The ability of H_2O_2 to induce differentiation of human mesenchymal stem cells into chondrocytes

Goudarzi F., PhD Candidate[1,2], Mohammadalipour A., PhD[3], Bahabadi M., PhD[4], Moradi M.N., PhD Candidate[1], Sarveazad A., PhD[5], Goodarzi M.T., PhD[6], Khodadadi I., PhD[7]

1. PhD candidate, Students Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.
2. Regenerative Medicine Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.
3. PhD in Clinical Biochemistry, Department of Clinical Biochemistry, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Bioinformatics Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Iran
4. PhD in Clinical Biochemistry, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Iran
1. PhD candidate, Students Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan-Iran
5. Assistant Professor in Anatomy, Colorectal Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
6. Professor in Clinical Biochemistry, Department of Biochemistry, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan-Iran
7. Associate Professor in Clinical Biochemistry, Department of Biochemistry, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran (Corresponding Author), Tel:+98-81-38380572, khodadadi@umsha.ac.ir

ABSTRACT

Background and Aim: Cartilage disorders may deteriorate following oxidative stress injuries affecting mature chondrocytes. Meantime, mesenchymal stem cells (MSCs) can differentiate into chondrocytes in the presence of oxidative conditions and act as a source of compensation for injured chondrocytes. The present study aimed to investigate the effect of H_2O_2 on MSCs differentiation into chondrocytes in order to cast light on the dual roles of oxidative stress in the pathogenesis of diseases.

Materials and Methods: Human mesenchymal stem cells were isolated from abdominal adipose tissue of three different donors and cultured in the presence of 50 μM H_2O_2 in order to differentiate into chondrocytes. We determined cell viability by tetrazolium assay and measured reactive oxygen species (ROS) level by flow cytometry. Presence of glycoseaminoglycans was confirmed by safranin staining.

Results: The percentage of cells containing ROS was significantly higher in the cells treated with hydrogen peroxide (29.2% ± 1) compared to that in the untreated control cells (7.7% ± 1.4). A significant increase in glycoseaminoglycan content was observed in H_2O_2 treated cells compared to that in the control cells both on the 9th day (treated: 1.57×10^4 ± 0.1 *vs* control: 0.91×10^4 ± 0.09) and 21st day (treated: 2.87×10^4 ± 0.2 *vs* control: 0.96×10^4 ± 0.07). In addition, comparison of glycoseaminoglycan content on the 9th and 21st days showed a significantly higher content in both treated and control cells on the 21st day (p<0.05).

Conclusion: Hydrogen peroxide resulted in increased differentiation of adipose tissue-derived MSCs into chondrocytes. Therefore, we concluded that, oxidative stress had positive role in the induction of chondrocyte differentiation.

Keywords: Chondrocytes, Differentiation, Glycosaminoglycans, Oxidative stress, Stem cells.

Received: Mar 1, 2017 **Accepted:** Nov 20, 2017

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.22102/22.6.63]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و دوم / بهمن و اسفند ۱۳۹۶/۷۳-۶۳

توانایی H_2O_2 در القای تمایز سلول های بنیادی مزانشیمال انسانی به کندروسیت

فرجام گودرزی[۲و۱]، عادل محمد علی پور[۳]، مجید بهابادی[۴]، محمد نبی مرادی[۱]، آرش سروآزاد[۵]، محمد تقی گودرزی[۶]، ایرج خدادادی[۷]

۱. دانشجوی دکترای (PhD) بیوشیمی بالینی، مرکز پژوهش دانشجویان، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.

۲. مرکز تحقیقات پزشکی ترمیمی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

۳. دکترای بیوشیمی بالینی (PhD)، کارشناس گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات بیوانفورماتیک، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران.

۴. دکترای بیوشیمی بالینی (PhD)، کارشناس گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

۵ . استادیار، مرکز تحقیقات کولورکتال، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

۶ . استاد، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.

۷. دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران (مولف مسوول)، تلفن ثابت:۳۸۳۸۰۵۷۲-۰۸۱،
ikhodadadi@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: بیماری های غضروفی در پی آسیب استرس اکسیداتیو به کندروسیت های بالغ تشدید می شوند. در عین حال سلولهای بنیادی مزانشیمال (MSCs) می توانند در حضور شرایط اکسیداتیو با تمایز به کندروسیت ها منبعی برای جبران این آسیبها باشند. این مطالعه با بررسی اثر H_2O_2 بر تمایز MSCs به کندروسیت به نقش دوگانه استرس اکسیداتیو در آسیب شناسی بیماری ها می پردازد.

روش بررسی: سلولهای بنیادی مزانشیمال انسانی از چربی شکمی سه اهدا کننده مختلف جداسازی و با پراکسید هیدروژن ۵۰ میکرومولار درمان شدند تا به کندروسیت تمایز یابند. میزان بقاء سلولی توسط ترازولیوم، مقدار گونه های فعال اکسیژن (ROS) بروش فلوسیتومتری و وجود گلیکوزآمینوگلیکان ها با رنگ سافرانین مشخص شد.

یافته ها: درصد سلولهای حاوی ROS در گروه های تیمار شده با پراکسید هیدروژن (۱±۲۹/۲ ٪) به طور معنی داری بالاتر از درصد سلولهای متناظر گروه کنترل (۱/۴±۷/۷ ٪) بود. افزایش میزان گلیکوزآمینوگلیکانها به ترتیب در روزهای نهم (کنترل: ۰/۰۹± ۰/۹۱×10^4 در مقابل درمان: ۰/۱± ۱/۵۷×10^4) و بیست و یکم (کنترل: ۰/۰۷± ۰/۹۶×10^4 در مقابل درمان: ۰/۲± ۲/۸۷×10^4) در مواجهه با H_2O_2 مشاهده گردید. همچنین میزان گلیکوزآمینوگلیکان سلولی در هر یک از گروه های کنترل و درمان شده در روز ۲۱ بطور معنی داری بیشتر از مقدار متناظر آن در روز نهم بود ($p < ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: پراکسید هیدروژن منجر به افزایش تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمال بافت چربی به کندروسیت ها گردید. بنابراین می توان نتیجه گرفت که استرس اکسیداتیو به موازات دیگر اثرات شناخته شده خود در تمایز سلولهای بنیادی اثر القایی مثبتی دارد.

