Jundishapur
Scientific Medical Journal

June, July 2022. Volume 21. Number 2

Research Paper

Comparison of Chondrogenesis Induction by TGF-β3, Kartogenin and Avocado/soybean Unsaponifiables Between Laboratory and Animal Models

Batool Hashemibeni[1], Mohammad Ali Izadi[1], Ali Valiani[1], Ebrahim Esfandiari[1], Hamid Bahramian[1], *Majid Pourentezari[2, 3]

1. Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
2. Department of Biology and Anatomical Sciences, School of Basic Sciences, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.
3. Yazd Neuroendocrine Research Center, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Hashemibeni B, Izadi MA, Valiani A, Esfandiari E, Bahramian H, Pourentezari M. [Comparison of chondrogenesis induction by TGF-β3, Kartogenin and avocado/soybean unsaponifiables between laboratory and animal models (Persian)]. Jundishapur Scientific Medical Journal. 2022; 21(2):264-277. https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.2.2296

https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.2.2296

ABSTRACT

Background and Objectives Cartilage tissue engineering, by using stem cells, scaffolding and appropriate growth factors, seek to produce natural cartilage tissue to replace damaged tissue and solve the problems that exist in the treatment of cartilage damage. This study aims to compare chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells under the influence of the transforming growth factor beta 3 (TGF-β3), Kartogenin, and avocado/soybean unsaponifiables (ASU) on the fibrin scaffold in the laboratory and animal models.

Subjects and Methods In this experimental laboratory study, after extraction of stem cells from human adipose tissue, induction of chondrogenic differentiation was done for 14 days on the fibrin scaffold in laboratory. The cells differentiated in the fibrin scaffold were transplanted subcutaneously under the skin of male rats for two weeks. Then, comparison of histological and immunohistochemical studies was performed in both laboratory and animal models.

Results A significant increase in the density of Toluidine blue dye accumulation was observed in TGF-β3, Kartogenin and ASU groups in the animal model compared to the laboratory model. Immunohistochemical results for the collagen type X accumulation in the TGF-β3 group showed a significant increase in the animal model compared to the laboratory model. In the Kartogenin and ASU groups, the accumulation of collagen type X showed a significant decrease in the animal model compared to the laboratory model.

Conclusion The implantation of differentiated cartilage cells in laboratory before subcutaneous transfer to the skin can help mature and complete the characteristics of the constructed cartilage.

Keywords TGF-β3, Kartogenin, Avocado/soybean, Adipose-derived stem cells, Fibrin, Chondrogenesis

Received: 13 Nov 2020
Accepted: 26 Apr 2021
Available Online: 01 Jun 2022

*** Corresponding Author***
Majid Pourentezari
Address: Department of Biology and Anatomical Sciences, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd. Iran.
Tel: +98 (913) 1565651
E-Mail: m.pourentezari@gmail.com

Jundishapur
Scientific Medical Journal

Extended Abstract

Introduction

Articular cartilage is a highly specialized connective tissue with no blood vessels, lymphatics and nerves. It is morphologically characterized by a small number of chondrocytes that are responsible for the production, organization and protection of the extracellular matrix. This tissue has minimal compensatory potential for innate healing and repair. It is degenerated with aging, severe weight bearing, trauma and joint disorders such as osteoarthritis. In tissue engineering, the use of biological and engineering principles has led to the development of functional methods for replacement of damaged tissues. The tissue engineering has been able to provide a lot of services in regenerative medicine and regeneration of human body tissues with the progress in the application of material engineering, stem cell extraction, cell signaling, and transforming growth factors (TGFs). The TGF family belongs to the family of biologically active chemicals that are very useful in cartilage tissue engineering. TGF-β3 causes the production of extracellular matrix in cartilage and leads to an increase in the synthesis of sulfated glycosaminoglycans. Despite the positive effects of this growth factor on the differentiation of stem cells, several studies have shown that it can also increase the expression of collagen gene type X in the chondrogenesis process.

The small small-molecule compound Kartogenin has recently been proposed as an induction factor in cartilage tissue engineering, which increases the expression of genes involved in chondrogenesis, such as SOX9, type II collagen, and aggrecan. natural products can be safer than prescribed medications and have less side effects. For this reason, there is great interest in the application of herbal medicine for treatment of diseases. The avocado/soybean unsaponifiables (ASU) consists of one-third avocado and two-third soybean. The main components of ASU are phytosterols β-sitosterol, campesterol and stigmasterol, which are quickly absorbed into the cells. ASU is a complex combination of various fat-soluble vitamins, sterols, tritetrapene alcohol, and furan fatty acids. Moreover, it has a positive effect on osteoarthritis and inhibits cartilage fracture and stimulates the production of collagen and Aggrecan by inhibiting a number of molecules and pathways involved in osteoarthritis. In this study, we used Kartogenin, ASU, and TGF-β3 for chondrogenic differentiation. The goal is to find a suitable compound with good chondrogenic differentiation, reasonable price, and no harmful side effects such as hypertrophy and reduced viability of stem cells.

Methods

This is an experimental laboratory study. After extracting stem cells from human adipose tissue, chondrogenic differentiation was induced for 14 days on fibrin scaffold in the laboratory. The cells transferred to the fibrin scaffold were classified into four groups: (a) Control group (cells affected by chondrogenic differentiation medium without growth factors), (b) TGF-β3 group (cells affected by the chondrogenic medium containing TGF-β3 at a dose of 10 ng/mL), (c) Kartogenin group (cells affected by the chondrogenic differentiation medium containing Kartogenin at a dose of 100 nmol), and (d) ASU group (cells affected by the chondrogenic differentiation medium containing ASU at a dose of 10 µg/mL). To investigate the changes of fibrin scaffolds and differentiated cells in an animal model, after separating stem cells from adipose and then cell culture up to passage 2, fibrin scaffolds and stem cells were differentiated for 14 days by using chondrogenic medium containing the above mentioned factors. After the fourteenth day, scaffolds containing cells were transplanted under the skin of male rats. At the end of the experiments, after anesthetizing the animals, sampling was done. For histological study of different groups, fibrin scaffolds and cells were put in 10% formalin solution. After 24 hours, the fixed samples were placed in the tissue processor and, after passing through the stages of dehydration and clarification, were molded in paraffin. Then, a 5-micron sections of the blocks were prepared and stained for histology, histochemistry and immunohistochemistry studies. Toluidine blue staining and Safranin-O staining were used for histological examination, and immunohistochemical technique was used to prove the presence of type 2 and 10 collagen proteins in the tested samples.

Results

Comparison of toluidine blue dye accumulation density showed the increased accumulation of proteoglycan in all groups in the extracellular matrix of animal model compared to laboratory conditions. This increase was significant for the TGF-β3, Kartogenin, and ASU groups ($P<0.05$), but was not significant for the control group. Comparison of the density of safranin-O dye accumulation showed an increase in all groups in the animal model compared to the laboratory model, but this increase was significant only in the ASU group ($P<0.05$).

Regarding the immunohistochemical results of collagen type 2 and 10, the accumulation of diaminobenzidine (DAB) color in the groups which indicates the accumulation of collagen type 2 in the extracellular matrix, was found in all groups, but it was not significant in any groups. The accumulation of DAB color in the groups which indicates the accumulation of collagen type X in the extracellular matrix, was found in all groups. In the TGF-β3 group, the amount of collagen type X accumulation in the animal model increased significantly compared to laboratory model. However, in the Kartogenin and ASU groups, collagen type X accumulation in the animal model significantly decreased compared to laboratory model.

Discussion

Compared to the expensive growth factor TGF-β3, Kartogenin and ASU are able to induce chondrogenicity in adipose-derived stem cells, where the effect of Kartogenin in 14 days seems to be higher compared to ASU. On the other hand, the inhibitory effect on the expression of genes involved in ASU hypertrophy is greater than that in Kartogenin and TGF-β3. The results of animal models indicates that the implantation of differentiated cartilage cells in the laboratory environment before transferring to the lesion site can help to mature and complete the features of the constructed cartilage.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study has been approved by the code of ethics IR.MUI.REC.1395.3.176 in Shahid Sadougi University of Medical Sciences, Yazd.

