

بیان ژن‌های کلاژن یک-دو، آگریکان و SOX9 سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز یافته روی داربست‌های مختلف زیستی

چکیده

دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۰۹ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۱۲ آنلاین: ۱۳۹۴/۰۲/۲۰

مهدیه قیائی^۱، رضا طباطبائی قمی^۱
محسن نیکبخت^۲، محسن شیخ‌حسن^{۱*}

۱- گروه سلول بنیادی، آزمایشگاه سلول‌های بنیادی، جهاد دانشگاهی قم، قم، ایران.
۲- گروه بیوتکنولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات هماتولوژی-انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، بیمارستان شریعتی، تهران، ایران.

زمینه و هدف: انتخاب داربست مناسب یکی از عوامل بسیار مهم در یک تکنیک موفق مهندسی بافت است که امکان مهاجرت سلول‌ها، انتقال عوامل زیست فعال و همچنین فراهم‌سازی محیط رشد مطلوب برای سلول‌های بنیادی را ایجاد می‌نماید. در این پژوهش به ارزیابی قابلیت دو داربست مختلف به‌عنوان محیطی مناسب جهت تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی برگرفته از چربی پرداخته شد.

روش بررسی: این مطالعه به‌صورت تجربی در آزمایشگاه سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی استان قم از اردیبهشت تا اسفند ۱۳۹۲ انجام شده است. دو داربست فیبرین‌گلو و آلژینات به‌عنوان دو گروه مجزا تهیه گردید و سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از جداسازی از بافت چربی و تکثیر کافی، به‌صورت جداگانه بر روی این دو داربست قرار گرفته و در محیط کندروژنیک کشت داده شدند. پس از گذشت ۱۴ روز، ارزیابی توانایی بقای سلولی و بیان ژن‌های کلاژن I و II، SOX9 و آگریکان (Aggrecan) در سلول‌های مزانشیمی مشتق از چربی کشت شده بر روی هر داربست به‌صورت مجزا به‌ترتیب توسط روش‌های ۳ (۴ و ۵-دی متیل تیزاول-۲-یل-۲-و ۵-دی متیل تترازولیوم بروماید و Real-time PCR صورت پذیرفت. همچنین تشکیل بافت غضروفی بر روی داربست‌ها توسط آنالیز هیستولوژی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: داربست فیبرین‌گلو تفاوت معناداری را از لحاظ قابلیت بقا نسبت به داربست آلژینات در محیط تمایزی به غضروف نشان داد ($P=0/023$). همچنین نتایج حاصل از آنالیز Real-Time PCR نشان داد که داربست فیبرین‌گلو در مقایسه با داربست آلژینات ژن‌های ویژه غضروفی را در سطح بالاتری بیان می‌نماید.

نتیجه‌گیری: استفاده از داربست طبیعی فیبرین‌گلو می‌تواند به‌عنوان محیط مناسبی به‌منظور تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی برگرفته از چربی در مهندسی بافت غضروفی در نظر گرفته شود.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بافت چربی، فیبرین‌گلو، آلژینات.

* نویسنده مسئول: قم، خیابان بنیاد، میدان ایثار، خیابان شبنم، مرکز فوق تخصصی درمان ناباروری جهاد دانشگاهی قم، آزمایشگاه سلول‌های بنیادی
تلفن: ۰۲۵-۳۲۷۰۰۱۵۲
E-mail: mohsen_sheikhhasan@yahoo.com

مقدمه

ظرفیت تکثیری پایین این سلول‌ها در محیط آزمایشگاهی و عوارضی که در هنگام نمونه‌برداری در مکان دهنده کندروسیت ایجاد می‌شود کمتر از این روش استفاده می‌گردد.^۱ با این حال، هم اکنون کاربرد بالینی سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل از مغز استخوان به‌دلیل آسیب رساندن به محل اهدا و ماهیت تهاجمی بسیار بالای این روش و ایجاد درد زیادی که برای اهداکننده به‌همراه دارد، خود به‌عنوان چالشی برای سلول درمانی محسوب می‌گردد.^۱

در طول دهه‌های گذشته، ظرفیت محدود توانایی خود ترمیمی غضروف، مانعی در برابر بازسازی و درمان آسیب‌های موجود در این بافت محسوب شده است. در سال‌های اخیر، فن‌آوری مهندسی بافت با استفاده از سلول‌ها و سیستم انتقالی مناسب به‌منظور ترمیم نقایص غضروفی در حال توسعه می‌باشد. با اینکه پیوند کندروسیت اتولوگ به‌عنوان یک روش درمانی، مورد تایید می‌باشد، با این حال به‌دلیل

همچنین به‌عنوان یک سیستم انتقال سلول‌های بنیادی جهت درمان نقایص غضروفی شناخته شده و در زمینه‌های پژوهشی مرتبط با مهندسی بافت غضروفی به‌طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته است.^{۵۶}

فیبیرین ترکیب فیزیولوژیکی خون است که بیش از ۲۰ سال در زمینه‌های بالینی کاربرد دارد.^۶ در سال‌های اخیر، فیبیرین به‌دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد خود همچون سازگاری پذیری و تجزیه‌پذیری زیستی و اتولوگ بودن کاربردهای مختلفی را در زمینه مهندسی بافت و طب ترمیمی پیدا کرده است. همچنین سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) فیبیرین‌گلو را تایید نموده است.^{۱۰-۷}

به‌تازگی، زیست‌شناسی مولکولی از روش‌های کمی جهت بررسی توانایی تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی و به‌دست آوردن نتایج قابل اعتماد و قابل مقایسه بهره گرفته است. از جمله این روش‌ها که برای ارزیابی بیان ژن‌های ویژه غضروف مورد استفاده قرار می‌گیرد، روش Real-Time PCR است که از مزایایی همچون حساسیت بالا، طیف وسیع پویایی، دامنه دینامیک گسترده، دقت زیاد و قابلیت اتوماسیون برخوردار می‌باشد.^{۱۱}

در این مطالعه، به ارزیابی توانایی تکثیر، بقا و تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از چربی به رده غضروفی بر روی دو داربست طبیعی فیبیرین‌گلو و آلژینات به‌صورت مجزا پرداخته شد.

روش بررسی

این مطالعه به‌صورت تجربی از نوع آزمایشگاهی (in vitro) بوده و از اردیبهشت تا اسفند ۱۳۹۲ در آزمایشگاه سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی استان قم انجام شده است. در این پژوهش، آلژینات و محیط DMEM جهت کشت سلول از (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) استفاده شد. سرم جنین گوساله و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین (Gibco, Life Technologies, USA) خریداری شد.