کلیدواژه: استرس اکسیداتیو، تمایز سلولی، سلولهای بنیادی، کندروسیت ها، گلیکوزآمینوگلیکان ها

وصول مقاله:۹۵/۱۲/۱۱ اصلاحیه نهایی:۹۶/۸/۷ پذیرش:۹۶/۸/۲۹

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.22102/22.6.63]

مقدمه

غضروف ها حاوی سلول های کندروسیتی می باشند که ماتریکس غضروفی را تولید و پایدار می کنند. این ماتریکس عمدتاً از کلاژن و پروتئوگلیکان و گلیکوزآمینو گلیکان ها (GAGs[1]) تشکیل شده است (۱). گلیکوزآمینو گلیکان ها جزو پلی ساکاریدهای غیر شاخه ای بسیار قطبی و جاذب آب می باشند که عمل لیز کنندگی را در بدن داشته و ترکیبی ایده آلی جهت لغزنده کردن مفاصل و غضروف را ایجاد می کنند (۱). عوامل متعددی منجر به تغییر ساختار این ماتریکس می گردند و متابولیسم غیر نرمال گلیکوزآمینو گلیکان ها در انواع مختلفی از بیماری ها مشاهده می شود اما مهمترین بیماری مفصلی که در آن میزان GAG به طور معنی داری کاهش می یابد بیماری استئوآرتریت (OA[2]) است که مشخصه بارز آن تخریب پیشرونده غضروف ها می باشد (۲). به طور کلی غضروف حاوی کندروسیت ها و ماتریکس خارج سلولی (ECM[3]) است که هر دو در پایداری ساختار و عملکرد مفصل نقش دارند (۳و۴). مکانیسم های مختلفی در بروز ناهنجاری های غضروف موثر می باشند و عدم توازن بین عوامل پیش اکسیدان[4] و آنتی اکسیدان که منجر به القاء استرس اکسیداتیو سلولی شده و تخریب غضروف ها را بدنبال دارد از مهمترین این عوامل بشمار می آید (۵). استرس اکسیداتیو در اثر تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS[5]) و یا کاهش عوامل دفاعی آنتی کسیدانی مانند گلوتاتیون ایجاد می شود (۶). تولید گونه های فعال اکسیژن یکی از وجوه استرس اکسیداتیو بوده و شامل رادیکال های آزاد و پراکسیدها است. بعضی از این گونه های کمتر فعال (مانند سوپراکسید) می توانند توسط واکنش های اکسیداسیون-احیا با فلزات حالت گذرا یا سایر ترکیبات حدواسط احیا (مانند کینون ها) به گونه های رادیکالی شدیدتر مانند هیدروکسیل تبدیل شده و منجر به تخریب سلول ها از جمله کندروسیت های موجود در غضروف مفاصل گردند (۷). در همین راستا دیده شده است که میزان تولید گلیکوزآمینو گلیکان ها (GAGs) بعنوان یکی از مارکرهای فعالیت کندروسیت ها در بیماریهای مفصلی مانند استئوآرتریت نسبت به افراد نرمال کاهش می یابد (۸). اگرچه مقادیر بسیار بالای ROS موجب آسیب سلولی و اختلال در عملکرد آن می گردد، اما از سویی دیگر محققین بر این باورند که سطوح پایینی از مقدار ROS برای حفظ پرولیفراسیون، تمایز و بقاء سلولی ضروری است (۹). این بدان معنا است که ROS می تواند در غلظت های مختلف نقش های متفاوتی را ایفاء نماید لذا این فرضیه که در حضور شرایط استرس اکسیداتیو نه چندان شدید، بدن از طریق مکانیسم دفاعی و از طریق القاء تمایز سلول های بنیادی مزانشیمال (MSC[6]) به کندروسیت سعی می نماید که کندروسیت های از دست رفته را جبران نموده و بدین ترتیب میزان آسیب وارده را کاهش دهد چندان دور از ذهن نیست.

سلول های بنیادی مزانشیمال (MSC) سلول های چند قوه ای[7] هستند که دارای توانایی بالایی در تکثیر خودبخودی می باشند (۱۰). در شرایط مختلف القاء، این سلول ها توانایی تبدیل به استوسیت (۱۱)، کندروسیت (۱۲)، آدیپوسیت (۱۳)، تنوسیت، میوسیت، نوروسیت و سلول های مزودرم احشایی را دارند (۱۴). سلول های بنیادی مزانشیمال از بافت های متعددی از جمله مغز استخوان، بافت چربی احشایی و زیرجلدی، خون محیطی و مایع مفصلی استخراج می شوند و دارای قابلیت تکثیر بالایی در محیط رشد مناسب می باشند (۹). همچنین بسته به اینکه از کدام بافت استخراج می شوند خصوصیات رشد متفاوتی از خود نشان می دهند. این مطالعه قصد دارد با بررسی اثر H_2O_2 بر تمایز سلول

[1]- Glycosaminoglycans
[2] Osteoarthritis
[3]- Extracellular matrix
[4]- Pro-oxidants
[5]-Reactive oxygen species
[6] Mesenchymal Stem Cells
[7]- Multipotent

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.22102/22.6.63]

های بنیادی مشتق شده از بافت چربی انسانی به کندروسیت ها فرضیه پیشگفت را که شرایط استرس اکسیداتیو نه چندان شدید می تواند موجب افزایش قابلیت تمایز سلولهای بنیادی به کندروسیت گردد را مورد بررسی قرار دهد. در این مطالعه قابلیت سنتز گلیکوزآمینوگلیکان ها توسط سلول های کندروسیت حاصله بعنوان شاخص تمایز به کار خواهد رفت.