Funding

The article is taken from the doctoral thesis of Mohammad Ali Izadi - Department of Anatomical Sciences - Isfahan University of Medical Sciences and was funded by this university.

Authors' contributions

Conceptualization: Betul Hashemi and Ali Valiani; Methodology: Betul Hashemi, Hamid Bahramian and Ebrahim Esfandiari; Written by: Majid Pouratzari, Mohammad Ali Izadi and Betul Hashemi; Editing and finalization of the writing: Mojbod Pouratari, Betoul Hashemi, Hamid Bahramian and Ebrahim Esfandiari; Visualization: Betul Hashemi and Majid Pouratari; Sources and funding: Mohammad Ali Izadi.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

مجله علمی پزشکی
جندی شاپور
خرداد و تیر ۱۴۰۱. دوره ۲۱. شماره ۲

مقاله پژوهشی

مقایسه القای کندروژنز بین دو مدل آزمایشگاهی و حیوانی با استفاده از فاکتور رشد تغییردهنده بتا ۳ کارتوژنین و آووکادو/سویا

بتول هاشمی بنی[۱]، محمدعلی ایزدی[۱]، علی والیانی[۱]، ابراهیم اسفندیاری[۱]، حمید بهرامیان[۱]، *مجید پورانتظاری[۲،۳]

۱. گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
۲. گروه بیولوژی و علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.
۳. مرکز تحقیقات نوروآندوکرین یزد، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.

Use your device to scan and read the article online

Citation Hashemibeni B, Izadi MA, Valiani A, Esfandiari E, Bahramian H, Pourentezari M. [Comparison of chondrogenesis induction by TGF-β3, Kartogenin and avocado/soybean unsaponifiables between laboratory and animal models (Persian)]. Jundishapur Scientific Medical Journal. 2022; 21(2):264-277. https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.2.2296

https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.2.2296

چکیده

زمینه و هدف مهندسی بافت غضروف، با استفاده از سلول‌های بنیادی، داربست و فاکتورهای رشد مناسب درصدد تولید بافت غضروف طبیعی است تا بتواند جایگزین بافت غضروف آسیب‌دیده شود و مشکلاتی را که در مسیر درمان آسیب‌های غضروفی وجود دارد، برطرف کند. هدف از این تحقیق، مقایسه شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی انسانی تحت تأثیر فاکتورهای رشد تغییردهنده بتا ۳، کارتوژنین و آووکادو/سویا، بر داربست فیبرین است.

روش بررسی در این مطالعه آزمایشگاهی‌تجربی، پس از استخراج سلول‌های بنیادی از بافت چربی انسانی، القای تمایز کندروژنیک به مدت ۱۴ روز بر روی داربست فیبرین در محیط آزمایشگاهی انجام شد و سلول‌های تمایزیافته در داربست فیبرین، به‌صورت زیرجلدی در موش صحرایی نر به مدت ۲ هفته پیوند شدند. مقایسه بررسی‌های هیستولوژی و ایمونوهیستوشیمی در ۲ مدل آزمایشگاهی و حیوانی انجام شد.

یافته افزایش معناداری در دانسیته تجمع رنگ تولوئیدین بلو در گروه‌های فاکتور رشد تغییردهنده بتا ۳، کارتوژنین و آووکادو/سویا در مدل حیوانی نسبت به مدل آزمایشگاهی مشاهده شد. در ارتباط با نتایج ایمونوهیستوشیمی کلاژن نوع ۱۰، در گروه فاکتور رشد تغییردهنده بتا ۳ میزان تجمع این نوع کلاژن در مدل حیوانی نسبت به شرایط آزمایشگاهی افزایش معناداری داشته است، اما در گروه کارتوژنین و گروه آووکادو/سویا، تجمع کلاژن نوع ۱۰ در مدل حیوانی نسبت به شرایط آزمایشگاهی، کاهش معناداری نشان داده است.

نتیجه‌گیری نتایج نشان داده است کاشت سلول‌های غضروفی تمایزیافته در محیط آزمایشگاه، قبل از انتقال به زیر پوست رت می‌تواند به بلوغ و کامل‌تر شدن ویژگی‌های غضروف ساخته‌شده کمک کند.

کلیدواژه‌ها فاکتور رشد تغییردهنده بتا ۳، کارتوژنین، آووکادو/سویا، سلول‌های بنیادی مشتق از چربی، فیبرین، کندروژنز

تاریخ دریافت: ۲۳ آبان ۱۳۹۹
تاریخ پذیرش: ۰۶ اردیبهشت ۱۴۰۰
تاریخ انتشار: ۱۱ خرداد ۱۴۰۱

* **نویسنده مسئول:**
مجید پورانتظاری
نشانی: یزد، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، دانشکده پزشکی، گروه بیولوژی و علوم تشریحی.
تلفن: ۱۵۶۵۶۵۱ (۹۱۳) ۹۸+
رایانامه: m.pourentezari@gmail.com

مقدمه

غضروف مفصلی، بافت هم‌بند بسیار اختصاصی‌شده فاقد عروق خونی، لنفی و اعصاب است که ازنظر مورفولوژیکی با تعداد اندک کندروسیت‌هایی که مسئول تولید، سازماندهی و حفاظت از ماتریکس خارج سلولی‌اند، توصیف می‌شود. این بافت، دارای حداقل پتانسیل جبرانی برای بهبود و ترمیم ذاتی است و با افزایش سن، تحمل شدید وزن، تروما و اختلالات مفصلی مانند استئوآرتریت دچار دژنراسیون می‌شود [۱]. در مهندسی بافت، استفاده از اصول زیست‌شناسی و مهندسی، به توسعه جایگزینی روشی کاربردی برای بافت‌های آسیب‌دیده منجر شده است. این رشته نسبتاً جدید، تا حد زیادی با پیشرفت درکاربرد مهندسی مواد، استخراج سلول‌های بنیادی، پیام‌رسانی سلولی و فاکتورهای رشد، توانسته خدمات زیادی درزمینه پزشکی ترمیمی و بازسازی بافت‌های بدن انسان انجام دهد. مهندسی بافت، به‌عنوان یک روش مؤثر برای درمان بیماری‌های انسانی محسوب می‌شود که تقریباً در تولید همه بافت‌های انسانی به درجات مختلف ورود داشته است [۲].

سلول‌های بنیادی مشتق از چربی، به راحتی از چربی زیر پوست به دست می‌آیند و توان تمایز به سلول‌های چربی، استخوان و غضروف را دارند. از مزایای به‌کارگیری این سلول‌ها نسبت به سلول‌های بنیادی دیگر، می‌توان به پیوند اتوگرافت بدون ریسک رد پیوند، عدم انتقال بیماری‌های واگیردار، فقدان منع قانونی در استفاده از این سلول‌ها و عدم نیاز به نگهداری طولانی مدت در بانک‌های سلولی همراه با صرف هزینه‌های فراوان اشاره کرد. همچنین سهل‌الوصول بودن و تکثیر بیشتر آن‌ها در محیط کشت نسبت به سلول‌های بنیادی مغز استخوان، از مزایای دیگر آن به شمار می‌رود [۳].

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی، باید توسط انواع مختلف عوامل القائی درونی و بیرونی القا شود که در این فرایند، عوامل رشد بیشترین تأثیر را دارند. این عوامل، پلی‌پپتیدهای فعال بیولوژیکی تولیدشده توسط بدن هستند که می‌توانند تحریک، تکثیر و تمایز سلول به غضروف هیالین را تنظیم کنند و ابزار نویدبخشی برای مهندسی بافت و پزشکی احیاکننده به شمار روند. علاوه‌بر عوامل فوق، امروزه استفاده از داروهایی با مولکول‌های کوچک و عصاره گیاهان مختلف در مهندسی بافت غضروفی، کاربرد وسیعی دارد که علاوه‌بر ارزان و دردسترس بودن، فاقد عوارض مخرب فاکتورهای رشد فعلی هستند [۴].