در این مطالعه آزمایشگاهی، نمونه بافت چربی از لیپوساکشن بیماران با رضایت آنها دریافت گردید و در سرم فیزیولوژی حاوی آنتی‌بیوتیک از بیمارستان به آزمایشگاه انتقال یافت. در آزمایشگاه نمونه چندین بار با Phosphate-buffered saline (PBS) و سرم فیزیولوژی شسته شده و به قطعات کوچک‌تر تقسیم شد. سپس این

سلول‌های بنیادی مزانشیمی برگرفته از چربی انسانی به‌عنوان جانشین سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل از مغز استخوان با مقبولیت زیادی در زمینه مهندسی بافت غضروف مواجه شده است.^۲ این سلول‌ها می‌توانند توسط روش لیپوساکشن ساده از بافت چربی زیرجلدی با کمترین عوارض و درد ممکن برای فرد اهداکننده حاصل شوند. گزارشات حاکی از آن است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی در خصوصیتایی همچون قابلیت تمایز به چندین رده، کینتیک رشد و پیری با سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل از مغز استخوان قابل قیاس هستند.^۳

همچنین، سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل از بافت چربی از لحاظ مورفولوژی و حتی بیان نشانگرهای سطحی نیز به همان سلول‌های حاصل از مغز استخوان شباهت دارند.^{۱۲} این نکته به‌خوبی شناخته شده است که به‌منظور هدایت فرایند تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل از چربی به رده غضروفی، شرایط کشت سه بعدی مورد نیاز می‌باشد. بدین‌منظور این سلول‌ها بر روی داربست‌ها در محیط آزمایشگاهی کشت داده می‌شوند. داربست‌ها ساختارهای مبتنی بر مواد زیستی هستند که به دو گروه داربست‌های طبیعی و مصنوعی طبقه‌بندی می‌شوند.^۳

در ابتدا این مواد تنها برای انتقال دارو و هورمون به بدن کاربرد داشتند ولی پژوهش‌های بعدی نشان داد که این مواد توانایی ایجاد یک بستر مناسب به‌منظور حفظ، نگهداری و تمایز سلول‌ها به رده‌های مختلف سلولی را نیز دارند. مهندسی بافت غضروف نیازمند طراحی یک داربست با ساختار فیزیکی مناسب و امکان چسبندگی سلول‌ها به آن، مهاجرت، تکثیر و تمایز سلولی و در نهایت رشد و بازسازی بافت جدید است. در مهندسی بافت، ابتدا می‌بایستی یک ماده متخلخل به‌عنوان ماتریکس خارج سلولی یا داربست برای رشد سلول‌ها تهیه گردد. بنابراین داربست‌های هیدروژلی منشا گرفته از مواد زیستی که قابلیت ایجاد شرایط رشد و تمایز مطلوب برای سلول‌ها دارا می‌باشند می‌توانند در ترمیم بافت نرمی همچون غضروف مورد استفاده قرار گیرند.^۴ از میان این مواد زیستی، پلیمرهای طبیعی همچون آلژینات و فیبیرین‌گلو جهت استفاده در زمینه مطالعاتی و بالینی غضروفی تصدیق شده‌اند. آلژینات پلی ساکارید خطی است که دارای بلوک‌های تکراری از مانورونات و گلورونات می‌باشد. آلژینات به‌دلیل دارا بودن ضخامت مناسب و

نمونه‌ها به محلول کلرید کلسیم ۱۰۵ میلی‌مولار اضافه شده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. دانه‌های آلژینات پس از شستشو با کلرید سدیم و DMEM و اضافه کردن محیط کندروژنیک در محیط به مدت ۱۴ روز در دمای ۳۷ °C و ۵٪ CO₂ قرار گرفتند.^{۱۲و}

ارزیابی توانایی زنده ماندن سلول پس از گذشت ۱۴ روز از کشت سلول‌ها بر روی داربست‌ها و در حضور محیط تمایز به غضروف انجام پذیرفت. ۰/۵ ml محیط کشت DMEM و ۵۰ µl محلول MTT (۳٪ و ۵-دی متیل) تiazol-۲-یل-۲-دی-متیل تترازولیم بروماید، mg/ml (۵) به داربست‌ها اضافه شد. پس از چهار ساعت انکوباسیون، ۰/۵ ml دی متیل سولفوکسید به محلول حاصل اضافه شد. پس از گذشت ۲۰ دقیقه در نهایت میزان جذب نوری سلول/ داربست در طول موج ۵۷۰ nm توسط Stat Fax® 3200 Microplate Reader (Awareness Technology, Inc., Palm City, FL, USA) اندازه‌گیری شد.^{۱۴و۱۲}

ابتدا تمامی نمونه‌های RNA پس از گذشت ۱۴ روز از تمایز به غضروف از هر کدام از داربست‌ها به‌طور مجزا استخراج شد. داربست‌ها در داخل نیتروژن مایع تخریب شده و سپس RNA با استفاده از کیت (Bioneer Co., Daedeok-gu, Daejeon, Korea) و بر اساس دستورکار مربوطه استخراج گردید. خلوص و مقدار RNA استخراج شده توسط اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ nm و ۲۶۰ nm استفاده از Spectrophotometer, NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, USA) تعیین گردید. نسخه‌برداری معکوس RNA به cDNA با استفاده از کیت AccPower® RT Premix (Bioneer Co., Korea) و بر اساس دستورکار مربوطه و Real-time PCR با استفاده از کیت SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Austin, TX, USA) و دستگاه Rotor Gene 6000 Real-time PCR Machine (Corbett Life Science, Australia) در شرایط استاندارد PCR انجام پذیرفت. در این روش، به‌منظور نرمال‌سازی داده‌ها از ژن خانه‌داری مرجع "بتا-اکتین" که در سلول‌ها دارای بیان ثابت و بدون تغییر می‌باشد استفاده گردید. پرابرهای اختصاصی ژن مرجع و ژن‌های ویژه غضروف مورد استفاده در این مطالعه توسط Primer Express software, version 3 (Applied Biosystems, Austin, TX, USA) طراحی گردید (جدول ۱). سطح بیان هر کدام از ژن‌های هدف با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه گردید.^{۱۶-۱۹}

قطعات به‌وسیله آنزیم کلاژناز I هضم شده و سلول‌های بنیادی مزانشیمی از آنها جداسازی گردید. به این صورت که ابتدا به ازای هر ۱ g چربی ۱/۵ mg آنزیم کلاژناز I به آن اضافه و به مدت ۴۵ تا ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C انکوبه شد. سپس تحت سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۸۰۰ دور در دقیقه قرار گرفته و پس از پایان سانتریفوژ، محلول رویی آن حذف و رسوب سلولی حاصله در محیط کشت DMEM حاوی آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین و Fetal Bovine Serum (FBS) ۱۰٪ و دمای ۳۷ °C، CO₂ ۵٪ و رطوبت ۹۹٪ قرار داده شد. پس از گذشت یک روز، سلول‌هایی که به کف فلاسک نچسبیده بودند، با تعویض محیط از فلاسک حذف شدند. سلول‌ها هر هفته یک‌بار پاساژ شدند تا به پاساژ سه رسیدند (شکل ۱). محیط کشت سلول‌ها هر سه روز یک‌بار تعویض گردید. سلول‌ها سپس در مرحله پاساژ سه، جهت استفاده آماده گردید.^{۱۲-۱۴}