روش بررسی

محیط کشت DMEM-f12، FBS، پنی سیلین/استرپتومایسین ۱٪، انسولین، دگزامتازون، ایندومتاسین، اسکوربیک اسید ۲-فسفات و فلوروفورهای DCFDA[8] و PI[9] از شرکت سیگما (Sigma-Aldrich Ltd., UK) خریداری شدند.

جداسازی سلول های بنیادی مزانشیمال انسان:

سلول ها از محلول لیپوآسپیره بافت چربی زیر جلدی انسانی از سه خانم ۳۰ تا ۳۵ ساله ای که جهت انجام عمل لیپوساکشن ناحیه شکم به کلینیک زیبایی ارم (تهران، دهکده المپیک) مراجعه کرده بودند تهیه شد. پس از جداسازی چربی و خون ظاهری، محلول مورد نظر با PBS[10] و پنی سیلین-استرپتومایسین ۵٪ سه بار شستشو داده شد. جهت حل کردن بافت چربی و به منظور آزادسازی سلول ها از بافت همبند، از کلاژناز تیپ I با غلظت ۰/۱٪ استفاده شد و سپس کلاژناز موجود در محلول توسط محیط کشت حاوی DMEM-f12، FBS ۱۰ ٪ و پنی سیلین/استرپتومایسین ۱٪ (به غلظت نهایی پنی سیلین 100 U/ml و استرپتومایسین 100 µg/ml) خنثی شد. پس از سانتریفیوژ، پلت تشکیل شده که حاوی Stromal Vascular Fraction بود در محیط کشت حاوی DMEM-f12، FBS ۲۰ ٪ و پنی سیلین-استرپتومایسین ۱ ٪ قرار داده شد. پس از آن، محیط کشت سلول ها به محیط حاوی DMEM-f12، FBS ۱۰ ٪ و پنی سیلین-استرپتومایسین ۱٪ تغییر پیدا کرد و محیط کشت سلول ها هر ۴-۳ روز تا رسیدن به اشباع ۸۰-۹۰٪ تعویض شد.

تعیین هویت سلول های مزانشیمال بنیادی :

بمنظور اطمینان از اینکه سلول های مزانشیمال مورد استفاده سلولهایی بنیادی هستند و با توجه به اینکه این سلول ها از بافت چربی جدا شده اند نسبت به تمایز آنها به سلول چربی بالغ اقدام شد و موفقیت فرآیند تمایز از طریق شناسایی قابلیت ذخیره سازی تری گلیسرید در سلول های بالغ ایجاد شده مورد بررسی قرار گرفت. برای تمایز سلول های بنیادی به آدیپوسیت، سلول ها در پلیت ۶ خانه کشت داده شدند و پس از اشباع ۷۰ تا ۸۰ درصدی توسط محیط حاوی انسولین 10 µg/ml، دگزامتازون 1 µM، 0.5 mM IBMX و ایندومتاسین 200 µM به مدت ۱۴ روز تیمار شدند. در پایان دوره، رنگ آمیزی Oil Red O برای تایید وجود قطرات چربی انجام شد.

رنگ آمیزی Oil Red O:

پس از پایان دوره تیمار، سلول ها توسط PBS دوبار شستشو داده شده و با ۰,۵ میلی لیتر از محلول فرمالین ۱۰٪ به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. پس از شستشوی با آب دیونیزه، سلول ها در محلول ایزوپروپانول ۶۰٪ قرار گرفتند و با رنگ Oil Red O رنگ آمیزی شدند. در ادامه رنگ Haris-Hematoxilin به منظور رنگ کردن هسته سلول و ایجاد کنتراست با رنگ قرمز Oil Red O به هر چاهک اضافه شد و سلول ها در زیرمیکروسکوپ نوری مورد مشاهده قرار گرفتند.

روش القاء تمایز:

از آنجا که در اکثر بیماری های قلبی-عروقی و بیماری های مزمن غلظت ۵۰ میکرومولار پراکسید هیدروژن به عنوان عامل آسیب رسان گزارش شده است در این مطالعه نیز از غلظت ۵۰ میکرومولار پراکسید هیدروژن برای مداخله استفاده شد و اثر بخشی این غلظت بر تمایز سلول های بنیادی مزانشیمال بافت چربی به کندروسیت ها مورد بررسی قرار گرفت.

[8] 2′,7′-Dichlorofluorescin diacetate
[9] Propidium Iodide
[10] Phosphate buffered saline

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.22102/22.6.63]

سلول های بنیادی در پاساژ چهارم با دانسیته ۵۰۰۰ سلول بر سانتی مترمربع کشت داده شدند و پس از رسیدن به اشباع ۹۰٪، محیط کشت کندروژنیک (محیط القاء تمایز سلول های بنیادی به کندروسیت) بصورت یک روز در میان و به مدت ۲۱ روز به پلیت ها اضافه شد. محیط القاء شامل اسکوربیک اسید ۲-فسفات ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر (Sigma-Aldrich Ltd., UK)، دگزامتازون ۱۰۰ نانومولار (Sigma-Aldrich Ltd., UK)، ITS یک درصد (Invitrogen Thermo Fisher Scientific, USA)، پرولین ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر (Merck, Germany) و TGF-β3 با غلظت ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر بود.