خانواده بزرگ فاکتور رشد تغییردهنده بتا متعلق به خانواده مواد شیمیایی فعال بیولوژیک هستند که درزمینه مهندسی بافت غضروف بسیار کاربرد دارد [۵]. اخیراً بیش از ۲۰ عضو با ۳ گیرنده نوع۲ و ۳ گیرنده نوع ۱ در سلول‌ها برای این ترکیبات شناخته شده است که در مهره‌داران بیان می‌شوند. آن‌ها نقش مهمی در تکثیر، آپوپتوز و تمایز سلولی دارند. علاوه‌براین، آن‌ها در تنظیم چرخه سلولی و سیستم ایمنی درگیر هستند [۶].

تحقیقات نشان می‌دهد فاکتور رشد تغییردهنده بتا ۳،[1] باعث تولید ماتریکس خارج سلولی در غضروف شده، همچنین به افزایش سنتز گلیکوزامینوگلیکان‌های سولفاته منجر می‌شود. علی‌رغم تأثیرات مثبتی که این فاکتور رشد بر تمایز سلول‌های بنیادی دارد، مطالعات بسیاری نشان داده است می‌تواند در روند کندروژنز، بیان ژن کلاژن نوع X را نیز افزایش دهد [۷].

امروزه داروی کوچک مولکول کارتوژنین به‌عنوان فاکتوری القائی در مهندسی بافت غضروفی مطرح شده است که به تحقیقات گسترده‌تری نیاز دارد. جانسون و همکاران در سال ۲۰۱۲ اثبات کردند کارتوژنین با اتصال به عامل فاکتور متصل شونده به هسته بتا باعث آزاد شدن این عامل از فیلامین نوع a و اتصال آن به فاکتور RUNX1 و درنهایت بیان ژن‌های دخیل در کندروژنز مثل SOX9 ، کلاژن نوع ۲ و اگریکان در سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی می‌شود [۸].

ترکیب آووکادو/سویا از یک‌سوم آووکادو و دوسوم سویا تشکیل شده است. اجزای اصلی آووکادو/سویا فیتوسترول‌های کامپسترول[2]، سیستوسترول بتا[3] و استیگماسترول[4] هستند که به سرعت در سلول‌ها وارد می‌شوند. آووکادو/سویا ترکیب پیچیده‌ای از انواع ویتامین‌های محلول در چربی، استرول، تری‌تراپن الکل و اسیدهای چرب فوران است [۹]. مطالعات پیشین در آزمایشگاه و مدل حیوانی نشان می‌دهد آووکادو/سویا بر استئوآرتریت اثر مثبتی دارد و باعث مهار شکستگی غضروف می‌شود و از طریق مهار تعدادی از مولکول‌ها و مسیرهای دخیل در استئوآرتریت باعث تحریک تولید کلاژن و اگریکان می‌شود [۱۰].

در این مطالعه از کارتوژنین، آووکادو/سویا وفاکتور رشد تغییردهنده بتا ۳ برای تمایز کندروژنیک استفاده شده است. هدف از استفاده از این ترکیبات، یافتن ترکیبی مناسب با قابلیت تمایز کندروژنیک خوب، قیمت مناسب و نداشتن اثرات جانبی مضر مثل ایجاد هایپرتروفی و کاهش زیستایی سلول‌های بنیادی بوده است.

روش بررسی

تهیه بافت چربی، جداسازی و کشت اولیه سلول‌های بنیادی

برای جداسازی سلول بنیادی از بافت چربی، پس از دریافت رضایت‌نامه از ۳ بیمار با محدوده سنی ۳۱ تا ۳۷ سال داوطلب جراحی ابدومینوپلاستی، نمونه بافت چربی زیرجلدی به مقدار ۲۰ تا ۳۰ گرم تهیه شد و تحت شرایط استریل در لوله فالکون حاوی نرمال سالین به آزمایشگاه کشت سلولی گروه علوم تشریحی

1. TGF-β3
2. Campesterol
3. β-sitosterol
4. Stigmasterol

انتقال یافت. سپس این نمونه چربی، تحت شرایط استریل در زیر هود لامینار کلاس ۲، ۳ مرتبه با محلول فسفات بافر سالین استریل شست‌وشو داده شد و تا حد امکان بافت‌های هم‌بندی و عروق خونی از بافت چربی جدا شد. آنزیم کلاژناز ۱ نوع A به میزان ۱ میلی‌گرم به ازای هر گرم به بافت افزوده شد. سپس نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه شدند. پس از اطمینان از تجزیه کامل بافت، به‌منظور خنثی‌سازی آنزیم، حجم آنزیم به‌کار رفته، محیط کشت نیز اضافه شد.

در ادامه با سانتریفیوژ کردن سوسپانسیون حاصل (۱۴۰۰ درور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه)، مایع رویی همراه با سلول‌های چربی تخلیه شد و رسوب سلولی به‌دست آمده به فلاسک حاوی محیط کشت افزوده شد. در پایان، فلاسک T۷۵ حاوی سلول و محیط کشت به انکوباتورکشت سلول با شرایط استاندارد (۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد دی اکسید کربن و رطوبت نسبی) منتقل شد. با تعویض مدیوم بعد از ۲۴ ساعت سلول‌های اضافی تخلیه و هر ۳ روز محتوای مدیوم فلاسک به‌صورت کامل تعویض شد. بدین ترتیب، کشت اولیه سلول‌های جداشده آغاز شد. پس از ۵ تا ۷ روز، سلول‌ها تکثیر یافتند و سطح فلاسک را اشغال کردند [۱۱].

پاساژ و تکثیر سلول‌های بنیادی

پس از تکثیر سلول‌ها در کشت اولیه و اشغال حداقل ۸۰ درصد کف فلاسک، به‌منظور پاساژ سلولی ابتدا محتوای محیط کشت فلاسک T۷۵ تخلیه و سلول‌ها ۲ بار با ۲ میلی‌لیتر فسفات بافر سالین استریل شست‌وشو شدند. ۳ میلی‌لیتر محلول تریپسین ۲۵ درصد آماده مصرف به فلاسک اضافه شد و به مدت ۳ دقیقه در دمای ۳۷ درجه در انکوباتور قرار گرفت و پس از مشاهده شناور شدن سلول‌ها، برای توقف فعالیت آنزیم، هم حجم آنزیم به‌کار رفته محیط کشت به فلاسک اضافه شد و محتوای داخل فلاسک بین سه فلاسک T۷۵ تقسیم شد. سپس به هر فلاسک ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت افزوده شد. فلاسک‌ها در انکوباتور کشت سلول با شرایط استاندارد نگهداری شدند [۱۲].

تهیه ترومبین

پلاسمای تازه‌منجمد، از بانک خون استان اصفهان تهیه و پس از ذوب شدن، کیسه با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی شد. ۱۵ میلی‌لیتر از محتویات داخل کیسه با رعایت شرایط استریل به‌وسیله ست تزریق خون و در زیر هود لامینار به فالکون ۵۰ میلی‌لیتری منتقل شد. سپس ۱ ویال ۱۰ میلی‌لیتری آمپول گلوکونات کلسیم به فالکون اضافه و سوسپانسیون حاصل برای مدت ۱۰۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. پس از سانتریفیوژ ترکیب حاصل (۲۴۰۰ دور در دقیقه)، محتوای شفاف بخش فوقانی هر لوله را که حاوی ترومبین است، تخلیه و با الیکوت کردن در مقادیر ۱ میلی‌لیتری، در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [۱۳].

تهیه فیبرینوژن

کیسه cryocipitate از بانک خون استان اصفهان تهیه و پس از ذوب شدن سطح خارجی کیسه با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی شد و محتویات درون آن تحت شرایط استریل و در زیر هود با استفاده از سرنگ ۱۰ سی‌سی به فالکون‌های ۱۵ میلی‌لیتری انتقال یافتند و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [۱۳].

گروه‌های آزمایش

سلول‌های انتقال‌یافته به داربست فیبرین در ۴ گروه به‌ترتیب زیر دسته‌بندی شدند:

۱. گروه کنترل، سلول‌ها در این گروه تحت‌تأثیر مدیوم کندروژنیک فاقد فاکتورهای رشد قرار می‌گیرند.

