدگی و خشکی ماتریکس، آسیب به استخوان ساب‌کندرال و نقص عملکرد کندروسیت‌ها می‌شود. همچنین هیپیرگلیسمی سبب اختلال در سنتز کلاژن نوع II، افزایش گونه‌های فعال اکسیژن و ایجاد واسطه‌های التهابی در بافت غضروف می‌شود.^{۳،۴} استرس اکسیداتیو ناشی از هیپیرگلیسمی منجر به التهاب، اختلال در سیستم آنتی‌اکسیدانی گلوکاتیون و فعال نمودن مسیرهای داخلی و خارجی آپوپتوز می‌گردد که این موارد در پاتوژنز بیماری استوآرتريت نقش مهمی را دارند.^{۶،۵}

در شرایط فیزیولوژیکی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوکاتیون پراکسیداز و گلوکاتیون ردوکتاز نقش مهمی در محافظت از بافت‌ها و اجزای سلولی ناشی از آسیب استرس اکسیداتیو ناشی از ROS ایفا می‌کنند. سلول‌های غضروفی نیز جهت کاهش اثرات استرس اکسیداتیو از این سیستم آنتی‌اکسیدانی استفاده می‌کند.^۷ گلوکاتیون اس ترانسفرازها (Glutathione S-transferases) نیز خانواده‌ای از آنزیم‌ها هستند که نقش مهمی در سم‌زدایی دارند. گلوکاتیون اس ترانسفرازها به هفت کلاس اصلی آلفا، مو، پی، تا، امگا، سیگما و زتا دسته‌بندی می‌شوند که نوع یک در فرآیندهای بیولوژیکی متنوعی از جمله سم‌زدایی و محافظت سلول‌ها در برابر آسیب اکسیداتیو دخالت دارد.^۸ علاوه‌براین، شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد آنتی‌اکسیدان‌های آگروژن می‌توانند از آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو در سلول‌های غضروفی محافظت کنند.^۹

در حال حاضر درمان‌های مناسب مورداستفاده بیشتر علامتی هستند و هدف اصلی برطرف کردن درد می‌باشد که شامل مسکن‌هایی مانند استامینوفن، داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی و تزریق استروئید داخل مفصلی است و در مراحل انتهایی که درمان‌های محافظه کارانه پاسخگو نیست و تخریب شدید سطوح مفصلی همراه با دفورمیتی وجود دارد، جراحی است.^{۱۱،۱۰}

محدودیت‌های درمان‌های مرسوم، نیاز به عوامل جدید بالینی ایمن و موثر برای درمان استوآرتريت را برجسته می‌کند. استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی یک گزینه درمانی امیدوارکننده برای بیماری‌های مختلف از جمله استوآرتريت است.^{۱۲} بسته به نوع سلول بنیادی و تحت شرایط خاص، این سلول‌ها می‌توانند به یک یا چند نوع سلول مختلف مانند سلول‌های چربی، غضروف، استئوبلاست تبدیل شوند. از این توانایی برای درمان بیماری‌های مختلف از جمله

به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شد تا دبریدمان و سلول‌ها رسوب یابند، سپس مایع رویی جمع‌آوری و تا زمان استفاده در دمای 80°C - فریز شد.

استخراج RNA: ابتدا سلول‌های C28I2 در فلاسک‌های 75cm^2 کشت داده شدند. زمانی که سلول‌ها 70% - 60% کف فلاسک را پر کردند محیط حاوی سرم خارج شد و سلول‌ها با محیط کشت بدون سرم به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و پس از آن جهت انجام آزمایش استفاده شدند.

آزمایش بر روی سه گروه سلولی انجام شد، گروه کنترل که با محیط کشت درمان شد، گروه غلظت گلوکز بالا که به مدت ۲۴ ساعت در مجاورت محیط کشت بدون FBS و سپس با گلوکز 75 میلی‌مولار به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد و گروه درمانی که به مدت ۲۴ ساعت با سیکریتا پیش درمانی شدند و سپس گلوکز به میزان 75 مولار اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای 37°C انکوبه شدند.