تایید وجود گونه های آزاد اکسیژن به روش فلوسایتومتری:

از آنجا که هدف از این مطالعه بررسی نقش پراکسید هیدروژن در القاء تمایز است بمنظور اطمینان از افزایش گونه های فعال اکسیژن (ROS) درون سلولی در مواجهه با H_2O_2 و در نتیجه اظمینان از ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو درون سلولی در سلول های مزانشیمال، میزان ROS به روش فلوسایتومتری و با استفاده از فلوروفورهای DCFDA و PI خریداری شده از شرکت سیگما (Sigma-Aldrich Ltd., UK) سنجیده شد. رنگ DCFDA توسط سلول های زنده برداشته شده و پس از واکنش با رادیکال های آزاد خاصیت فلورسنس (نشر نور در طول موج ۵۲۷ نانومتر) پیدا می کند. رنگ PI نیز به DNA سلول های مرده متصل می شود که در طول موج ۶۲۰ نانومتر نشر نور دارد. در این روش سلول ها از فلاسک جدا شده و پس از شمارش در سه تیوب مختلف (هر تیوب ۱۱۰ هزار سلول) در غلظت های صفر و ۵۰ میکرومولار پراکسید هیدروژن انکوبه شدند. سپس سلول ها در محلول ۸ میکرومولار DCFDA انکوبه شدند و توسط دستگاه فلوسایتومتری Sysmex Partec (Sysmex Europe GmbH, Germany) مورد سنجش قرار گرفتند.

اندازه گیری بقاء سلول ها :

برای انجام این منظور از کیت MTS Cell Proliferation شرکت Abcam (Abcam, UK) استفاده شد. در این روش تترازولیوم توسط سلول زنده برداشته شده و بوسیله آنزیم های NAD(P)H دهیدروژناز به فورمازان تبدیل می شود که در طول موج ۴۹۰-۵۰۰ قابلیت جذب نور دارد. بطور خلاصه، ۳۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ تایی کشت داده شد و پس از رسیدن به اشباع ۸۰-۹۰٪ القاء تمایز از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو انجام شد و سلول ها در روزهای ۹ و ۲۱ با PBS شسته شده و در حضور ۲۰ میکرولیتر از محلول MTS انکوبه شدند. در پایان انکوباسیون، جذب نمونه ها در طول موج ۴۹۰-۵۰۰ نانومتر توسط دستگاه Plate Reader قرائت شد و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت، میزان بقاء سلول ها که با میزان جذب نوری در این طول موج رابطه مستقیم دارد بر حسب Absorbance گزارش شد.

بررسی سنتز گلیکوزآمینوگلیکان ها به روش رنگ آمیزی با سافرانین:

قابلیت سنتز گلیکوزآمینوگلیکان ها که شاخص تمایز سلول ها به کندروسیت می باشد توسط سافرانین که به گلیکوزآمینوگلیکان ها اتصال یافته و به رنگ قرمز در می آید مشخص شد. پس از القاء تمایز در پایان روز بیست و یکم، سلول های تمایز یافته با PBS شسته شده و با هماتوکسیلین Weigert پوشانده شدند. سپس سلول ها با رنگ Fast Green ۲ ٪ پوشیده شده و پس از شستشو در معرض رنگ سافرانین ۰/۵ ٪ قرار گرفتند و زیر میکروسکوپ اینورت مشاهده و تصویربرداری شدند. بمنظور مقایسه مقدار گلیکوزآمینوگلیکان سنتز شده، تصاویر حاصله توسط نرم افزار آنلاین ImageJ (https://imagej.nih.gov/ij/) مورد پردازش قرار

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.22102/22.6.63]

گرفته و نتایج بصورت نیمه کمی بر اساس تعداد پیکسل ها گزارش گردید.

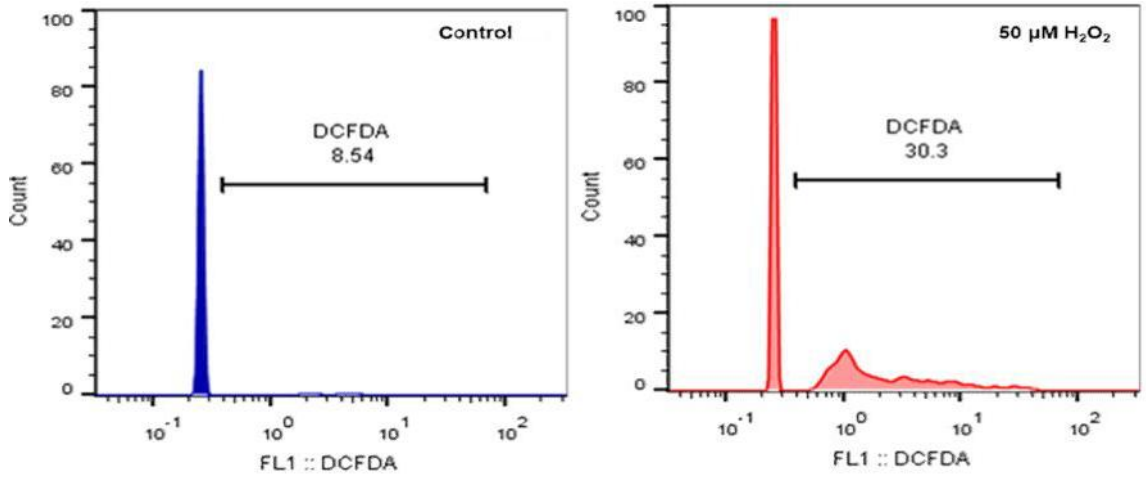
آزمون های آماری:

یافته ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS 21 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و نرم افزار Prism Graph Pad برای رسم نمودار به کار رفت. در این مطالعه داده ها به صورت Mean ± SEM نمایش داده شده اند و p <۰/۰۵ به عنوان تغییر معنی دار در نظر گرفته شد. از تست Shapiro-Wilk جهت بررسی نرمالیتی داده ها استفاده شد. از تست آماری t-test برای مقایسه بین دو گروه استفاده شد. برای مقایسه قبل و بعد از مداخله نیز از تست Pair t-test استفاده شد. کلیه آزمون ها بصورت independent triplicate انجام گرفت به این صورت که اولا" سلول ها در هر دو گروه کنترل و تیمار شده از ۳ اهدا کننده (n=3) مختلف جدا گردیده وکشت داده شدند تا بدین ترتیب اثر تفاوت های بیولوژیکی به حداقل برسد. ثانیا" کلیه مراحل کشت و آزمایشات از ابتدا تا انتها بطور مستقل در زمان متفاوتی تکرار شدند تا از خطاهای تجربی (Experimental) کاسته شود.