۲. گروه فاکتور رشد تغییردهنده بتا ۳، سلول‌ها در این گروه تحت‌تأثیر مدیوم کندروژنیک دارای فاکتور رشد تغییردهنده بتا۳ به میزان ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر قرار می‌گیرند [۱۱].

۳. گروه کارتوژنین، سلول‌ها در این گروه تحت‌تأثیر مدیوم کندروژنیک دارای کارتوژنین به میزان ۱۰۰ نانومول قرار می‌گیرند [۱۴].

۴. گروه آووکادو/سویا، سلول‌ها در این گروه، تحت‌تأثیر مدیوم کندروژنیک دارای آووکادو/سویا به میزان ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار می‌گیرند [۱۳].

روش کاشت داربست زیر پوست موش صحرایی

به منظور بررسی تغییرات داربست فیبرین و سلول‌های تمایزیافته در مدل حیوانی، پس از جدا کردن سلول‌های بنیادی از چربی و کشت سلولی تا مرحله پاساژ ۲، داربست‌های فیبرین و سلول‌های بنیادی به‌مدت ۱۴ روز تحت تمایز با مدیوم کندروژنیک حاوی فاکتورهای یادشده قرار گرفتند. پس از ۱۴ روز داربست‌های حاوی سلول به زیر پوست موش‌های صحرایی نر انتقال یافتند. برای این هدف، تعداد ۲۰ سر موش صحرایی نر بالغ با وزن حدود ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم از مرکز تحقیقات ترابی‌نژاد اصفهان خریداری و به‌مدت یک هفته در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. سپس حیوانات به ۴ گروه ۵ تایی تقسیم شدند که عبارت‌اند از:

۱. داربست و سلول در مدیوم کندروژنیک به‌عنوان گروه کنترل.

۲. داربست و سلول تمایز یافته با مدیوم حاوی فاکتور رشد تغییردهنده بتا ۳ با دوز ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر.

۳. داربست و سلول تمایزیافته با مدیوم حاوی کارتوژنین با دوز ۱۰۰ نانو مول.

۴. داربست و سلول تمایزیافته با مدیوم حاوی ۱۰ میکروگرم آووکادو/سویا.

پس از بیهوش کردن حیوان توسط هالوتان ناحیه پشت موش بین دو کتف حیوان تراشیده و با الکل ۷۰ درصد و بتادین ۱۰۰ درصد ضدعفونی انجام شد. سپس برش کوچکی در ناحیه ذکرشده داده شد و دو داربست به زیر پوست هر حیوان انتقال یافت و محل برش بخیه با اسپری کلرامفنیکل ضدعفونی شد. هر حیوان یک دُز آنتی‌بیوتیک عضلانی (آمپی‌سیلین ۱۰ میلی‌گرم به ازای هرکیلو) دریافت کرد. به‌منظور کاهش تأثیر سیستم ایمنی حیوان روی داربست‌ها داروی سیکلوسپورین (۵ میلی‌گرم به ازای هرکیلو) به‌صورت داخل صفاقی به حیوان از روز قبل از جراحی و تا پایان مدت آزمایش یعنی ۱۴ روز تزریق شد [۱۵]. در پایان دوره آزمایش یعنی ۱۴ روز، پس از بیهوش کردن حیوانات نمونه‌برداری انجام شد و داربست‌ها در فرمالین ۱۰ درصد برای انجام آزمایش‌های بعدی فیکس شدند.[۱۶، ۱۷].

رنگ‌آمیزی‌های هیستولوژی و هیستوشیمی

برای بررسی هیستولوژی گروه‌های مختلف بعد از روز ۱۴ داربست‌های فیبرینی به همراه سلول در محلول فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد و بعد از ۲۴ ساعت نمونه‌های فیکس‌شده در دستگاه تیشو پروسسور قرار گرفت و پس از گذر از مراحل دهیدراتاسیون و شفاف‌سازی نمونه‌ها در پارافین قالب‌گیری شدند. برش‌های ۵ میکرونی از بلوک‌ها تهیه و برای بررسی هیستولوژی، هیستوشیمی و ایمونوهیستوشیمی برای رنگ‌آمیزی آماده شدند.

رنگ‌آمیزی تولوئیدین آبی[5]

به منظور تعیین غلظت ماده بین‌سلولی، از رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو استفاده شد. پس از دپارافینه کردن، عبور از گزیلل و الکل، لام‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در محلول آبی تولوئیدین بلو در ۱ درصد قرار گرفتند و پس از شست‌وشو و خشک شدن مونته شدند [۱۸].

رنگ‌آمیزی سافرانین O

به منظور تعیین و اثبات وجود گلیکوزآمینوگلیکان در ماتریکس بین سلولی از رنگ‌آمیزی سافرانین O استفاده شد. ابتدا پس از دپارافینه کردن و عبور لام‌ها از گزیلل و الکل، هسته سلول‌ها توسط هماتوکسیلین وایگرت به‌مدت ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. برای رنگ‌آمیزی اقتراقی از رنگ فاست گرین ۰/۰۵ درصد به‌مدت ۵ دقیقه و برای رنگ‌آمیزی محتوای گلیکوزآمینوگلیکان لام‌ها در محلول سافرانین O، ۱ درصد برای ۵ دقیقه قرار گرفتند. در بین مراحل رنگ‌آمیزی لام‌ها با آب جاری شست‌وشو شدند. پس از آب‌گیری و شفاف‌سازی لام‌ها مونته شدند [۱۸].

تکنیک ایمونوهیستوشیمی

به‌منظور اثبات وجود پروتئین‌های کلاژن نوع ۲ و ۱۰ در نمونه‌های موردآزمایش از تکنیک ایمونوهیستوشیمی استفاده شد. برای این هدف، پس از دپارافینه کردن لام‌ها برای مرحله آنتی‌ژن رتریوال از محلول تریس EDTA با pH ۹ استفاده شد و لام‌ها ۱۵ دقیقه در محلول آنتی‌ژن رتریوال در دمای جوش قرار گرفتند و سپس ۱۵ دقیقه نیز در دمای اتاق محلول آنتی‌ژن رتریوال سرد شد. ضمناً قبل از این مرحله، لام‌ها در محلول هیالورونیداز ۱ درصد به‌مدت ۲ ساعت قرار گرفتند. پس از این مراحل، پروکسیداز درون‌زاد توسط محلول پراکسید هیدروژن در متانول به نسبت ۱به ۹ مهار و پس از شست‌وشو در محلول TBS آنتی‌بادی‌های اولیه آنتی‌کلاژن نوع ۲ و ۱۰ و از نوع موشی علیه نوع انسانی با رقت ۱/۵۰ به‌مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه یخچال روی لام‌ها انکوبه شد. پس از شست‌وشو آنتی‌بادی ثانویه علیه نوع موشی گنزوگه با 1HRP به‌مدت ۲ ساعت انکوبه شد. سپس از محلول دی آمینو بنزیدین برای رنگ‌آمیزی استفاده شد. هسته‌ها توسط رنگ هماتوکسیلسن رنگ‌آمیزی و پس از آب‌گیری و شفاف‌سازی نمونه‌ها مونته شدند [۱۹].

روش نیمه کمی کردن رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی

برای نیمه کمی کردن میزان رنگ زمینه در رنگ‌آمیزی‌های سافرانین O، تولوئیدین بلو و رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی پس از تهیه برش‌های ۵ میکرونی و رنگ‌آمیزی با رنگ‌های اختصاصی از لام‌ها در شرایط یکسان عکس‌برداری انجام شد و توسط نرم‌افزار Image J نسخه ۲،۶،۱ به‌صورت نیمه کمی و با روش بررسی آستانه حداقلی و حداکثری رنگ زمینه، میزان تجمع رنگ در ماتریکس بین سلولی اندازه‌گیری شد [۲۰]. این مطالعه در دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، با دریافت کد اخلاق تصویب شده است.