پس از سپری شدن زمان موردنظر، سلول‌ها تریسینه گردیده و دو بار با محلول فسفات‌بافر سالین سرد شستشو داده شدند. برای بررسی بیان ژن‌ها، استخراج RNA از نمونه‌ها توسط محلول تریزول استفاده گردید. همچنین میزان غلظت و خلوص RNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ (Thermo scientific, waltham, MA, USA) تعیین گردید.

برای بررسی بیان ژن‌ها طبق جدول ۱ پرایمرها طراحی شدند و پس از بررسی انفورماتیکی و تطبیقی به شرکت ماکروژن کره (Macrogen, Korea) سفارش ساخت داده شد. برای سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA شرکت Thermo science, Germany طبق دستورالعمل شرکت سازنده در دمای 42°C به مدت یک ساعت انجام شد. میکروتیوب در دمای 72°C و به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند. محصول واکنش تا زمان انجام PCR در دمای 20°C - نگهداری گردید. پس از ساخت cDNA مرحله PCR برای ژن‌های جدول ۱ در حجم $25\ \mu\text{l}$ با استفاده از دستورالعمل کیت CinqGen Inc., Tehran, Iran اجرا شد. این مرحله در دستگاه Eppendorf, USA صورت گرفت و با برنامه واسرشتگی اولیه در دمای 94°C به مدت سه دقیقه، 35 سیکل با برنامه واسرشتگی در دمای 94°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها به هدف در دمای 60°C

سلول منتقل و در انکوباتور 37°C حاوی 5% CO_2 و رطوبت 95% قرار داده شدند. پس از گذشت یک روز، سلول‌هایی که به کف فلاسک نچسبیده بودند، با تعویض محیط از فلاسک حذف شدند.

محیط کشت سلول‌ها هر سه روز یک بار تعویض گردید. رده سلولی سلول‌های غضروفی انسانی C28I2 از انستیتو پاستور خریداری شد و در محیط کشت DMEM/F12 تحت شرایط دمایی 37 درجه سانتیگراد و 5% دی‌اکسیدکربن رشد داده و نگهداری شدند. تست WST1: برای به دست آوردن بهترین غلظت و زمان جهت پیش‌درمانی توسط سیکریتا، سلول‌های غضروفی C28I2 با تعداد 5×10^4 سلول در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. پس از طی ۲۴ ساعت محیط حاوی FBS خارج شد و سلول‌ها با محیط کشت بدون FBS به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و پس از آن درمان سلول‌ها انجام شد.

گروه غلظت گلوکز بالا و گروه درمانی به مدت ۲۴ ساعت به ترتیب با محیط کشت بدون FBS و غلظت 50% سیکریتا پیش‌درمان شدند. سپس گلوکز با غلظت 75 میلی‌مولار به سلول‌ها اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای 37°C انکوبه شدند. پس از اتمام دوره انکوباسیون محیط کشت خارج شد و سلول‌ها دوبار به آرامی با فسفات‌بافر سالین شستشو داده شدند، سپس تست WST1 انجام شد. به این صورت که $10\ \mu\text{l}$ از محلول WST1 به همراه $90\ \mu\text{l}$ محیط کشت در ابتدا به هر چاهک اضافه گردید و سپس پلیت در انکوباتور 37°C به مدت $1/5$ ساعت انکوبه شد. در نهایت میزان جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه Elisa reader در طول موج $450\ \text{nm}$ اندازه‌گیری گردید.

داده‌های زنده ماندن سلول از حداقل سه آزمایش در پلیت‌های ۹۶ خانه جداگانه به دست آمد و جهت کار آماری ارائه شد.