یافته ها

سنجش گونه های فعال اکسیژن به روش فلوسایتومتری:

بررسی های فلوسیتومتری بمنظور سنجش ROS نشان داد که بطور میانگین در گروه کنترل ۱/۴±۷/۷ ٪ سلول ها حاوی ROS قابل سنجش بودند در حالیکه در۱±۲۹/۲ ٪ سلول هایی که پراکسید هیدروژن ۵۰ میکرومولار را دریافت کرده بودند وجود ROS مشاهده گردید. در شکل ۱ میزان ROS در نمونه ای از گروه های سلولی تیمار نشده (کنترل) و تیمار شده نشان داده شده است.



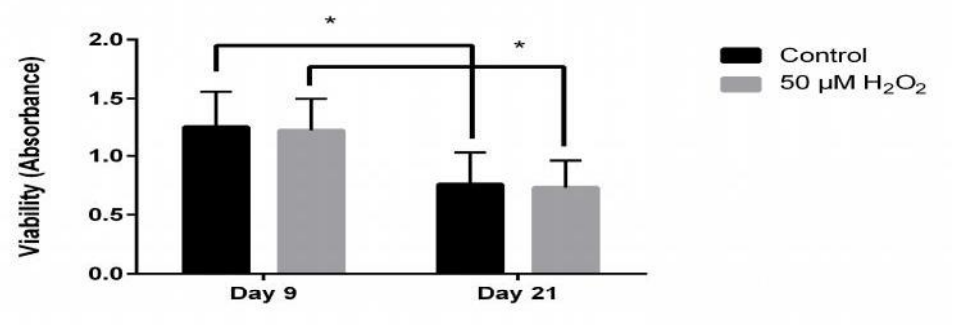
شکل۱- نمونه ای از نتایج اندازه گیری ROS به روش فلوسایتومتری. یک ساعت پس از القاء تمایز با هیدروژن پراکسید ۵۰ میکرومولار، میزان ROS در سلولهای گروه کنترل و گروه تیمار شده سنجیده شد. در نمونه سلول های نشان داده شده در شکل درصد سلول های حاوی رادیکالهای فعال اکسیژنی در گروه کنترل (۸/۵۴ ٪) بدست آمد که کمتر از مقدار متناظر (۳۰/۳ ٪) در گروه تیمار شده بود.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.22102/22.6.63]

اندازه گیری بقاء سلول ها:

تفاوتی در میزان بقاء سلول های کنترل و سلولهای تیمار شده یا H_2O_2 در روز نهم ($p = ۰/۵۹۹$) ویا در روز بیست یکم تمایز ($p = ۰/۴۵۱$) مشاهده نشد (شکل ۲) درحالیکه در هر دو گروه از سلولها اعم از سلول های کنترل و سلولهای تیمار شده، اختلاف معناداری در میزان بقاء سلولی بین روزهای ۹ و ۲۱ وجود داشت ($p < ۰/۰۰۱$) بدین معنی که با افزایش روزهای مواجهه با H_2O_2 میزان بقاء سلولی نیز کاهش یافت.



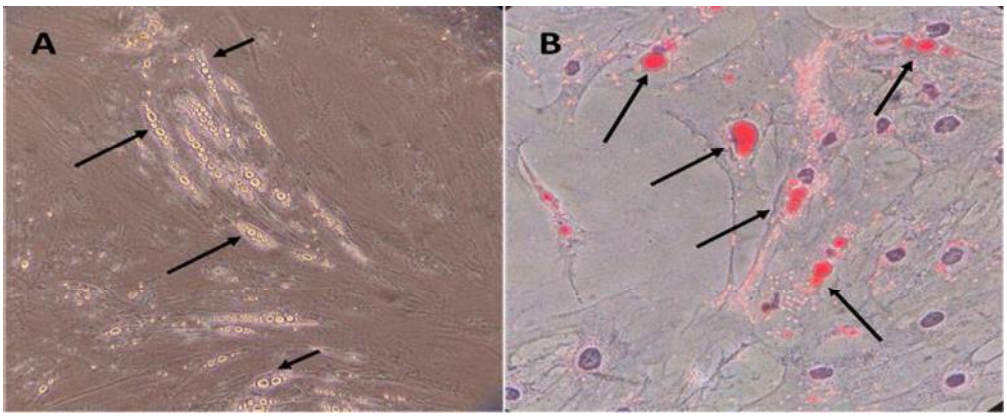
شکل ۲: میزان بقاء سلول ها ۹ و ۲۱ روز پس از القاء تمایز در سلولهای مزانشیمال. سلولهای مزانشیمال جدا شده از بافت چربی شکمی بمدت ۲۱ روز در حضور و یا در غیاب پراکسید هیدروژن کشت داده شدند و میزان بقاء سلولها (در اثر مواجهه با پراکسید هیدروژن) در روزهای ۹ و ۲۱ انکوباسیون مورد بررسی قرار گرفت. نمودار به صورت میانگین Mean±SEM ارائه شده است و علامت * نشان دهنده اختلاف معنی دار ($p < ۰/۰۵$) بین گروه های متناظر می باشد.