تحلیل آماری

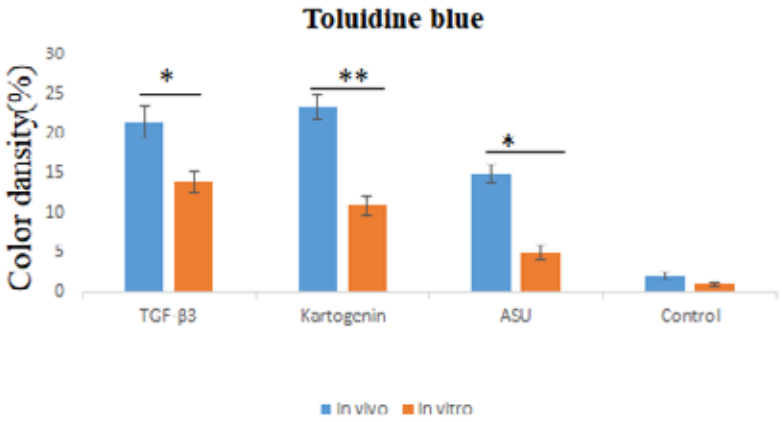
داده‌ها با نرم‌افزار SPSS و روش تحلیل واریانس یک‌طرفه، از نظر معنادار بودن بررسی شد و $P<0/05$ به‌عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو

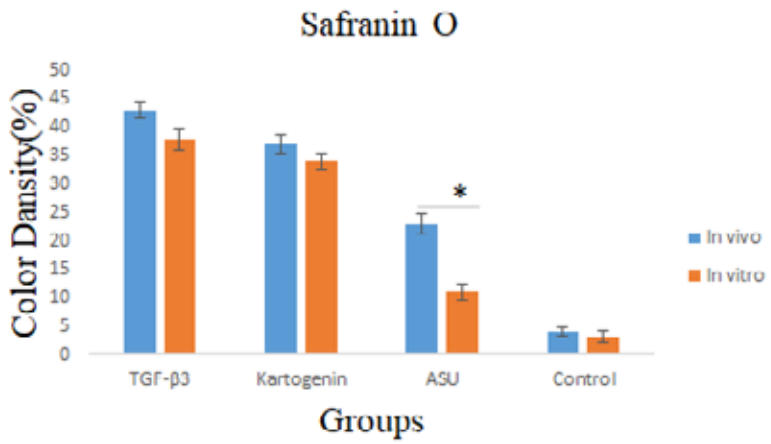
مقایسه‌دانسیته‌تجمع‌رنگ‌تولوئیدین‌بلوافزایش‌تجمع‌پروتئوگلیکان را در همه گروه‌ها در ماتریکس خارج سلولی در مدل حیوانی نسبت به شرایط آزمایشگاهی نشان می‌دهد که این افزایش برای گروه‌های فاکتور رشد تغییردهنده بتا ۳، کارتوژنین و آووکادو/سویا معنادار و برای گروه کنترل بدون معنی است ($P<0/05$) (تصویر شماره ۱).

5. Toluidine Blue



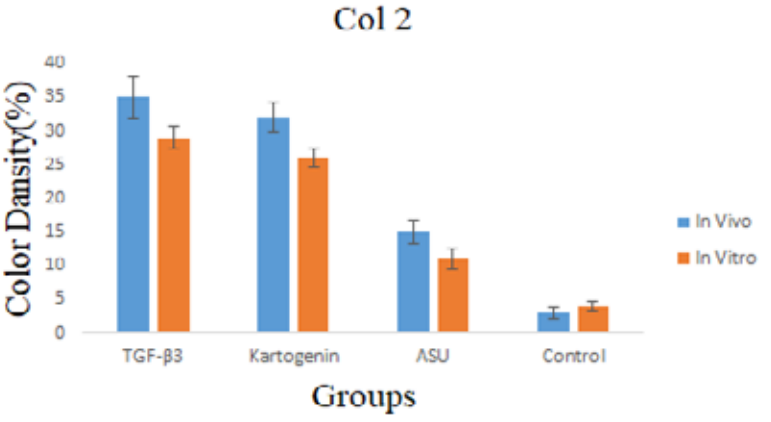
تصویر ۱. مقایسه نتایج نیمه‌کمی رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو در گروه‌های مختلف (کنترل، فاکتور رشد تغییردهنده بتا ۳، کارتوژنین و آووکادو/سویا) در شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی. * معناداری (P<۰/۰۵) و ** (P<۰/۱۰)

مجله علمی پزشکی
جنـــدی شـــاپور



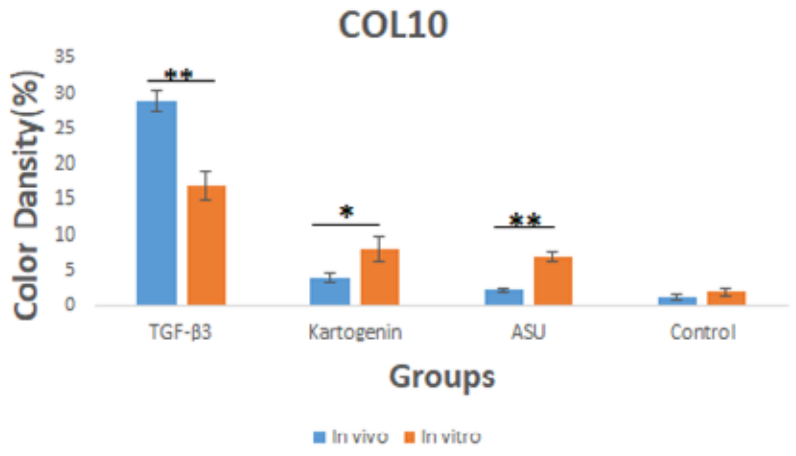
تصویر۲. مقایسه نتایج نیمه کمی رنگ‌آمیزی سافرانین O در گروه‌های مختلف (کنترل، فاکتور رشد تغییردهنده بتا ۳، کارتوژنین و آووکادو/سویا) در شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی. * معناداری (P<۰/۰۵) و ** (P<۰۰۱)

مجله علمی پزشکی
جنـــدی شـــاپور



تصویر۳. مقایسه نتایج نیمه کمی رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی کلاژن نوع ۲ در گروه‌های مختلف (کنترل، فاکتور رشد تغییردهنده بتا ۳، کارتوژنین و آووکادو/سویا) در شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی. * معناداری (P<۰/۰۵) و ** (P<۰۰۱)

مجله علمی پزشکی
جنـــدی شـــاپور



مجله علمی پزشکی
جندی شاپور

تصویر۴. مقایسه نتایج نیمه‌کمی رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی کلاژن نوع ۱۰ در گروه‌های مختلف (کنترل، فاکتور رشد تغییردهنده بتا ۳، کارتوژنین و آووکادو/سویا) در شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی. * معنی‌داری(P<۰/۰۵) و **(P<۰/۰۱)

رنگ‌آمیزی سافرانین O

مقایسه دانسیته تجمع رنگ سافرانین O افزایش تجمع رنگ را در همه گروه‌ها در مدل حیوانی نسبت به مدل آزمایشگاهی نشان می‌دهد، اما فقط در گروه آووکادو/سویا این افزایش معنادار شد (P<۰/۰۵) (تصویر شماره ۲).

نتایج ایمونوهیستوشیمی کلاژن نوع ۲

تجمع رنگ دی‌آمینو بنزیدین در گروه‌ها که نشان‌دهنده تجمع کلاژن نوع ۲ در ماتریکس خارج سلولی است در تمام گروه‌ها وجود دارد، اما نتایج هیچ یک از گروه‌ها نسبت به هم معنادار نیست (تصویر شماره ۳).

نتایج ایمونوهیستوشیمی کلاژن نوع ۱۰

تجمع رنگ دی‌آمینو بنزیدین در گروه‌ها که نشان‌دهنده تجمع کلاژن نوع ۱۰ در ماتریکس خارج سلولی است در تمام گروه‌ها وجود دارد، اما در گروه فاکتور رشد تغییردهنده بتا ۳ میزان تجمع کلاژن نوع ۱۰ در مدل حیوانی به طور معناداری نسبت به شرایط آزمایشگاهی افزایش یافته است و در گروه کارتوژنین و گروه آووکادو/سویا، تجمع کلاژن نوع ۱۰ در مدل حیوانی نسبت به شرایط آزمایشگاهی کاهش معناداری نشان داده است (تصویر شماره ۴).