استحصال مایع رویی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی (سیکریتا): در ابتدا اجازه داده شد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی در محیط کشت به تراکم رشد حدود 90% - 80% برسند سپس سلول‌ها سه بار با محلول فسفات‌بافر سالین شستشو داده شدند و سپس در مجاورت محیط α -MEM فاقد سرم قرار داده شدند.

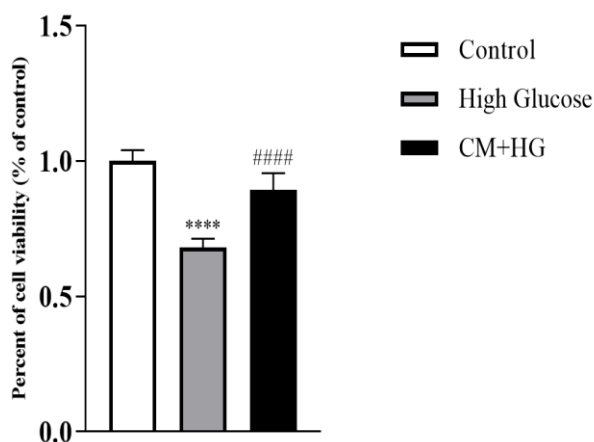
۴۸ ساعت پس از تعویض محیط سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی، محیط رویی آنها برداشت شد و در ابتدا در دور 1500

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام RT-PCR

Anti-sense(5'→3')	Sense(5'→3')	Gene
AGGTTGTAGTCAGCGAAGGAG	TACACCAACTATGAGGCGGG	GSTP1
ACAGTGGAGAACCGAACTGC	TGGCTACTTTGAGGTCACACA	CAT
GCAGTCACATTGCCCAAGTC	GTGAAGGTGTGGGGAAGCAT	SOD1
TGGACGATAGCTTGGAGGGA	CACCATGGATGATGATATCGC	β -actin

غلظت بالای گلوکز بر بیان ژنهای آنتی‌اکسیدان در سلول‌های غضروفی C28I2: واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز با رونوشت معکوس به‌منظور بررسی تغییر نسبی بیان ژنهای CAT، SOD1 و GSTP1 تحت‌تاثیر سیکریتا انجام گرفت. برای این منظور سلول‌های غضروفی C28I2 به مدت ۲۴ ساعت با غلظت ۵۰٪ سیکریتا پیش‌درمانی شدند و سپس گلوکز ۷۵ میلی‌مولار به محیط اضافه گردید.^{۱۹}

نتایج نشان داد که بیان mRNA ژنهای SOD1، CAT و GSTP1 پس از مواجهه با گلوکز ۷۵ میلی‌مولار به‌طور معناداری کمتر از گروه کنترل بود ($P < 0.0001$) (شکل ۲). پیش‌درمانی با سیکریتا توانست به‌طور معناداری بیان ژنهای CAT ($P < 0.0001$) و SOD1 ($P < 0.0001$) و GSTP1 ($P < 0.0001$) را در مقایسه با گروه غلظت بالای گلوکز افزایش دهد.



شکل ۱: بررسی زنده‌مانی سلول‌های غضروفی C28I2 تحت‌تاثیر همزمان سیکریتا و غلظت بالای گلوکز توسط تست WST1، CM سیکریتا جمع‌آوری شده از سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی و HG غلظت بالای گلوکز ۷۵ میلی‌مولار.