رنگ آمیزی Oil Red O:

رنگ آمیزی نشان داد که سلول های بنیادی مزانشیمال انسانی پس از ۱۴ روز به سلولهایی تمایز می یابند که قادر به ذخیره سازی مقدار زیادی چربی در خود می باشند (شکل ۳) بعبارت دیگر ضمن اینکه وجود سلول های بالغ آدیپوسیت حاوی قطرات چربی با رنگ آمیزی Oil Red O نشان داده شد با انجام این آزمون بنیادی بودن سلولهای مزانشیمال اولیه نیز مورد تائید قرار گرفت.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.22102/22.6.63]



شکل ۳- بررسی بنیادی بودن سلولهای مزانشیمال از طریق بررسی قابلیت تمایز آنها به سلول چربی. **(A)** پس از ۱۴ روز القاء تمایز در سلولهای مزانشیمال توسط محیط آدیپوژنز، قطرات چربی بدون رنگ آمیزی در سلولهای تمایز یافته مشاهده شد. **(B)** رنگ آمیزی اختصاصی سلولها با Oil Red O/Hematoxylinنیز وجود قطرات چربی را در درون سلولی تمایز یافته اثبات نمود. (بزرگنمایی ۱۰۰ برابر)

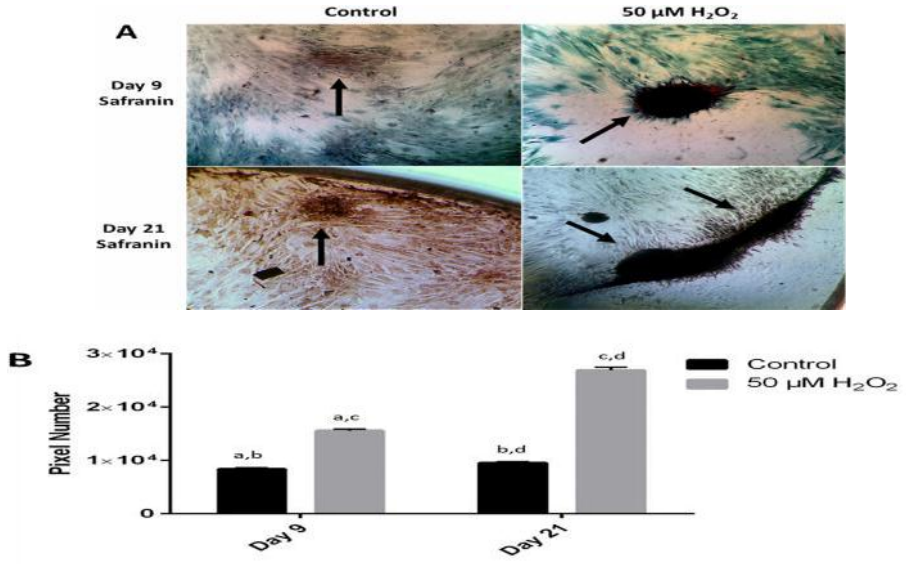
رنگ آمیزی گلیکوزآمینوگلیکان ها:

رنگ آمیزی اختصاصی گلیکوزآمینوگلیکان ها توسط رنگ سافرانین در روزهای ۹ و ۲۱ پس از شروع القاء انجام شد. همانطورکه در شکل A-۴ نشان داده شده است، میزان پلیت (pellet) حاوی گلیکوزآمینوگلیکان ها در سلولهای دریافت کننده پراکسید هیدروژن ۵۰ میکرومولار بطور قابل توجهی بیشتر از مقدار متناظر در سلولهای گروه کنترل بود. این نتیجه در هر دو نوبت روز نهم و بیست و یکم مشهود بود.

علاوه بر این آنالیز نیمه کمی تصاویر نشان داد (شکل B-۴) که مواجهه با H_2O_2 موجب افزایش قابل توجهی در میزان گلیکوزآمینوگلیکان سلول ها نسبت به گروه کنترل چه در روز نهم (کنترل: ۰/۰۹ ± ۰/۹۱×۱۰^{۴} در مقابل درمان: ۰/۱ ± ۱/۵۷×۱۰^{۴}) و چه در روز بیست و یکم (کنترل: ۰/۰۷ ± ۰/۹۶×۱۰^{۴} در مقابل درمان: ۰/۲ ± ۲/۸۷×۱۰^{۴}) گردید. ضمن اینکه میزان گلیکوزآمینوگلیکان سلول ها در هر یک از گروه ها در روز ۲۱ بطور معنی داری بیشتر از مقدار متناظر آن در روز ۹ القاء بود ($p < ۰/۰۵$).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.22102/22.6.63]



شکل ۴: رنگ آمیزی گلیکوزآمینوگلیکان (GAG) **توسط سافرانین.** **(A)** رنگ آمیزی در روزهای ۹ و ۲۱ پس از القاء حاکی از تفاوت قابل توجهی در میزان GAG بین سلول های کنترل و سلول های تیمار شده می باشد. **(B)** آنالیز نیمه کمی تصاویر A–۴ نه تنها حاکی از وجود اختلاف معنی داری در میزان GAG سلولی در بین دو گروه کنترل و تیمار شده در روزهای ۹ و ۲۱ بود بلکه وجود تفاوت قابل ملاحظه ای را در هر گروه بین روزهای ۹ و ۲۱ نشان داد. اختلاف معنی دار در میزان GAG سلولی گروه ها ($p < ۰/۰۵$) با یکی از حروف مشابه a، b، c و یا d نشان داده شده است. (a): اختلاف معنی دار در میزان GAG گروه های کنترل و مداخله در روز ۹، (b): اختلاف معنی دار در میزان GAG گروه کنترل در روزهای ۹ و ۲۱، (c): اختلاف معنی دار در میزان GAG گروه مداخله در روزهای ۹ و ۲۱، (d): اختلاف معنی دار در میزان GAG گروه های کنترل و مداخله در روز ۲۱.