بحث

بی‌شک، نقایص غضروف مفصلی یکی از چالش‌برانگیزترین مسائل در عرصه علم پزشکی و بیماری‌های مفاصل سینوویال محسوب می‌شود. به‌دلیل ماهیت ذاتی بافت غضروفی که همان فقدان رگ خونی و عصب در بافت است، ترمیم این بافت به کندی صورت گرفته و تقریباً ناچیز است و علاوه‌بر عدم ترمیم کامل، زمینه برای فعال شدن آبشاری از عوامل التهابی دخیل در نقایص غضروفی نیز به تخریب بیشتر آن منجر می‌شود [۲۱، ۲۲]. تاکنون درمان نقایص غضروفی، براساس رفع التهاب و تسکین درد در جهت کند کردن روند بیماری طراحی شده است. در موارد پیشرفته بیماری، قرار دادن پروتز، میکروفرکچر و پیوند اتولوگ کندروسیت می‌تواند تا حدودی در حل این مسئله تأثیرگذار باشد [۲۳]. اما امروزه مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی، با هدف جایگزینی اندام از دست رفته، همراه با پیشرفت‌های بیوتکنولوژی تکامل یافته است که ترکیبی از زیست مواد، فاکتورهای رشد و سلول‌های بنیادی است.

در این مطالعه، با استفاده از داربست فیبرین یک محیط ۳ بعدی مناسبی برای رشد و تمایز کندروژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی انسانی با استفاده از فاکتورهای فاکتور رشد تغییردهنده بتا ۳، کارتوژنین و آووکادو/سویا در محیط آزمایشگاهی و مدل حیوانی ایجاد شد. از طرفی پتانسیل کندروژنز سلول‌های بنیادی به تراکم بالای سلولی نیاز دارد. باتوجه‌به موارد فوق و نیاز بالای سلول در سلول درمانی، استفاده از سلول بنیادی مزانشیمال نسبت به سلول کندروسیت مناسب‌تر خواهد بود. در مطالعات زیادی نشان داده شده است که سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی توان تکثیری بالایی دارند و می‌توانند به انواع رده‌های سلولی ازجمله کندروسیت‌ها تمایز یابند. این نوع سلول‌های بنیادی، به وفور از بافت چربی با حداقل آسیب می‌توانند حاصل شوند [۲۴]. همچنین در مورد اثبات توانایی کندروژنیک سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، اریکسون و همکاران در سال ۲۰۰۲ اذعان کردند که با استفاده از داربست

آلژینات و پس از ۱۴روز تحت‌تأثیر فاکتور رشد تغییردهنده بتا ۱، تولید کلاژن نوع ۲ در سلول‌های مذبور افزایش یافته است [۲۵].

از دیگر عوامل و اجزای مهم در مهندسی بافت غضروف، داربست‌هایی است که دارای ویژگی‌های مشابه ماتریکس خارج سلولی است و بتوانند ضمن حمایت از سلول‌ها در جهت تکثیر و تمایز، انتقال مواد مغذی ضروری و دفع مواد زائد به‌خوبی عمل کنند. همچنین بتوانند به‌خوبی با بافت میزبان جایگزین شوند و به بافت میزبان اتصال یابند [۲۶، ۲۷]. در میان انواع داربست‌ها، داربست فیبرین یکی از ترکیبات زیستی و طبیعی محسوب می‌شود که می‌تواند به سهولت از خون بیمار تهیه شود [۲۸]. داربست فیبرین، زیست تخریب‌پذیری و زیست سازگاری خوبی دارد و باتوجه‌به نداشتن سمیت، بستری مناسب جهت تکثیر، تمایز و مهاجرت سلول‌ها فراهم می‌کند و استفاده‌های وسیعی در مهندسی بافت غضروف دارد [۲۹، ۳۰].

در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۱۱، گیراندون و همکاران برای مقایسه تکثیر و بقا سلول‌های بنیادی مشتق از چربی در دو داربست فیبرین و آلژینات انجام دادند، اثبات شد میزان تکثیر و بقا این سلول‌ها در داربست فیبرین بیشتر از داربست آلژینات است. همچین میزان آپوپتوز در این داربست کمتر از داربست آلژینات گزارش شد [۳۱]. در مطالعات فوق و دیگر مطالعات، داربست فیبرین عمدتاً به‌صورت تجاری تهیه شده است، اما در این مطالعه، اجزای تشکیل‌دهنده داربست به‌صورت کرایو و ترومبین از بانک خون تهیه و در آزمایشگاه داربست فیبرین ساخته شد. مونیرا بیان کرد که میزان گلیکوزآمینوگلیکان در داربست‌های دارای فیبرین حاوی سلول‌های غضروفی خرگوش، به میزان زیادی پس از کاشت در زیر پوست موش سوری افزایش یافته است [۳۲] که با نتایج این تحقیق هم‌خوانی دارد و می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از ترکیبات طبیعی برای ساخت داربست در مهندسی بافت به میزان بیشتری نسبت به داربست‌های سنتتیک می‌تواند در تمایز کندروژنیک مؤثر باشد. همچنین مشاهده شد سلول‌های تمایزیافته در محیط آزمایشگاهی در داربست فیبرین، پس از گذشت ۱۴ روز از کاشت زیر پوست موش صحرایی نر، خصوصیات بافت غضروف طبیعی را از خود نشان داده بودند.

در سال ۲۰۱۳ رحیم در تحقیقی گزارش کرد که افزایش فاکتور رشد تغییردهنده بتا ۳ از عوامل تخریب غضروف مفصلی و ایجاد استئوآرتریت است، در این مطالعه، میزان گیرنده‌های فاکتور رشد تغییردهنده بتا ۳ در سلول‌های غضروفی که به سمت هایپرتروفی و فاکتور رشد تغییردهنده بتا ۳ تغییرات دژنراتیو پیش می‌روند به‌طور فزاینده‌ای افزایش می‌یابد [۳۳].

در مطالعه حاضر نیز استفاده از فاکتور رشد فاکتور رشد تغییردهنده بتا ۳ نشان داد این فاکتور رشد هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در مدل حیوانی می‌تواند تمایز کندروژنیک ایجاد کند که شاهد این ادعا بیان ژن‌های دخیل در کندروژنز از قبیل SOX9، کلاژن نوع۲ و اگریکان است. نتایج حاصل از بیان این ژن‌ها در شرایط آزمایشگاهی و رصد پروتئین‌های کلاژن نوع۲ و X در شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی نشان داد نسبت به آووکادو/سویا به‌صورت معناداری مؤثر بود، اما این افزایش نسبت به کارتوژنین معنادار نبود و بیان ژن کلاژن نوع X که نشان‌دهنده میزان هایپرتروفی در سلول‌های تمایزیافته است در سلول‌هایی که در مدیوم کندروژنیک حاوی فاکتور رشد تغییردهنده بتا ۳ به میزان ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر تمایز یافته بودند، به‌صورت معنادار در شرایط آزمایشگاهی نسبت به گروه‌های دیگر افزایش یافته بود که به این معنی است که فاکتور رشد فاکتور رشد تغییردهنده بتا ۳ علی‌رغم تأثیر شدید در تمایز سلول‌های بنیادی به سلول غضروفی می‌تواند سلول‌ها را به سمت هایپرتروفی شدن و شاید آپوپتوز پیش ببرد که این موضوع از نقاط ضعف استفاده از این فاکتور رشد است.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد استفاده از آووکادو/سویا پس از ۱۴ روز در شرایط آزمایشگاهی بیان ژن‌های دخیل در کندروژنز را افزایش می‌دهد، اما این افزایش نسبت به گروه‌های دیگر و گروه کنترل معنادار نبود. تحقیقات قبلی نشان داده است که پس از ۲۱ روز بیان ژن‌هایی مثل کلاژن نوع ۲ و اگریکان به شکل معناداری افزایش نشان داده است [۳۴]. شاید استفاده طولانی‌مدت از این عامل، باعث افزایش بیان این ژن‌ها شده است. کاهش بیان ژن کلاژن نوع ۱۰ را می‌توان از نقاط قوت این عامل القائی نام برد که هم در شرایط آزمایشگاهی و هم مدل حیوانی این امر مشاهده شد. همچنین زیستایی سلول‌های بنیادی در گروه آووکادو/سویا نسبت به گروه فاکتور رشد تغییردهنده بتا ۳ و کارتوژنین بیشتر بود. علی‌رغم مشخص نبودن فرایند مولکولی این رخداد، به نظر می‌رسد مهار فاکتورهای التهابی که توسط سایر محققین گزارش شده بود، باعث پیشگیری از مرگ سلولی و افزایش زیستایی در سلول‌های بنیادی شده است.