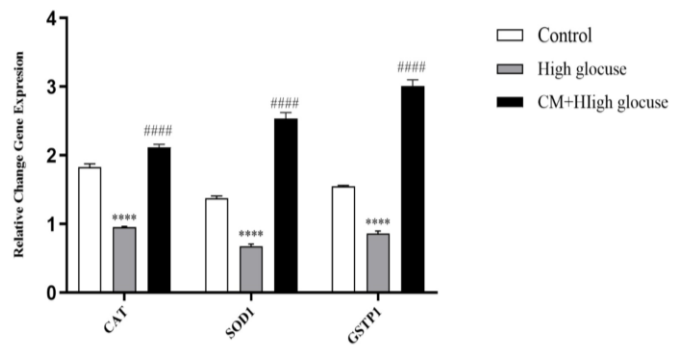
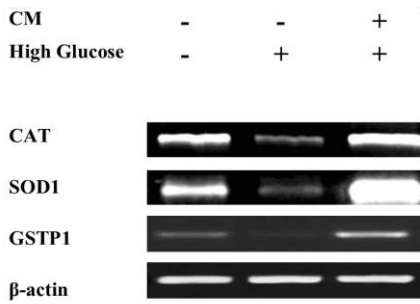
(GSTP1) و 63°C (SOD1 و CAT) و 56°C (β -actin) به مدت یک دقیقه و در ادامه طولیل شدن در دمای 72°C به مدت ۴۰ ثانیه و در نهایت طولیل شدن نهایی در دمای 72°C به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. پس از اتمام کار، محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شد.

اطلاعات با استفاده از GraphPad prism software, version 9, USA مورد بررسی قرار گرفت. تفاوت بین گروه‌های مختلف توسط One-way ANOVA و آزمون TUKEY با در نظر گرفتن $P < 0.05$ به عنوان حد معنادار بودن مورد مقایسه قرار گرفتند.

یافته‌ها

بررسی زنده‌مانی سلول‌های غضروفی C28I2 تحت‌تاثیر همزمان سیکریتا جمع‌آوری شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی و غلظت بالای گلوکز توسط تست WST1: با استفاده از روش WST1، اثر همزمان غلظت بالای گلوکز (۷۵ میلی‌مولار) و سیکریتا با غلظت ۵۰٪ سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی بر میزان زنده ماندن سلول‌های غضروفی C28I2 مورد مطالعه قرار گرفت.

همانطور که در شکل ۱ دیده می‌شود میزان زنده‌مانی در سلول‌های غضروفی C28I2 در غلظت ۷۵ میلی‌مولار نسبت به کنترل کاهش پیدا کرده است ($P < 0.0001$) و میزان زنده‌مانی در سلول‌های غضروفی C28I2 در حضور همزمان سیکریتا و غلظت بالای گلوکز (۷۵ میلی‌مولار) نسبت به غلظت بالای گلوکز افزایش پیدا کرده است ($P < 0.0001$). نتایج حاصل شده از این تست نشان می‌دهد که سیکریتا جمع‌آوری شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی توان زیستی سلول‌های غضروفی C28I2 افزایش می‌دهد. تاثیر همزمان سیکریتا جمع‌آوری شده از سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی و



شکل ۲: بررسی تاثیر غلظت گلوکز ۷۵ میلی‌مولار و سیکریتا بر بیان ژن‌های CAT، SOD1 و GSTP1

سلول‌های غضروفی آسیب‌دیده و به دنبال آن افزایش ROS یکی از فاکتورهای اصلی است که در پیشرفت استئوآرتریت نقش دارند، به‌عنوان مکانیسم اصلی از بین رفتن سلول‌های غضروفی و آسیب بافت در نظر گرفته شده است. آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند ویتامین E، کورکومین یا مواد آنتی‌اکسیدانی مانند دوپامین، ملانین، آلزینات و گلوکزآمین می‌توانند رادیکال‌های آزاد را خنثی کنند و در نتیجه استرس اکسیداتیو را کاهش دهند که معمولاً برای به تاخیر انداختن یا محدود کردن آسیب سلولی و تخریب ماتریکس غضروف در مفاصل استئوآرتریت تزریق می‌شوند که به‌عنوان یک استراتژی موثر و جایگزین در درمان استئوآرتریت بسیار مورد توجه قرار گرفته است.^{۲۱-۲۴}

در پروژه ما مایع رویی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی همانند آنتی‌اکسیدان‌ها سبب افزایش بیان ژن‌های آنزیم‌های CAT، SOD1 و GSTP1 در سلول‌های C28I2 در مواجهه با غلظت بالای گلوکز گردید. مطالعه ما هم راستا با مطالعه Chen و همکارانش بود که اثر محافظتی مایع رویی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی را نشان داده‌اند.