بحث

اگرچه استرس اکسیداتیو و رادیکال های آزاد اکسیژنی بعنوان فاکتورهای مهم دخیل در تخریب غضروف ها طی بیماریهایی مانند استئوآرتریت شناخته شده اند (۱۵) لیکن وجود غلظت های پایینی از مقدار ROS سلولی برای حفظ پرولیفراسیون، تمایز و بقاء سلولی ضروری محسوب می گردد (۹) و بعبارتی دیگر ROS دارای نقش دوگانه ای در غلظت های درون سلولی کم و زیاد می باشد. وجود چنین نقش دوگانه ای ما را بر آن داشت که توانایی شرایط استرس اکسیداتیو ملایم را در القاء تمایز سلول های بنیادی مزانشیمال (MSCs) به کندروسیت بررسی نموده و امکان جبران کندروسیت های از دست رفته در بیماریهای مفصلی را از طریق درمان های احیاء کننده (Regenerative Medicine) نشان دهیم.

در مطالعه حاضر اگرچه در طول دوره ۲۱ روزه کشت سلولها میزان بقاء سلولی بطور معناداری در هر دو گروه تیمار شده و تیمار نشده کاهش یافت لیکن تفاوتی در میزان بقاء و یا مرگ و میر در سلول های مواجهه شده با پراکسید هیدروژن در مقایسه با سلولهای گروه کنترل دیده نشد. بعبارت دیگر غلظت H_2O_2 بکار رفته (۵۰ میکرومولار) برای سلول ها سمی و توکسیک محسوب نگردید. این در حالی است که در مطالعه khan و همکاران که از دوزهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار استفاده شده بود افزایش مرگ و میر سلول ها مشاهده گردید (۱۶). بنظر می رسد که عدم مشابهت نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعه khan و همکاران ناشی از کاربرد غلظت های ۱۰ و ۲۰ برابری پراکسید هیدروژن در مطالعه یاد شده بوده است که بدلیل ایجاد سمیت زیاد موجب افزایش مرگ و میر شده است. علاوه بر این در بررسی سوابق متون شواهدی مبنی بر تغییرات غلظتی H_2O_2 در بیماریها به مقادیری مانند ۵۰۰ و

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.22102/22.6.63]

۱۰۰۰ میکرومولار مشاهده نشد و غلظت ۵۰ میکرومولار مورد استفاده در این مطالعه تناسب بیشتری را با غلظت های پاتولوژیک H_2O_2 در بدن داشته و بنظر می رسد انتخاب آن منطقی بوده است. اگرچه در این مطالعه غلظت انتخابی H_2O_2 تغییر قابل ملاحظه ای را در میزان مرگ و میر سلول ها در مقایسه با مرگ و میر سلول های گروه کنترل (بدون مواجهه با پراکسید هیدروژن) ایجاد نکرد لیکن موجب افزایش قابل توجه میزان گونه های فعال اکسیژن درون سلولی گردید که به نوبه خود موجب القاء تمایز سلولهای بنیادی به کندروسیت ها شدند.

در مطالعه حاضر بررسی های میکروسکوپی حاکی از افزایش گلیکوزآمینوگلیکان ها در سلول های دریافت کننده H_2O_2 نسبت به سلول های گروه کنترل بود که این افزایش میزان GAG در مواجهه با H_2O_2 هم به صورت کیفی در نمای میکروسکوپی و هم در آنالیز نیمه کمی تصاویر حاصله مشهود بود. این یافته نشانگر این واقعیت است که پراکسید هیدروژن قادر است موجب تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمال به کندروسیت گردد که این فرضیه از طریق مشاهده افزایش توانایی سلولهای تیمار شده با H_2O_2 در سنتز GAG به روشنی نشان داده شده است. اگرچه این فرضیه برای اولین بار در این مطالعه مورد بررسی واقع شده و شواهدی بر آن در سوابق متون موجود نیست لیکن پیش از این Ida K با مطالعه بر روی پاتوژنز استئوآرتریت نشان داده بود که سلول ها تلاش دارند که کمبود پروتئوگلیکان غضروف بیماران مبتلا به استئوآرتریت را با تولید حجم بالایی از گلیکوزآمینوگلیکان ها (اگرچه با ساختمان تکامل نیافته و نابالغ) جبران کنند (۱۷). بعبارت دیگر بنظر می رسد که شرایط استرس اکسیداتیو که در بیماری استئوآرتریت ایجاد می شود در مطالعه Ida K خود موجب افزایش سنتز گلیکوزآمینوگلیکان ها از طریق القاء تمایز سلولهای بنیادی گردیده است. بنابراین تصور می شود که سنتز مقادیر بالای گلیکوزآمینوگلیکان مشاهده شده در مطالعه Ida K و مشابهت آن با یافته های بدست آمده از مطالعه حاضر بدین گونه قابل توضیح است که استرس اکسیداتیو ناشی از مواجهه سلول ها با H_2O_2 موجب القاء تمایز سلولهای بنیادی و افزایش سنتز گلیکوزآمینوگلیکان ها می گردد.

با توجه به نتایج مطالعات گذشته بنظر می رسد که با مشاهده القاء پیری در مطالعه Brandl و همکاران (۱۸) و نیز افزایش میزان گلیکوزآمینوگلیکان هایی مانند هیالورونیک اسید در مطالعه Yu CJ و همکاران که هر دو در اثر استرس اکسیداتیو حاصل شده اند (۱۹) می توان نتیجه گرفت که استرس اکسیداتیو منجر به افزایش سرعت بلوغ کندروسیت ها و تولید حجم بالای گلیکوزآمیونوگلیکان ها می شود. در همین راستا مطالعه ما نیز نشان داد که استرس اکسیداتیو قادر است با تمایز سلول های مزانشیمال بافت چربی به کندروسیت ها بر توانایی سنتز گلیکوزآمیونوگلیکان سلولها بیفزاید. اگرچه سلول های مزانشیمال بافت چربی پیش تر در مطالعات گذشته نیز در مواجهه با H_2O_2 قرار گرفته اند (۱۶) لیکن نتایج مطالعه حاضر از آن جهت حائز اهمیت است که در بررسی های گذشته بدلیل کاربرد غلظت های بسیار بالای پراکسید هیدروژن (۵۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرومولار) اثرات H_2O_2 بیشتر از جنبه توکسیکولوژی بر روی سلول ها مورد توجه قرار گرفته است و امکان تعمیم نتایج حاصله به شرایط فیزیولوژیک و حتی شرایط پاتولوژیکی مانند استئوآرتریت، بیماری های قلبی–عروقی و بیماری های مزمن که در آن سطح H_2O_2 تنها به غلظت هایی تا حدود ۵۰ میکرومولار افزایش می یابد وجود ندارد. این در حالی است که مطالعه ما نشان داد بروز شرایط استرس اکسیداتیو و تولید رادیکال های آزاد اکسیژنی و H_2O_2 به هنگام بیماری های مفصلی، اگرچه نوعی پاسخ به بروز بیماری می باشد اما در عین حال می تواند با تاثیر بر کندروسیت ها بر توانایی سنتز گلیکوزآمینوگلیکان آنها افزوده و موجب تسریع بلوغ کندروسیت ها گردد.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.22102/22.6.63]