جهت تهیه محیط کندروژنیک از DMEM-High Glucose به‌همراه انسولین- ترانسفرین- سلنیوم ۱٪، دگزامتازون ۱۰۰ نانومولار، سرم آلبومین گاوی ۱٪، آسکوربات ۲- فسفات ۵۰ µg/l، لینولئیک اسید ۵ µg/l، فاکتور رشد TGF-β3 ۱۰ ng/ml و پنی‌سیلین- استرپتومایسین ۱٪ استفاده شد.^۶

پلاسمای تازه منجمد و فیبرینوژن از سازمان انتقال خون قم تهیه شد. پلاسمای تازه منجمد به نسبت پنج به سه به کلسیم گلوکونات اضافه شده و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با ۲۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. در مرحله بعد پس از سانتریفوژ، محلول رویی آن حذف و ترومبین آن جداسازی گردید. فیبرینوژن و ترومبین حاصله برای استفاده جهت کشت سلول آماده شد. به‌همین منظور، ابتدا سلول‌های بنیادی برگرفته از چربی با غلظت ۱×۱۰^۶ سلول در هر سی‌سی در داخل ترومبین به‌صورت محلول درآمده و فیبرینوژن به آنها اضافه گردید و در نهایت با اضافه کردن محیط کندروژنیک به مدت ۱۴ روز در دمای ۳۷ °C در داخل انکوباتور (۳۷ °C، CO₂ ۵٪ و رطوبت ۹۹٪) قرار گرفت.^{۱۵}

ابتدا پودر آلژینات (۱/۲٪) در ۰/۱۵ مول/لیتر کلرید سدیم به حالت محلول درآمده و محلول حاصله با استفاده از فیلتر استریل شد. سپس سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی پاساژ سه پس از ترپسیینه شدن، به مدت هشت دقیقه در ۱۴۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شده و دوباره در محلول آلژینات به حالت محلول درآمد. در ادامه،

جدول ۱: توالی پرایمرها ژن‌های مورد استفاده در آنالیز Real-Time PCR

نام پرایمر	توالی (۵'→۳')	طول قطعه	دمای ذوب
پرایمر مستقیم (HF548001.1) COL1A1	CTCCTGGAGCATCTGGAGAC	۱۲۸	۵۸/۷۴
پرایمر معکوس (HF548001.1) COL1A1	GTCTCACCACGATCACCCCTT	۱۲۸	۶۰/۲۵
پرایمر مستقیم آگریکان (NM_001135.3) (ACAN)	GAATCAACTGCTGGAGACCA	۱۹۸	۵۷/۵۲
پرایمر معکوس آگریکان (NM_001135.3) (ACAN)	CCACTGGTAGTCTTGGGCAT	۱۹۸	۵۹/۳۸
پرایمر مستقیم (NG_012490.1) Sex Determining Region Y (SRY)-box 9 (SOX9)	AGTACCCGCACTTGCACAAC	۱۰۷۳	۶۱/۱۶
پرایمر معکوس (NG_012490.1) Sex Determining Region Y (SRY)-box 9 (SOX9)	CGTTCTTCACCGACTTCTCTC	۱۰۷۳	۵۸/۳۰
پرایمر مستقیم (X16711.1) COL2A1	CTCCTGGAGCATCTGGAGAC	۱۵۷	۵۹/۲۵
پرایمر معکوس (X16711.1) COL2A1	GTCTCACCACGATCACCCCTT	۱۵۷	۵۹/۳۹
پرایمر مستقیم بتا-کتین (AK316361.1)	GAGACCTTCAACACCCAGCC	۱۶۱	۶۱/۱۶
پرایمر معکوس بتا-کتین (AK316361.1)	AGACGCAGGATGGCATGGG	۱۶۱	۵۸/۳۰

* شماره شناسایی (ID) ژن‌ها در پایگاه نوکلئوتیدی NCBI

یکنواختی با رشد و افزایش در تعداد آنها به دست آمد (شکل ۱). برای شروع فرایند تمایز غضروفی، تعداد 1×10^6 سلول/ میلی‌لیتر در پاساژ سوم بر روی هر کدام از داربست‌ها قرار گرفت و در محیط تمایزی کشت شد. از لحاظ تست MTT، با توجه به آزمون LSD، بین داربست فیبرین‌گلو و کنترل ($P < 0.05$) اختلاف معناداری مشاهده گردید (نمودار ۱).

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به غضروف توسط Real-Time PCR تایید شد. بدین صورت که بیان ژن‌های آگریکان، کلاژن I و II، SOX9 در سلول‌های تمایز یافته پس از ۱۴ روز بررسی گردید (نمودار ۲). بر اساس آنالیز Real-Time PCR و با توجه به آزمون LSD میزان بیان ژنی آگریکان، کلاژن I و II، SOX9 در فیبرین‌گلو با آلژینات و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی (به‌عنوان کنترل) اختلاف معناداری را نشان داد که در جدول ۲ مشخص است.

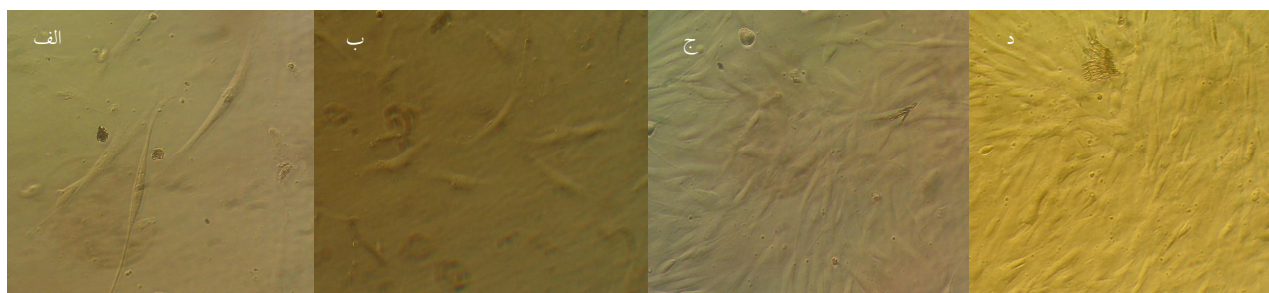
پس از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین/ ائوزین داربست‌های حاوی سلول‌های بنیادی مزانشیمی برگرفته از چربی که در محیط تمایز به غضروف به مدت چهار هفته قرار داشتند وجود و تشکیل کندروسیت‌ها بر روی داربست‌ها تایید شد (شکل ۲). نتیجه رنگ‌آمیزی پس از ۲۸ روز، مشخص کرد که ماتریکس خارج سلولی شامل مواد زمینه‌ای غضروف به رنگ صورتی و سلول‌های کندروسیتی به رنگ بنفش می‌باشد.