در این مطالعه نشان داده است که مایع رویی مشتق شده از کشت سلول‌های استرومایی مزانشیمی مشتق از بندناف انسان قادر به افزایش زنده ماندن سلول‌های فیروبلست قلبی در برابر آسیب‌های ناشی از تابش است که به دلیل اثرات مثبت به دلیل وجود بسیاری از فاکتورهای رشد، کموکاین‌ها و هورمون‌ها در مایع رویی مشتق شده از سلول‌های بنیادی است.^{۲۵} گزارشات بحث‌برانگیزی درباره فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در مایع سینویال بیماران مبتلا به استئوآرتریت

بحث

در دهه‌های اخیر سلول‌تراپی به‌عنوان یک روش امیدوارکننده و مطلوب جهت بهبود و درمان استئوآرتریت مطرح شده است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی کاربردهای فراوانی در پزشکی ترمیمی دارند و از منابع مختلفی همچون مغز استخوان، چربی، فولیکول مو و خون محیطی به دست می‌آیند. سلول‌های بنیادی مشتق از چربی، به دلیل قدرت تکثیر بالا و سهولت در دسترسی گزینه بسیار مناسبی در کارهای تحقیقاتی هستند. علیرغم تحقیقات گسترده و ارائه روش‌های مختلف درمانی، در بیشتر موارد نتایج بالینی حاصله رضایت‌بخش نمی‌باشد و نگرانی‌هایی درباره استفاده از آنها از جمله واکنش‌های ایمنی و ایجاد سرطان و زنده ماندن کوتاه مدت در محل پیوند مورد توجه است.

در پژوهش حاضر یک استراتژی جدید برای درمان استئوآرتریت با استفاده از سلول‌های بنیادی ارائه شد که اثر محافظتی ماده رویی محیط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی که غنی از محصولات ترشح‌شده آنها است، در برابر آسیب ناشی از غلظت بالای گلوکز در سلول‌های C28I2 بررسی شد. پیش‌تیمار سلول‌های C28I2 با مایع رویی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی اثر منفی غلظت بالای گلوکز را بر زنده ماندن کاهش داد و موجب افزایش بیان ژن‌های CAT، SOD1 و GSTP1 در سلول‌های C28I2 که در معرض غلظت بالای گلوکز گردید و سبب محافظت سلول‌ها از اثرات مضر غلظت بالای گلوکز شد. تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد توسط

SOD و GPx شده است. نتایج تحقیق آنها مشخص نمود که پیش‌درمانی با سیکریتا سبب افزایش زنده‌مانی سلول‌های کبدی و محافظت آنها در برابر اثرات سمی ROS می‌گردد.^{۳۴}

در مجموع، پژوهش فعلی ما نشان داد که پیش‌تیمار غضروف‌های C28I2 با مایع رویی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی می‌تواند اثر مضر غلظت بالای گلوکز را احتمالاً با افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها و در نتیجه کاهش ROS بهبود دهد. یافته‌های این پژوهش نشان داد که مایع رویی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی ممکن است یک محصول درمانی امیدوارکننده در تخریب پیش‌رونده غضروف مفصلی را به‌عنوان عارضه دیابت در نظر بگیرند.

سپاسگزاری: این مقاله بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌آپوپتوتیک Conditioned Media جمع‌آوری‌شده از سلول‌های مزانشیمی بنیادی بافت چربی در صدمات سلولی ناشی از گلوکز بالا در کشت سلول‌های غضروفی C28I2" در مقطع دکتری تخصصی در سال ۱۳۹۶ و با کد ۹۶۱۰۲۴ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی ایران اجرا شده است.