هر چند در این مطالعه ما بخوبی نشان دادیم که مواجهه سلول های بنیادی مزانشیمال بافت چربی با H_2O_2 موجب القاء تمایز سلول های یاد شده به کندروسیت ها و افزایش سنتز گلیکوزآمیونوگلیکان ها در آنها می گردد لیکن لازم به یادآوری است که سنجش کمی میزان گلیکوزآمیونوگلیکان ها و میزان هیدروکسی پرولین بافتی، بررسی تغییرات در سطح بیان ژن های دخیل در استرس اکسیداتیو، بررسی سیستم دفاع آنتی اکسیدانی و نیز بررسی تغییرات تلومر انتهایی DNA سلولی که بدلیل محدودیت های اعتباری در این پژوهش انجام نشده است می تواند با شناسایی مکانیسم مولکولی اثر H_2O_2 بر سلول های مزانشیمال تا حدودی زیادی ضمن اعتبار بخشی به یافته ها و مشاهدات ما، اطلاعات نوینی را در خصوص نقش دوگانه استرس اکسیداتیو در سلولها آشکار سازد.

نتیجه‌گیری

استرس اکسیداتیو منجر به افزایش سرعت تمایز سلول های بنیادی مزانشیمال به سمت کندروسیت و در کنار آن افزایش GAG در کندروسیت ها می شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از دانشگاه علوم پزشکی همدان بدلیل تامین اعتبار مورد نیاز و از مرکز پژوهش دانشجویان بخاطر حمایت های ارزشمند خود اعلام می دارند. همچنین از مسئولین محترم و کارکنان کلینیک زیبایی ارم (تهران، دهکده المپیک) که محلول لیپوآسپیره بافت چربی زیر جلدی انسانی را برای استفاده در این مطالعه در اختیار محققین قرار دادند تشکر و قدردانی می گردد.

Reference

1.Mow VC, Guo XE. Mechano-electrochemical properties of articular cartilage: their inhomogeneities and anisotropies. Annu Rev Biomed Eng 2002;4:175-209.
2. Plaas AH, West LA, Wong Palms S, Nelson FR. Glycosaminoglycan sulfation in human osteoarthritis. Disease-related alterations at the non-reducing termini of chondroitin and dermatan sulfate. J Biol Chem 1998;273:12642-9.
3. Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. Br Med Bull 2008;87:77-95.
4. Temenoff JS, Mikos AG. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. Biomaterials 2000;21:431-40.
5. Chiang H, Jiang CC. Repair of articular cartilage defects: review and perspectives. J Formos Med Assoc 2009;108:87-101.
6. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. Free Radic Biol Med 2001;30:1191-212.
7. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. Curr Med Chem 2005;12:1161-208.
8. Naveen SV, Ahmad RE, Hui WJ, Suhaeb AM, Murali MR, Shanmugam R, et al. Histology, glycosaminoglycan level and cartilage stiffness in monoiodoacetate-induced osteoarthritis: comparative analysis with anterior cruciate ligament transection in rat model and human osteoarthritis. Int J Med Sci 2014;11:97-105.
9. Denu RA, Hematti P. Effects of Oxidative Stress on Mesenchymal Stem Cell Biology. Oxid Med Cell Longev 2016;2016:2989076.
10. Da Silva ML, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. Stem Cells 2008;26:2287-99.
11. Brighton CT, Hunt RM. Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. J Bone Joint Surg Am 1991;73:832-47.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.22102/22.6.63]

12. Brighton CT, Hunt RM. Early histologic and ultrastructural changes in microvessels of periosteal callus. J Orthop Trauma 1997;11:244-53.
13. Scott MA, Nguyen VT, Levi B, James AW. Current methods of adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. Stem Cells Dev 2011;20:1793-804.
14. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, and Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. Stem Cells 2007;25:2739-49.
15. Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. Joint Bone Spine 2007;74:324-9.
16. Khan IM, Gilbert SJ, Caterson B, Sandell LJ, Archer CW. Oxidative stress induces expression of osteoarthritis markers procollagen IIA and 3B3(-) in adult bovine articular cartilage. Osteoarthritis Cartilage 2008;16:698-707.
17. Ida K. An experimental study on the pathogenesis of osteoarthritis--histological and biochemical changes of proteoglycan in the osteoarthritic cartilage of rabbit in the early stage-- (author's transl). Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi 1979;53:949-62.
18. Brandl A, Hartmann A, Bechmann V, Graf B, Nerlich M, Angele P. Oxidative stress induces senescence in chondrocytes. J Orthop Res 2011;29:1114-20.
19. Yu CJ, Ko CJ, Hsieh CH, Chien CT, Huang LH, Lee CW, et al. Proteomic analysis of osteoarthritic chondrocyte reveals the hyaluronic acid-regulated proteins involved in chondroprotective effect under oxidative stress. J Proteomics 2014;99:40-53.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.22102/22.6.63]