سلول‌های کشت شده بر روی داربست‌ها در فرمالدئید بافر شده با فسفات با درصد حجمی/ حجمی ۱۰٪ تثبیت شدند. سپس نمونه رقت‌ها در درجه‌های رقت ۰.۵٪، ۰.۷٪، ۰.۹۵٪ و ۱.۰۰٪ اتانول آبگیری شده و در داخل پارافین غوطه‌ور شدند و سپس به قطعات با ضخامت $4 \mu\text{m}$ بریده شدند. سرانجام، قطعات جهت ارزیابی مورفولوژی با رنگ‌های هماتوکسیلین/ ائوزین رنگ‌آمیزی شدند.

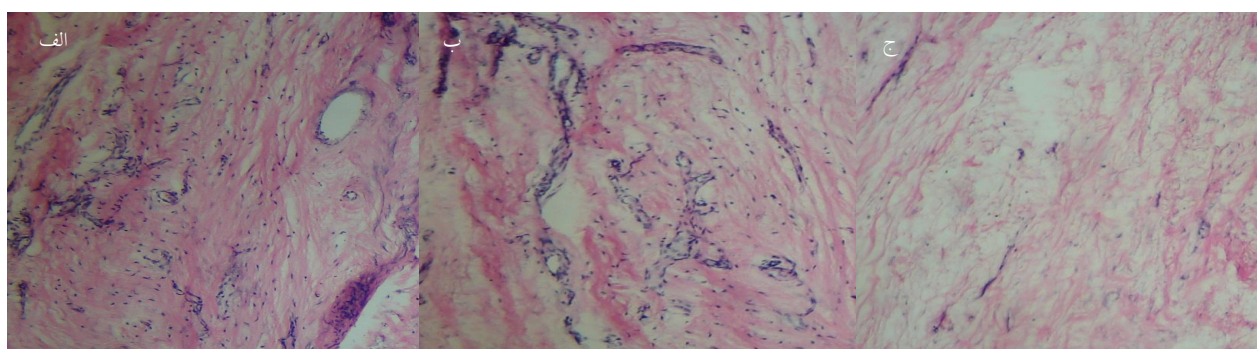
با استفاده از آنالیز واریانس ANOVA و تست LSD، کوچک‌ترین تفاوت معنادار بودن در سطح بیان چهار ژن بین دو داربست مشخص گردید. آنالیز آماری با استفاده از SPSS software (version 17 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) انجام پذیرفت و سطح معناداری با ارزش $P < 0.05$ مشخص گردید.

یافته‌ها

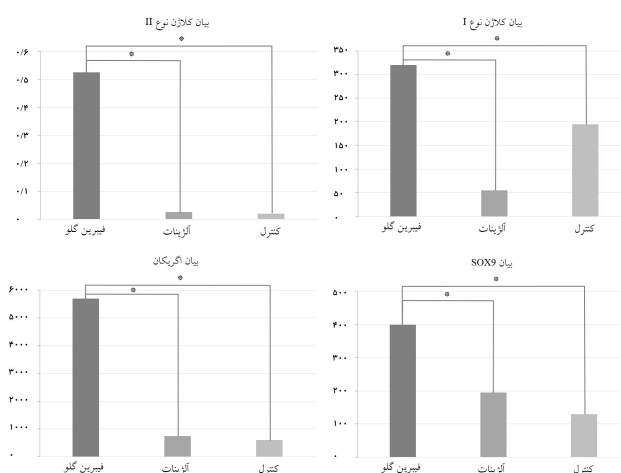
در کشت اولیه، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی با ظاهری شبیه به فیبروبلاست یا دوکی شکل با هسته‌های مشخص رشد کردند که توسط میکروسکوپ فاز متضاد مشاهده گردید (شکل ۱). با افزایش پاساژ، جمعیت همگن‌تری از سلول‌های دوکی شکل با هسته‌های مشخص که مورفولوژی تیبیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد مشاهده گردید به طوری که در پاساژ سوم، سلول‌های



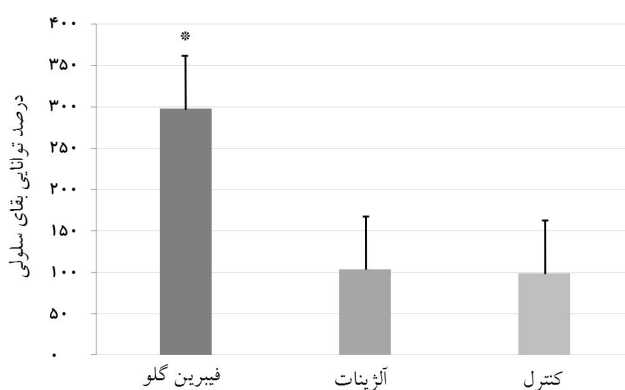
شکل ۱: مراحل مختلف تکثیر و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی برگرفته از چربی انسان (الف - د)



شکل ۲: ارزیابی هیستولوژی بافت غضروفی: الف: کنترل، ب: سلول‌های تمایز یافته بر روی داربست فیبرین گلو، ج: آلژینات



نمودار ۲: بیان SOX9 mRNA، آگریکان، کلاژن I و II در سلول‌های تمایز یافته بر روی داربست‌های فیبرین گلو و آلژینات
* اختلاف معنادار با گروه کنترل (P<۰/۰۰۵)



نمودار ۱: ارزیابی MTT سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی تمایز یافته به غضروف بر روی داربست‌های فیبرین گلو و آلژینات
* اختلاف معنادار با گروه کنترل (P<۰/۰۰۵)

از آنها به منظور اهداف سلول درمانی ضایعات این بافت استفاده نمود.^{۱۲} گروه‌های متعددی نشان دادند که سلول‌های بنیادی مشتق از چربی قابلیت تمایز به رده غضروفی را در شرایط آزمایشگاهی دارند که مطالعه ما نیز گواهی بر این ادعاست.^{۲۱}

نتایج حاصل از مطالعات نشان داد که فرایند تمایز سلول‌های بنیادی به غضروف در چهار مرحله متوالی صورت می‌پذیرد که در هر مرحله چندین ژن مخصوص غضروف بیان می‌شوند که از جمله مهمترین ژن‌های بیان شده در مرحله اول کلاژن نوع I و VI، SOX4 و BMP2 می‌باشند.^{۲۰} همچنین ژن‌های COMP، HAPLN1، کلاژن XI و SOX9 در مرحله دوم این فرایند بیان می‌گردند. مهمترین ژن‌های بیان شده در مرحله سوم عبارتند از کندروادهین و N- کادهین می‌باشند و در آخرین مرحله ژن‌هایی همچون اگریکان، آلکالین فسفاتاز، کلاژن نوع II، IX و X، فیبرومودولین و فیبرونکتین بیان می‌شوند.