وجود دارد. در مطالعاتی گزارش شده است که فعالیت GPx، CAT، SOD و GST در مایع سینوویال افراد مبتلا به استئوآرتریت افزایش می‌یابد.^{۲۶}

در مقابل مطالعاتی نشان دادند که فعالیت GST و GPx و بیان SOD در مایع سینوویال مبتلایان به استئوآرتریت کاهش یافته است.^{۲۶-۲۸،۲۷} از طرفی گزارشات حاصل از آزمایشات In vitro نشان داده است که استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های خارجی از آسیب سلول‌های غضروفی القا شده توسط استرس اکسیداتیو جلوگیری می‌کند.^{۲۹-۳۲} در پژوهشی دیگر مایع رویی مشتق‌شده از کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی باعث بهبود آسیب عروقی در دیابت از طریق تنظیم سطوح ROS و کاهش آسیب اکسیداتیو از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، از جمله SOD و CAT شده است.^{۳۳}

در سال ۲۰۱۹ مطالعه‌ای نیز بر روی رده سلول‌های کبدی AML12 که در اثر تجمع ROS به‌دنبال استفاده از تیواستامید دچار آسیب شده بودند انجام شد. نتایج آنها نشان داد که پیش‌درمانی این سلول‌ها با سیکریتا سلول‌های بنیادی بافت چربی منجر به کاهش میزان ROS از طریق افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان همچون کاتالاز،

References

- Heidari B. Knee osteoarthritis prevalence, risk factors, pathogenesis and features: Part I. *Caspian journal of internal medicine* 2011;2(2):205.
- Haseeb A, Haqqi TM. Immunopathogenesis of osteoarthritis. *Clinical immunology* 2013;146(3):185-96.
- Rufino ATO. Glucose Sensing and Modulation of Human Chondrocyte Functions by Hyperglycemia: Relevance as Pharmacological Targets for Diabetes-Associated OA: *Universidade de Coimbra (Portugal)* 2014.
- Laiguillon M-C, Courties A, Houard X, Auclair M, Sautet A, Capeau J, et al. Characterization of diabetic osteoarthritic cartilage and role of high glucose environment on chondrocyte activation: toward pathophysiological delineation of diabetes mellitus-related osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2015;23(9):1513-22.
- Zahan O-M, Serban O, Gherman C, Fodor D. The evaluation of oxidative stress in osteoarthritis. *Medicine and Pharmacy Reports* 2020;93(1):12.
- Charlier E, Relic B, Deroyer C, Malaise O, Neuville S, Collée J, et al. Insights on molecular mechanisms of chondrocytes death in osteoarthritis. *International journal of molecular sciences* 2016; 17(12):2146.
- Regan E, Bowler R, Crapo J. Joint fluid antioxidants are decreased in osteoarthritic joints compared to joints with macroscopically intact cartilage and subacute injury. *Osteoarthritis and cartilage* 2008;16(4):515-21.
- Cui J, Li G, Yin J, Li L, Tan Y, Wei H, et al. GSTP1 and cancer: Expression, methylation, polymorphisms and signaling. *International Journal of Oncology* 2020;56(4):867-78.
- Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint bone spine* 2007;74(4):324-9.
- Long L, Soeken K, Ernst E. Herbal medicines for the treatment of osteoarthritis: a systematic review. *Rheumatology* 2001;40(7):779-93.
- Steinmeyer J, Bock F, Stöve J, Jerosch J, Flechtenmacher J. Pharmacological treatment of knee osteoarthritis: Special considerations of the new German guideline. *Orthopedic reviews* 2018; 10(4).
- Mirzamohammadi S, Nematollahi MH, Mehrbani M, Mehrbani M. Ferulic acid pretreatment could improve prognosis of autologous mesenchymal stromal cell transplantation for diabetic neuropathy. *Cytotherapy* 2016;18(7):925-7.
- Tang X, Sheng L, Xie F, Zhang Q. Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into chondrocytes using chondrocyte extract. *Molecular medicine reports* 2012;6(4):745-9.
- Shah K, Zhao AG, Sumer H. New approaches to treat osteoarthritis with mesenchymal stem cells. *Stem Cells International* 2018;2018.
- Lukomska C. Controversies in Human Mesenchymal Stem Cell Therapy. *Stem Cells Int* (2019).
- Kurtz A. Mesenchymal stem cell delivery routes and fate. *International journal of stem cells* 2008;1(1):1-7.
- Driscoll J, Patel T. The mesenchymal stem cell secretome as an acellular regenerative therapy for liver disease. *Journal of gastroenterology* 2019;54(9):763-73.
- Maguire G. Stem cell therapy without the cells. *communicative & integrative Biology* 2013;6(6):e26631.
- Li L, Ngo HT, Hwang E, Wei X, Liu Y, Liu J, et al. Conditioned medium from human adipose-derived mesenchymal stem cell culture prevents UVB-induced skin aging in human keratinocytes