امروزه داروی کوچک مولکول کارتوژنین به‌عنوان فاکتوری القائی در مهندسی بافت غضروفی مطرح شده است که نیاز به تحقیقات گسترده‌تری دارد. در سال ۲۰۱۲ جانسون و همکاران اثبات کردند که کارتوژنین با اتصال به عامل فاکتور متصل شونده به هسته بتا باعث آزاد شدن این عامل ازفیلامین نوع a و اتصال آن به فاکتور RUNX1 و در نهایت بیان ژن‌های دخیل در کندروژنز مثل SOX9 ، کلاژن نوع ۲ و اگریکان در سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی می‌شود [۸].

در سال ۲۰۱۴ زانگ بیان کرد کارتوژنین از تأثیر فاکتورهای التهابی مثل IL1 و اینترلوکین۱ و عامل نکروزدهنده‌ی تومور بتا بر روی سلول‌های غضروفی در محیط کشت جلوگیری می‌کند و از روند دژنراتیو در این سلول‌ها می‌کاهد [۳۵]. نتایج این طرح نشان داد استفاده از کارتوژنین باعث بیان ژن‌های کلاژن نوع ۲،

اگریکان و SOX9 به‌صورت معناداری هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در مدل حیوانی می‌شود. تحقیقات گذشته نشان داده که کارتوژنین از طریق تغییر بالانس از حالت پیش هایپرتروفی به سمت پیش تمایز و تکثیر باعث کاهش بیان ژن کلاژن نوع ۱۰ می‌شود که با نتایج این تحقیق هم‌خوانی دارد [۳۶].

در این مطالعه، پس از ۱۴ روز تمایز غضروفی در شرایط آزمایشگاهی این سلول‌ها و داربست فیبرینی که سلول‌ها در آن تمایز یافته بود به زیر پوست موش صحرایی نر انتقال یافت و پس از ۱۴ روز نمونه‌گیری انجام و نمونه‌ها از نظر هیستولوژی و ایمونوهیستوشیمی مورد آزمایش قرار گرفت که نسبت به شرایط آزمایشگاه سلول‌ها بیشتر دارای مشخصات بافت غضروف شفاف بودند.

در سال ۲۰۰۸، منیره بیان کرد که میزان گلیکوزامینوگلیکان در داربست حاوی سلول‌های غضروفی خرگوش به میزان زیادی پس از کاشت در زیر پوست موش سوری افزایش یافته است [۳۲]. همچنین در سال ۲۰۰۱، ساسانو و همکاران اذعان کردند که میزان بیان کلاژن نوع۱ که یک مارکر فیبروزی است در سلول‌های تمایزیافته در مدل حیوانی نسبت به مدل آزمایشگاهی کمتر است [۳۷]. مقایسه نتایج رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی در شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی حاکی از این مطلب است که در داربست‌های کاشته‌شده، قرار گرفتن سلول‌های تمایزیافته در زیر پوست، افزایش میزان عناصر تشکیل‌دهنده ماتریکس غضروفی مثل پروتئوگلیکان‌ها را ایجاد کرده است و ازطرفی میزان تجمع کلاژن نوع۱۰ که نشان‌دهنده شروع و وقوع روند هایپرتروفی در سلول‌های تمایزیافته است در برخی گروه‌ها بهویژه آووکادو/سویا به‌طور معناداری کاهش یافته است.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق حاکی از این است که نسبت به فاکتور رشد مشخص و گران‌قیمت فاکتور رشد تغییردهنده بتا ۳، کارتوژنین و آووکادو/سویا قادر به القای کندروژنیک در سلول‌های بنیادی مشتق از چربی انسانی هستند، اما اثر کارتوژنین در مقایسه با آووکادو/سویا در مدت ۱۴ روز تا حدودی بارزتر به نظر می‌رسد. ازطرفی تأثیر مهاری بر روی بیان ژن دخیل در هایپرتروفی آووکادو/سویا بیشتر از کارتوژنین و فاکتور رشد تغییردهنده بتا ۳ است.

همچنین نتایج حیوانی این طرح نشان داده است که کاشت سلول‌های غضروفی تمایزیافته در محیط آزمایشگاه قبل از انتقال به محل ضایعه می‌تواند به بلوغ و کامل‌تر شدن ویژگی‌های غضروف ساخته‌شده کمک کند.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه با کد اخلاق IR.MUI.REC.1395.3.176 در دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد تصویب شده است.

حامی مالی

مقاله برگرفته از پایان‌نامه دوره دکتری محمدعلی ایزدی- گروه علوم تشریحی- دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد و توسط این دانشگاه تأمین بودجه شده است.

مشارکت نویسندگان

مفهوم‌سنجی: بتول هاشمی و علی والیانی؛ روش‌شناسی: بتول هاشمی، حمید بهرامیان و ابراهیم اسفندیاری؛ نگارش: مجید پورانتظاری، محمدعلی ایزدی و بتول هاشمی؛ ویراستاری و نهایی‌سازی نوشته: مجبد پورانتظاری، بتول هاشمی، حمید بهرامیان و ابراهیم اسفندیاری؛ بصری‌سازی: بتول هاشمی و مجید پورانتظاری؛ منابع و تأمین مالی: محمدعلی ایزدی.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان در این مقاله هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

[1] Khorasani G, Miri R, Ghanbarzade K, Farzad H, Farhadi H. [Effect of dexamethasone on viability of cartilage grafts in preserving medias (Persian)]. Med J Mashhad Univ Med Sci. 2016; 9(3):155-62. [DOI:10.22038/MJMS.2016.7723]

[2] Basiri A, Hashemibeni B, Kazemi M, Valiani A, Aliakbari M, Ghasemi N. Cartilage tissue formation from human adipose-derived stem cells via herbal component (avocado/soybean unsaponifiables) in scaffold-free culture system. Dental Res J. 2020; 17(1):54-9. [DOI:10.4103/1735-3327.276236] [PMID] [PMCID]

[3] Izadi M, Valiani A, Bahramian H, Esfandiari E, Hashemibeni B. Which factor is better for cartilage tissue engineering from human adipose-derived stem cells? Kartogenin or avocado soybean unsaponifiable. Pharmacophore. 2018; 9:140-8. [Link]

[4] Augustyniak E, Trzeciak T, Richter M, Kaczmarczyk J, Suchorska W. The role of growth factors in stem cell-directed chondrogenesis: A real hope for damaged cartilage regeneration. Int Orthop. 2015; 39(5):995-1003. [DOI:10.1007/s00264-014-2619-0] [PMID]

[5] Endo K, Fujita N, Nakagawa T, Nishimura R. Comparison of the effect of growth factors on chondrogenesis of canine mesenchymal stem cells. J Vet Med Sci. 2019; 81(8):1211-8. [DOI:10.1292/jvms.18-0551] [PMID] [PMCID]

[6] Mueller MB, Fischer M, Zellner J, Berner A, Dienstknecht T, Prantl L, et al. Hypertrophy in mesenchymal stem cell chondrogenesis: Effect of TGF-β isoforms and chondrogenic conditioning. Cells Tissues Organs. 2010; 192(3):158-66. [DOI:10.1159/000313399] [PMID] [PMCID]

[7] López-Ruiz E, Jiménez G, Kwiatkowski W, Montañez E, Arrebola F, Carrillo E, et al. Impact of TGF-β family-related growth factors on chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells isolated from lipoaspirates and infrapatellar fat pads of osteoarthritic patients. Eur Cell Mater. 2018; 35:209-24. [DOI:10.22203/eCM.v035a15] [PMID] [PMCID]