در این فرایند، ابتدا سلول‌های بنیادی مزانشیمی، توسط فاکتورهای پاراکرینی که بیان فاکتورهای رونویسی اصلی را افزایش می‌دهند متعهد به غضروف‌سازی می‌شوند که این فرایند باعث فعال شدن ژن‌های مخصوص غضروف در آنها می‌گردد. در مرحله دوم، سلول‌های بنیادی مزانشیمی متعهد شده در قالب گره‌های متراکمی فشرده شده و به کندروسیت‌ها تمایز می‌یابند. در طی مرحله سوم، کندروسیت‌ها به سرعت تکثیر شده و محتوای سیتوپلاسمی خود را افزایش می‌دهند و مقدار زیادی از ماتریکس خارج سلولی ویژه غضروف را ترشح می‌نمایند. پس از این مرحله، بیان پروفایل سلول‌ها تغییر کرده و کلاژن نوع X و فیبرونکتین ترشح می‌گردند. تمایز پیش‌سازهای غضروفی توسط تجزیه ماتریکس غضروفی حاوی کلاژن IX و X و XI و اگریکان تعیین خصوصیت می‌گردد.^{۲۲، ۲۳}

SOX9 یکی از مارکرهایی است که در سلول‌های قرار گرفته در مرحله تراکم بیان می‌گردد.^{۲۳}

این فاکتور رونویسی یکی از قدرتمندترین کاندید تنظیم غضروف به‌شمار می‌رود که به‌عنوان یک تنظیم‌کننده کلیدی فرایند تمایز به کندروسیت‌ها و تشکیل غضروف محسوب می‌گردد که می‌تواند بلوغ هیپرتروفی را در مراحل خاصی از تمایز غضروفی به تاخیر بیاندازد.^{۲۳} این فاکتور جهت بیان ژن کلاژن نوع II و دیگر پروتئین‌های ماتریکس ویژه غضروفی مورد نیاز می‌باشد. دو عضو

جدول ۲: مقایسه میزان بیان ژن‌های مخصوص غضروف

فاکتور	P
بیان کلاژن I بین گروه کنترل و فیبرین گلو	۰/۰۲۸
بیان کلاژن I بین گروه آلژینات و فیبرین گلو	۰/۰۰۳
بیان کلاژن II بین گروه کنترل و فیبرین گلو	۰/۰۰۱
بیان کلاژن II بین گروه آلژینات و فیبرین گلو	۰/۰۰۳
بیان کلاژن اگریکان بین گروه کنترل و فیبرین گلو	۰/۰۳۳
بیان کلاژن اگریکان بین گروه آلژینات و فیبرین گلو	۰/۰۲۴
بیان کلاژن SOX9 بین گروه کنترل و فیبرین گلو	۰/۰۳۷
بیان کلاژن SOX9 بین گروه آلژینات و فیبرین گلو	۰/۰۲۹

بحث

در مطالعه حاضر، میزان بیان ژن‌های اختصاصی غضروف، شامل کلاژن نوع I و II، اگریکان و SOX9 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز یافته به غضروف بر روی دو داربست طبیعی آلژینات و فیبرین گلو به صورت جداگانه توسط روش Real-Time PCR مورد بررسی قرار گرفت تا تغییرات بیان آنها بر روی هر یک از داربست‌ها مشخص گردد. همچنین، ارزیابی میزان تکثیر و قابلیت بقای سلول‌های تمایز یافته بر روی این دو داربست به صورت جداگانه توسط تست MTT انجام پذیرفت تا قابلیت این داربست‌ها در ایجاد محیطی مناسب جهت رشد و بقای این سلول‌ها مشخص گردد.

با تعیین بیان ژنی در دو داربست فیبرین گلو و آلژینات می‌توان تغییرات مورفولوژی سلول‌های تمایز یافته را در دو داربست با بیان ژن‌های اختصاصی غضروفی ارتباط داد. به طور معمول در استراتژی‌های سلول درمانی به تعداد زیادی سلول جهت ایجاد پیوند نیاز می‌باشد اما با توجه به خصوصیات نامطلوب سلول‌های غضروفی از لحاظ تعداد اندک سلول و قابلیت رگ‌زایی بسیار ضعیف آنها، امکان استفاده از این سلول‌ها در زمینه سلول درمانی با محدودیت مواجه شده است.^{۱۲}

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی، یکی از جایگزین‌های مناسب برای سلول‌های کندروسیتی به‌شمار می‌رود که در زمینه تحقیقات مهندسی بافت غضروفی مورد استقبال گسترده‌ای قرار گرفته و با تکثیر و تمایز این سلول‌ها به بافت غضروفی می‌توان

نوع XI) در سلول‌های بنیادی مشتق از چربی انسانی در محیط تک لایه در هفته دوم و سوم پس از کشت کاهش می‌یابد.^{۲۵} بنابراین، کشت متوالی سلول‌ها در محیط القای غضروف‌سازی به‌روش تک لایه نمی‌تواند باعث تحریک بیشتر تولید ماتریکس خارج سلولی جهت افزایش اندازه تجمعات سلولی گردد.^{۲۵}

این نتایج پیشنهاد می‌کند که محیط کشت سه بعدی در القای تمایز به غضروف در سلول‌های بنیادی و بیان ژن‌های مخصوص غضروف می‌تواند موثر باشد.^{۲۵} نتایج حاصل از مطالعه Mehlhorn و همکاران تایید نمود که در مدت سه روز اول ژن‌ها بیان نمی‌شود بلکه ژن Col2a1 (کلاژن نوع II) در پایان ۱۴ روز بیش تنظیمی نشان می‌دهد.^{۲۶} در طول مدت ۱۴ روز، ژن‌ها یا پروتئین‌های غضروفی از جمله COMP، اگریکان و کلاژن نوع II-A در سلول‌ها بیان شدند.^{۲۶} همچنین افزایش معناداری در میزان بیان COMP و اگریکان در این مطالعه مشاهده گردید.^{۲۶} اما بیش تنظیمی ژن Col2a1 (کلاژن نوع II) در روز چهاردهم تنها در صورت وجود TGF- β صورت پذیرفت.^{۲۶} مطالعه Garza-Veloz و همکاران نیز نشان داد که تغییرات معناداری در بیان ژن‌های خاص غضروفی از جمله SOX9، ACAN و COMP در طول فرایند غضروف‌سازی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی رخ می‌دهد.^{۲۷}