- and dermal fibroblasts. *International journal of molecular sciences* 2019;21(1):49.
20. Safari S, Eidi A, Mehrabani M, Fatemi MJ, Sharifi AM. Conditioned Medium of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells as a Promising Candidate to Protect High Glucose-Induced Injury in Cultured C28I2 Chondrocytes. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 2022;12(3):632.
 21. Chin K-Y, Ima-Nirwana S. The role of vitamin E in preventing and treating osteoarthritis—a review of the current evidence. *Frontiers in pharmacology* 2018;9:946.
 22. Zhang Z, Leong DJ, Xu L, He Z, Wang A, Navati M, et al. Curcumin slows osteoarthritis progression and relieves osteoarthritis-associated pain symptoms in a post-traumatic osteoarthritis mouse model. *Arthritis research & therapy* 2016;18(1):1-12.
 23. Chen Q, Shao X, Ling P, Liu F, Han G, Wang F. Recent advances in polysaccharides for osteoarthritis therapy. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2017;139:926-35.
 24. Zhong G, Yang X, Jiang X, Kumar A, Long H, Xie J, et al. Dopamine-melanin nanoparticles scavenge reactive oxygen and nitrogen species and activate autophagy for osteoarthritis therapy. *Nanoscale* 2019;11(24):11605-16.
 25. Chen Z-Y, Hu Y-Y, Hu X-F, Cheng L-X. The conditioned medium of human mesenchymal stromal cells reduces irradiation-induced damage in cardiac fibroblast cells. *Journal of Radiation Research* 2018;59(5):555-64.
 26. Ostalowska A, Birkner E, Wiecha M, Kasperczyk S, Kasperczyk A, Kapolka D, et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in synovial fluid of patients with primary and secondary osteoarthritis of the knee joint. *Osteoarthritis and cartilage* 2006;14(2):139-45.
 27. Tootsi K, Märtson A, Kals J, Paapstel K, Zilmer M. Metabolic factors and oxidative stress in osteoarthritis: a case-control study. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 2017;77(7):520-6.
 28. Paździor M, Kiełczykowska M, Kurzepa J, Luchowska-Kocot D, Kocot J, Musik I. The oxidative stress in knee osteoarthritis patients. An attempt of evaluation of possible compensatory effects occurring in the disease development. *Medicina* 2019;55(5):150.
 29. Campo GM, Avenoso A, D'Ascola A, Scuruchi M, Nastasi G, Micali A, et al. The SOD mimic MnTM-2-PyP (5+) reduces hyaluronan degradation-induced inflammation in mouse articular chondrocytes stimulated with Fe (II) plus ascorbate. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2013;45(8):1610-9.
 30. Shortt C, Luyt LG, Turley EA, Cowman MK, Kirsch T. A hyaluronan-binding peptide (P15-1) reduces inflammatory and catabolic events in IL-1 β -treated human articular chondrocytes. *Scientific reports* 2020;10(1):1-11.
 31. Liang R, Yang X, Yew PYM, Sugiarto S, Zhu Q, Zhao J, et al. PLA-lignin nanofibers as antioxidant biomaterials for cartilage regeneration and osteoarthritis treatment. *Journal of Nanobiotechnology* 2022;20(1):327.
 32. Tudorachi NB, Totu EE, Fifere A, Ardeleanu V, Mocanu V, Mircea C, et al. The implication of reactive oxygen species and antioxidants in knee osteoarthritis. *Antioxidants* 2021;10(6):985.
 33. Yuan Y, Shi M, Li L, Liu J, Chen B, Chen Y, et al. Mesenchymal stem cell-conditioned media ameliorate diabetic endothelial dysfunction by improving mitochondrial bioenergetics via the Sirt1/AMPK/PGC-1 α pathway. *Clinical Science* 2016;130(23):2181-98.
 34. Hong H-E, Kim O-H, Kwak BJ, Choi HJ, Ahn J, Kim S-J. Antioxidant action of hypoxic conditioned media from adipose-derived stem cells in the hepatic injury of expressing higher reactive oxygen species. *Annals of surgical treatment and research* 2019;97(4):159-67.