[8] Johnson K, Zhu S, Tremblay MS, Payette JN, Wang J, Bouchez LC, et al. A stem cell-based approach to cartilage repair. Science. 2012; 336(6082):717-21. [DOI:10.1126/science.1215157] [PMID]

[9] Thiers M. [Unsaponifiable constituents of avocado and soya oils. treatment of certain forms of arthralgia (French)]. J Med Lyon. 1972; 53(222):195. [PMID]

[10] Kut-Lasserre C, Miller CC, Ejeil A, Gogly B, Dridi M, Piccardi N, et al. Effect of avocado and soybean unsaponifiables on gelatinase A (MMP-2), stromelysin 1 (MMP-3), and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase (TIMP-1 and TIMP-2) secretion by human fibroblasts in culture. J Periodontol. 2001; 72(12):1685-94. [DOI:10.1902/jop.2001.72.12.1685] [PMID]

[11] Bahrami M, Valiani A, Amirpour N, Rani MZR, Hashemibeni B. Cartilage tissue engineering via icariin and adipose-derived stem cells in fibrin scaffold. Adv Biomed Res. 2018; 7:36. [DOI:10.4103/2277-9175.225925] [PMID] [PMCID]

[12] Hashemibeni B, Razavi S, Esfandiary E, Karbasi S, Mardani M, Nasresfahani M. Induction of chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells with TGF-β3 in pellet culture system. Iran J Basic Med Sci. 2008; 11(1):10-7. [DOI:10.22038/IJBMS.2008.5191]

[13] Hashemibeni B, Valiani A, Esmaeli M, Kazemi M, Aliakbari M, Iranpour FG. Comparison of the efficacy of piascledine and transforming growth factor β1 on chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in fibrin and fibrin-alginate scaffolds. Iran J Basic Med Sci. 2018; 21(2):212. [DOI:10.22038/IJBMS.2018.24693.6136] [PMID] [PMCID]

[14] Liu F, Xu H, Huang H. A novel kartogenin-platelet-rich plasma gel enhances chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro and promotes wounded meniscus healing in vivo. Stem Cell Res Ther. 2019; 10(1):201. [DOI:10.1186/s13287-019-1314-x] [PMID] [PMCID]

[15] 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. [DOI:10.1016/j.biomaterials.2010.11.003] [PMID]

[16] Noori A, Ashrafi SJ, Vaez-Ghaemi R, Hatamian-Zaremi A, Webster TJ. A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering. Int J Nanomedicine. 2017; 12:4937-61. [DOI:10.2147/IJN.S124671] [PMID] [PMCID]

[17] Kreuz P, Gentili C, Samans B, Martinelli D, Krüger J, Mittelmeier W, et al. Scaffold-assisted cartilage tissue engineering using infant chondrocytes from human hip cartilage. Osteoarthritis Cartilage. 2013; 21(12):1997-2005. [DOI:10.1016/j.joca.2013.09.007] [PMID]

[18] Schmitz N, Laverty S, Kraus V, Aigner T. Basic methods in histopathology of joint tissues. Osteoarthritis Cartilage. 2010; 18:S113-6. [DOI:10.1016/j.joca.2010.05.026] [PMID]

[19] Solchaga LA, Penick KJ, Welter JF. Chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Tips and tricks. In: Vemuri M, Chase L, Rao M, editors. Mesenchymal stem cell assays and applications. Totowa: Humana Press; 2011. [DOI:10.1007/978-1-60761-999-4_20]

[20] Jensen EC. Quantitative analysis of histological staining and fluorescence using imagej. The Anat Rec. 2013; 296(3):378-81. [DOI:10.1002/ar.22641] [PMID]

[21] Stock M, Menges S, Eitzinger N, Geßlein M, Botschner R, Wormser L, et al. A dual role of upper zone of growth plate and cartilage matrix-associated protein in human and mouse osteoarthritic cartilage: Inhibition of aggrecanases and promotion of bone turnover. Arthritis Rheumatol. 2017; 69(6):1233-45. [DOI:10.1002/art.40042] [PMID]

[22] Saito T, Tanaka S. Molecular mechanisms underlying osteoarthritis development: Notch and NF-κB. Arthritis Res Ther. 2017; 19(1):94. [DOI:10.1186/s13075-017-1296-y] [PMID] [PMCID]

[23] Hotham W, Malviya A. A systematic review of surgical methods to restore articular cartilage in the hip. Bone Joint Res. 2018; 7(5):336-42. [DOI:10.1302/2046-3758.75.BJR-2017-0331] [PMID] [PMCID]

[24] Karimpour Malekshah A, Talebpour Amiri F, Ghaffari E, Alizadeh A, Jamalpoor Z, Mirhosseini M, et al. Growth and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from

human adipose tissue on chitosan scaffolds. J Babol Univ Med Sci. 2016; 18(9):32-8. [Link]

[25] Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. Biochem Biophys Res Commun. 2002; 290(2):763-9. [DOI:10.1006/bbrc.2001.6270] [PMID]

[26] Zhang D, Yi C, Zhang J, Chen Y, Yao X, Yang M. The effects of carbon nanotubes on the proliferation and differentiation of primary osteoblasts. Nanotechnology. 2007; 18(47):475102. [DOI:10.1088/0957-4484/18/47/475102]

[27] Chen Y, Bilgen B, Pareta RA, Myles AJ, Fenniri H, Ciombor DM, et al. Self-assembled rosette nanotube/hydrogel composites for cartilage tissue engineering. Tissue Eng Part C Methods. 2010; 16(6):1233-43. [DOI:10.1089/ten.tec.2009.0400] [PMID]

[28] Mauviel A, Loyau G, Pujol J. [Effect of unsaponifiable extracts of avocado and soybean (piascledine) on the collagenolytic action of cultures of human rheumatoid synoviocytes and rabbit articular chondrocytes treated with interleukin-1 (French)]. Rev Rhum Mal Osteoartic. 1991; 58(4):241-5. [PMID]

[29] Hashemibeni B, Razavi S, Esfandiary E, Salehi M, Karbasi S, Mardani M, et al. [The effect of BMP-6 growth factor on differentiation of adipose-derived stem cells into chondrocyte in pellet culture system (Persian)]. J Isfahan Med Sch. 2009; 27(100):618-31. [Link]

[30] 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. [DOI:10.1016/j.jconrel.2006.04.017] [PMID]

[31] 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. 2011; 57(2):47-56. [PMID]

[32] Munirah S, Kim S, Ruszymah BH, Khang G. The use of fibrin and poly (lactic-co-glycolic acid) hybrid scaffold for articular cartilage tissue engineering: An in vivo analysis. Eur Cell Mater. 2008; 15:41-52. [DOI:10.22203/eCM.v015a04] [PMID]

[33] Ab-Rahim S, Selvaratnam L, Raghavendran HR, Kamarul T. Chondrocyte-alginate constructs with or without TGF-β1 produces superior extracellular matrix expression than monolayer cultures. Mol Cell Biochem. 2013; 376(1-2):11-20. [DOI:10.1007/s11010-012-1543-0] [PMID]

[34] 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 (Persian)]. J sfahan Med Sch. 2016; 33(357):1862-70. [Link]

[35] Zhang J, Wang JH. Kartogenin induces cartilage-like tissue formation in tendon-bone junction. Bone Res. 2014; 2:14008. [DOI:10.1038/boneres.2014.8] [PMID] [PMCID]

[36] Yuan T, Zhang J, Zhao G, Zhou Y, Zhang CQ, Wang JH. Creating an animal model of tendinopathy by inducing chondrogenic differentiation with kartogenin. Plos One. 2016; 11(2):e0148557. [DOI:10.1371/journal.pone.0148557] [PMID] [PMCID]

[37] Sasano Y, Takahashi I, Zhu J-X, Ohtani H, Mizoguchi I, Kagayama M. Gene and protein expressions of type I collagen are regulated tissue-specifically in rat hyaline cartilages in vivo. Eur J Morphol. 2001; 39(3):149-54. [DOI:10.1076/ejom.39.3.149.4675] [PMID]

This Page Intentionally Left Blank