بر اساس نتایج حاصل از مطالعات مشخص گردیده است که غضروف‌سازی توسط در معرض قرارگرفتن سلول‌ها با فاکتورهای القاکننده غضروفی همچون فاکتورهای رشد در بازه زمانی خاص تنظیم می‌گردد.^{۲۶} بسیاری از مطالعات تاثیر فاکتورهای گروه TGF- β را در غضروف‌سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی تایید نمودند. با تکیه بر نتایج حاصل از این مطالعات به‌نظر می‌رسد که یکی از عوامل مهم تاثیرگذار در بیان شدن ژن‌های ویژه غضروفی و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی در این مطالعه، فاکتور رشدی TGF- β باشد.^{۲۸، ۲۹}

همچنین مطالعات نشان داد که TGF- β 3 به‌صورت معناداری می‌تواند تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی را افزایش دهد.^{۳۱-۳۲} این فاکتور می‌تواند ترکیبی از اثرات مهار و القایی را بر روی تمایز غضروف‌سازی داشته باشد.^{۳۳} مطالعه Mehlhorn و همکاران نشان دادند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی در محیط حاوی TGF- β 3 توانایی تمایز به غضروف را نشان می‌دهد که مطالعات ما

دیگر خانواده SOX یعنی SOX5-L و SOX6 نه تنها در اوایل مرحله تراکم مزانشیمی بیان می‌گردند بلکه به‌صورت همزمان با SOX9 در طول تمایز غضروفی نیز بیان می‌شوند.^{۳۲، ۳۳} ورکاسین و اگریکان دو عضو خانواده پروتئوگلیکان‌های تجمع‌یافته بزرگ هستند که دارای الگوهای ساختاری مشترک بوده و با فعالیت مشترکی به‌صورت قدرتمند به هیالورونان اتصال می‌یابد. اگریکان به‌صورت فراوان در طول گسترش و نمو غضروف بیان شده و در مقدار بالا در سراسر دوره کودکی در انواع مختلف غضروف حفظ می‌شود.^{۳۳} مرحله اول تمایز به غضروف در شش روز اول آن انجام می‌پذیرد.^{۳۲} زمانی که برهمکنش ایجاد شده بین سلول‌ها و محیط باعث ایجاد تحریک می‌گردد، سلول‌های مزانشیمی مجاور شروع به بیان فاکتور رونویسی SOX9 می‌نمایند که باعث کنترل ژن‌هایی می‌شود که در غضروف‌سازی دخیل هستند.^{۳۳}

در نتیجه، فعال شدن این ژن‌ها باعث تولید ماتریکس خارج سلولی غضروفی می‌شوند. سلول‌های مزانشیمی تحت تاثیر تنظیم با فاکتورهای رونویسی SOX9 به‌تدریج به کندروبلاست‌ها تمایز می‌یابند.^{۳۳} سپس کندروبلاست‌ها بالغ شده و در فرایندهای مورفوژنتیکی شرکت می‌کنند که شروع به تشکیل یک قالب به‌هم پیوسته در کنارهای هر مفصل می‌نماید.^{۳۳} تراکم سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌واسطه ژن SOX9 صورت می‌پذیرد که اولین مرحله در غضروف‌سازی می‌باشد.^{۲۴} بر اساس داده‌های گفته‌شده پژوهش‌های زیادی در زمینه میزان تغییرات بیان ژن‌های مختلف طی تمایز به غضروف سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط سه بعدی صورت پذیرفته است. نتایج حاصل از مطالعه Hamid و همکاران نشان داد که سلول‌های بنیادی مشتق از چربی انسان به‌طور معنادار مقدار زیادی از کلاژن نوع II، اگریکان، COMP، الاستین و کلاژن نوع XI را یک هفته پس از تحریک در محیط تمایز به غضروف بیان می‌نمایند.^{۲۵}

همچنین نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که کشت متوالی در محیط القای غضروف‌سازی، افزایش بیان SOX9 را در سلول‌های بنیادی مشتق از چربی در مقایسه با کنترل در پی دارد و بیان آن را به بالاترین سطح خود در هفته سوم پس از کشت می‌رساند که می‌تواند باعث تحریک شروع تولید ماتریکس غضروفی شود که مطالعه ما نیز این نتایج را تایید نمود.^{۲۵} مطالعاتی نیز نشان دادند که بیان بسیاری از ژن‌های غضروفی (کلاژن نوع II، COMP، اگریکان، الاستین و کلاژن

زیرجمعیت‌های سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی انسان، ژن‌های SOX9 و کلاژن II را بیان می‌نمایند.^{۳۵} در این مطالعه، با توجه به اینکه پس از گذشت سه هفته از کشت سلول‌های جداسازی‌شده، SOX9 توسط این سلول‌ها بیان شد،^{۳۵}

نویسندگان این پژوهش پیشنهاد کردند که سلول‌ها به احتمال زیاد در مرحله بین پیش کندروسیتی و سلول‌های غضروفی ستونی قرار دارند. بررسی‌های تحقیق حاضر نشان داد که سلول‌های تمایز یافته بر روی داربست‌ها، تمام ژن‌های اختصاصی غضروف شامل آگریکان و کلاژن II و SOX9 را بیان می‌کنند که با توجه به پژوهش‌های پیشین نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر روی داربست‌ها به غضروف تمایز یافته‌اند. همچنین، با استفاده از آنالیز هیستولوژیک تشکیل بافت کندروسیتی تایید گردید. با توجه به بیان شدن ژن‌های کلاژن II، SOX9 و آگریکان و با در نظر گرفتن روند فرایند غضروفی و نتایج هیستولوژی می‌توان گفت که تمایز سلول‌های مزانشیمی مشتق از چربی در این پژوهش در مراحل پایانی غضروف‌سازی قرار دارد.

نتایج نشان داد که انتخاب داربست‌های سلولی در رشد و تمایز سلول‌های بنیادی بالغ تاثیرگذارند. هیدروژل‌های طبیعی همچون فیبرین ویژگی‌های متمایزی دارند که به آنها این امکان را می‌دهد که بستر مناسبی را برای رشد و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ایجاد نمایند و به‌عنوان یک عامل کلیدی در مهندسی بافت غضروفی مورد استفاده قرار گیرند.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل (بخشی از) طرح تحقیقاتی مصوب جهاد دانشگاهی قم با عنوان "بررسی پایداری کندروسیت‌های حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیما مشتق از بافت چربی در چهار داربست طبیعی و سنتتیک" است که در طی سال‌های ۱۳۹۱ تا ۱۳۹۳ در آزمایشگاه سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی قم اجرا شده است.