Antioxidant effects of adipose derived stem cells conditioned media against high glucose-induced injuries in cultured of C28I2 chondrocytes

Abstract

Received: 13 Mar. 2023 Revised: 18 Mar. 2023 Accepted: 27 Mar. 2023 Available online: 4 Apr. 2023

Sedigheh Safari M.Sc.¹
Akram Eidi Ph.D.¹
Mehrnaz Mehrabani Ph.D.²
Mohammad Javad Fatemi
M.D.³
Ali Mohammad Sharifi
Ph.D.^{4,5*}

1- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- Physiology Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

3- Burn Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

4- Department of Pharmacology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5- Tissue Engineering Group, (NOCERAL), Department of Orthopedics Surgery, Faculty of Medicine, University of Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia., Tehran, Iran.

* Corresponding author: Department of Pharmacology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Tel: +98-21-88622523
E-mail: sharifalim@gmail.com

Background: Osteoarthritis (OA) is the most common form of arthritis characterized by progressive loss of articular cartilage, causing pain and loss of articular function. High glucose is a crucial inflammatory factor playing a pivotal role in the pathogenesis of OA that induces ROS production. Since most of the current therapies for OA are short-term benefits, hence, there is high demand for finding novel therapeutic agents for OA treatment. Recent studies have demonstrated that mesenchymal stem cells secrete important therapeutic factors that protect chondrocytes. In the current study, we investigated the protective potential of Adipose-derived stem cell conditioned medium (CM-ADSC) as an alternative to cell therapy in high glucose-mediated oxidative stress in C28I2 human chondrocytes.

Methods: This experimental study was performed in the Department of Pharmacology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran from May 2018 to August 2020. Adipose-derived stem cells were cultured until they reached 90% confluence then washed with PBS and cultured in a FBS-free medium for 48 hours. The conditioned medium was collected and centrifuged. The protective effect of the concentration of conditioned medium on high glucose (75mM)-induced oxidative stress in C28I2 cell viability was evaluated by WST-1 assay. Total RNA was isolated from the treated and untreated cells with TRIzol reagent. The mRNA expression of antioxidant enzymes including, glutathione S-transferase-P1 (GSTP1), catalase (CAT), and superoxide dismutase1 (SOD1) was evaluated by reverse transcription-polymerase chain reaction in treatment and non-treatment groups.

Results: Adipose-derived stem cell conditioned medium pretreatment remarkably protected C28I2 cells against high glucose. The expression of mRNA of CAT, GSTP1, and SOD1 significantly increased following treatment with the conditioned medium (50%) for 24 hours in high glucose-exposed cells as compared to the control.

Conclusion: Present study indicates that the Adipose-derived stem cell conditioned medium can reduce oxidative stress. It seems that the conditioned medium may protect cartilage in the progression of osteoarthritis.

Keywords: conditioned medium, mesenchymal stem cell, osteoarthritis, oxidative stress.