نیز این موضوع را به اثبات رسانید.^{۳۶} بر اساس مطالعات دیگر، تمایز به غضروف سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌تواند توسط اعضای سوپر خانواده فاکتور رشد انتقالی بتا (TGF- β) تحریک گردد.^{۳۴} چرخه تمایزی و فعالیت بیوستتزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی توسط محیط بیوفیزیکی آنها تنظیم می‌گردد.^{۳۴} محیط کشت حاوی فاکتورهای رشد خانواده TGF- β در طول تکثیر می‌تواند باعث بیان افزایش یافته ژن کلاژن II گردد.^{۳۴}

در مطالعه‌ای، Rada و همکاران نشان دادند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان به‌وسیله تحریک با فاکتورهای رشد خانواده TGF- β و با بیش تنظیمی SOX9، Col2a1 و آگریکان به سمت غضروف‌سازی تمایز داده می‌شوند.^{۳۵} نتایج حاصل از این پژوهش، نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی، قابلیت تکثیر و بقا و تمایز به سلول‌های کندروسیت مانند را در محیط آزمایشگاهی و در صورت وجود فاکتورهای ویژه (فاکتور رشد TGF- β 3 و دگزامتازون) داشته و این قابلیت در محیط مناسبی همچون فیبرین‌گلو و آلژینات به‌عنوان داربست باعث افزایش تکثیر و بقا و بیان ژن‌های ویژه غضروفی از جمله کلاژن II و آگریکان می‌گردد. با وجود اینکه ژن‌های مخصوص غضروف کلاژن نوع I و II، آگریکان و SOX9 در سلول‌های تمایز یافته بر روی هر دو داربست به‌صورت جداگانه بیان گردید اما میزان بیان این ژن‌ها بر روی داربست فیبرین‌گلو به‌صورت معناداری نسبت به میزان بیان این ژن‌ها بر روی داربست آلژیناتی و کنترل افزایش نشان داد.

در پژوهش حاضر، ماهیت غضروفی سلول‌های تمایز یافته بر روی داربست‌ها به‌صورت جداگانه با روش‌های مولکولی و هیستولوژیک بررسی شد و به دلایل زیر ماهیت غضروفی سلول‌های تمایز یافته تایید گردید: Rada و همکاران نشان دادند که تمامی

References

- Ahmed TA, Hincke MT. Strategies for articular cartilage lesion repair and functional restoration. *Tissue Eng Part B Rev* 2010;16(3):305-29.
- Jo CH, Lee YG, Shin WH, Kim H, Chai JW, Jeong EC, et al. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial. *Stem Cells* 2014;32(5):1254-66.
- Guilak F, Lott KE, Awad HA, Cao Q, Hicok KC, Fermor B, et al. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *J Cell Physiol* 2006;206(1):229-37.
- Park JS, Yang HN, Woo DG, Jeon SY, Park KH. Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells in fibrin constructs evaluated in vitro and in nude mouse and rabbit defects models. *Biomaterials* 2011;32(6):1495-507.

5. Ning C. Fabrication of alginate hydrogel scaffolds and cell viability in calcium-crosslinked alginate hydrogel. [MS thesis]. Canada: Saskatoon, SK: University of Saskatchewan; 2011.
6. Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, Gimble JM, Guilak F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials* 2004;25(16):3211-22.
7. Ahmed TA, Dare EV, Hincke M. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev* 2008;14(2):199-215.
8. Ahmed TA, Griffith M, Hincke M. Characterization and inhibition of fibrin hydrogel-degrading enzymes during development of tissue engineering scaffolds. *Tissue Eng* 2007;13(7):1469-77.
9. Ahmed TA, Halpenny M, Atkins H, Giulivi A, Dervin G, Griffith M, et al. Stabilization of fibrin mesenchymal stem cells (MSCs) constructs under hypoxic conditions during tissue engineering of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br* 2010;92-B:2-3.
10. Park JS, Shim MS, Shim SH, Yang HN, Jeon SY, Woo DG, et al. Chondrogenic potential of stem cells derived from amniotic fluid, adipose tissue, or bone marrow encapsulated in fibrin gels containing TGF- β 3. *Biomaterials* 2011;32(32):8139-49.
11. Bernstein P, Sticht C, Jacobi A, Liebers C, Manthey S, Stiehler M. Expression pattern differences between osteoarthritic chondrocytes and mesenchymal stem cells during chondrogenic differentiation. *Osteoarthritis Cartilage* 2010;18(12):1596-607.
12. Ghiasi M, Tabatabaei Qomi R, Kalhor N, Fazaeli H, Mehdizadeh M, Sheykh Hasan M. The design of scaffolds for use in tissue engineering. *SMU Med J* 2014;1(2):261-73. [Persian]
13. Sheykhhasan M, Tabatabaei Qomi R, Kalhor N, Ghiasi M. Isolation and maintenance of canine adipose-derived mesenchymal stem cells in order to tissue engineering application. *Int J Adv Biol Sci Engin (IJABSE)* 2014;1(2):86-97.
14. Sheykh Hasan M, Kalhor N, Tabatabaei Qomi R, Ghiasi M. Optimization method for isolation and culture of chondrocytes in human nasal cartilage tissue. *Int J Adv Biol Sci Engin (IJABSE)* 2014;1(1):74-85.
15. Ahmed TA, Giulivi A, Griffith M, Hincke M. Fibrin glues in combination with mesenchymal stem cells to develop a tissue-engineered cartilage substitute. *Tissue Eng Part A* 2011;17(3-4):323-35.
16. Yang HN, Park JS, Woo DG, Jeon SY, Do HJ, Lim HY, et al. Chondrogenesis of mesenchymal stem cells and dedifferentiated chondrocytes by transfection with SOX Trio genes. *Biomaterials* 2011;32(30):7695-704.
17. Mobasheri A, Kalamegam G, Musumeci G, Batt ME. Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions. *Matuiritas* 2014;78(3):188-98.
18. Tigli RS, Cannizaro C, Gumusderelioglu M, Kaplan DL. Chondrogenesis in perfusion bioreactors using porous silk scaffolds and hESC-derived MSCs. *J Biomed Mater Res A* 2011;96(1):21-8.
19. Proulx MK, Carey SP, Ditroia LM, Jones CM, Fakharzadeh M, Guyette JP, et al. Fibrin microthreads support mesenchymal stem cell growth while maintaining differentiation potential. *J Biomed Mater Res A* 2011;96(2):301-12.
20. Crowley C, Birchall M, Seifalian AM. Trachea transplantation: from laboratory to patient. *J Tissue Eng Regen Med* 2015;9(4):357-67.
21. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 2006;24(4):150-4.
22. Diekman BO, Rowland CR, Lennon DP, Caplan AI, Guilak F. Chondrogenesis of adult stem cells from adipose tissue and bone marrow: induction by growth factors and cartilage-derived matrix. *Tissue Eng Part A* 2010;16(2):523-33.
23. Venkatesan JK, Ekici M, Madry H, Schmitt G, Kohn D, Cucchiaroni M. SOX9 gene transfer via safe, stable, replication-defective recombinant adeno-associated virus vectors as a novel, powerful tool to enhance the chondrogenic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2012;3(3):22.
24. Shen Y, Fu Y, Wang J, Li G, Zhang X, Xu Y, et al. Biomaterial and mesenchymal stem cell for articular cartilage reconstruction. *Curr Stem Cell Res Ther* 2014;9(3):254-67.
25. Hamid AA, Idrus RBH, Saim AB, Sathappan S, Chua K-H. Characterization of human adipose-derived stem cells and expression of chondrogenic genes during induction of cartilage differentiation. *Clinics* 2012;67(2):99-106.
26. Mehlhorn AT, Niemeyer P, Kaiser S, Finkenzeller G, Stark GB, Sudkamp NP, et al. Differential expression pattern of extracellular matrix molecules during chondrogenesis of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Tissue Eng* 2006;12(10):2853-62.
27. Garza-Veloz I, Romero-Diaz VJ, Martinez-Fierro ML, Marino-Martinez IA, Gonzalez-Rodriguez M, Martinez-Rodriguez HG, et al. Analyses of chondrogenic induction of adipose mesenchymal stem cells by combined co-stimulation mediated by adenoviral gene transfer. *Arthritis Res Ther* 2013;15(4):R80.
28. Clarke LE, McConnell JC, Sherratt MJ, Derby B, Richardson SM, Hoyland JA. Growth differentiation factor 6 and transforming growth factor-beta differentially mediate mesenchymal stem cell differentiation, composition, and micromechanical properties of nucleus pulposus constructs. *Arthritis Res Ther* 2014;16(2):R67.
29. Banks JM, Mozdzen LC, Harley BA, Bailey RC. The combined effects of matrix stiffness and growth factor immobilization on the bioactivity and differentiation capabilities of adipose-derived stem cells. *Biomaterials* 2014;35(32):8951-9.
30. Barsby T, Bavin EP, Guest DJ. Three-dimensional culture and transforming growth factor beta3 synergistically promote tenogenic differentiation of equine embryo-derived stem cells. *Tissue Eng Part A* 2014;20(19-20):2604-13.
31. Toh WS, Foldager CB, Pei M, Hui JH. Advances in mesenchymal stem cell-based strategies for cartilage repair and regeneration. *Stem Cell Rev* 2014;10(5):686-96.
32. Ahmed N, Dreier R, Gopferich A, Grifka J, Grassel S. Soluble signalling factors derived from differentiated cartilage tissue affect chondrogenic differentiation of rat adult marrow stromal cells. *Cell Physiol Biochem* 2007;20(5):665-78.
33. James AW, Xu Y, Lee JK, Wang R, Longaker MT. Differential Effects of transforming growth factor-beta1 and -beta3 on chondrogenesis in posterofrontal cranial suture-derived mesenchymal cells in vitro. *Plast Reconstr Surg* 2009;123(1):31-43.
34. Thorpe SD, Buckley CT, Kelly DJ. Can dynamic compression in the absence of growth factors induce chondrogenic differentiation of bone marrow derived MSCs encapsulated in agarose hydrogels? 8th International Conference on Cell and Stem Cell Engineering (ICCE): IFMBE Proceedings, 2011;30:43-6.
35. Rada T, Reis RL, Gomes ME. Distinct stem cells subpopulations isolated from human adipose tissue exhibit different chondrogenic and osteogenic differentiation potential. *Stem Cell Rev* 2011;7(1):64-76.

Expression of collagen type I and II, aggrecan and SOX9 genes in mesenchymal stem cells on different bioscaffolds

Mahdieh Ghiasi M.Sc.¹
 Reza Tabatabaei Qomi M.Sc.¹
 Mohsen Nikbakht Ph.D.²
 Mohsen Sheykhasan M.Sc.^{1*}

1- Department of Stem Cell, Laboratory of Stem Cell, The Academic Center for Education, Culture and Research, Qom, Iran.

2- Department of Hematology-Oncology and Stem Cell Transplantation Research Center, Tehran University of Medical sciences, Shariati Hospital, Tehran, Iran.

* Corresponding author: Shabnam St., Isar Sq., Imam Khomeini Town (Bon-yad), Qom, Iran.
 Tel: +98-25-32700152
 E-mail: mohsen_sheikhhasan@yahoo.com

Abstract

Received: 30 Nov. 2014 Accepted: 03 Mar. 2015 Available online: 10 May 2015

Background: Stem cells represent an ideal cell source for application in tissue engineering and regenerative medicine due to their ability to proliferate and differentiate to a wide variety of cell lineages. With recent development of medical sciences and tissue engineering, usage of adipose-derived mesenchymal stem cells, their culture and differentiation on suitable scaffolds are considered as a successful clinical and research strategy. One of the most crucial factors in a successful tissue engineering technique is to choose an appropriate scaffold which allow cell migration transferring of bioactive factors as well as providing optimal growth environment for stem cells. In this study, the ability of two scaffolds is investigated as a suitable environment for the proliferation and differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells.

Methods: This is an in vitro study that was performed in Laboratory of Stem Cell in Academic Center for Education, Culture and Research, Qom province from April 2013 to February 2014. In this study, two scaffolds including fibrin glue and alginate were prepared as two separate groups and after isolating mesenchymal stem cells from adipose tissue and adequate proliferation, they were seeded into each scaffold in chondrogenic medium. After 14 days, the evaluation of viability and gene expression of collagen II and I, SOX9 and aggrecan were done by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide) assay and real-time PCR technique respectively. Also, cartilaginous tissue formation on scaffolds was evaluated by histological analysis.

Results: According to the obtained results, the fibrin glue scaffold showed significant difference in terms of viability in comparison to alginate scaffold in chondrocyte differentiating medium ($P < 0.05$). Also the results of real-time PCR analysis showed that the fibrin glue scaffold express cartilage specific genes at a higher level than alginate scaffold.

Conclusion: The use of natural fibrin glue scaffold can be considered as a suitable environment for proliferation and differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells in cartilage tissue engineering.

Keywords: adipose tissue, alginate, fibrin tissue adhesive, mesenchymal stem cells.