

## Effect of Vaspin on Fatty acids metabolism in steatosis model: comparison between two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) cultures

Alina Abdollahi<sup>1</sup>, Esmael Izadpanah<sup>2</sup>, Zakaria Vahabzadeh<sup>3</sup>, Mohammad Raman Moloudi<sup>4</sup>

1. Ph.D. Candidate of Molecular Medicine, Student Research Committee, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0002-5282-4672

2. Associate Professor of Physiology, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0001-8090-906X

3. Associate Professor of Clinical Biochemistry, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. (Corresponding Author), Tel: +98-87-33664674-8358, Email: zakariav@gmail.com. ORCID ID: 0000-0002-9854-9653

5. Associate Professor of Physiology, Liver & Digestive Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. (Corresponding Author), Tel: +98-87-33664674-8494, Email: x.moloudi@muk.ac.ir. ORCID ID: 0000-0003-2883-5213

### ABSTRACT

**Background and Aim:** Non-alcoholic fatty liver disease, characterized by abnormal fat accumulation in the liver, is associated with obesity and insulin resistance. Vaspin is an adipokine secreted by adipose tissue, and its gene expression increases when insulin sensitivity is reduced. In this study, we made a comparison between 3D and 2D cultures in regard to the effects of vaspin on fatty acid metabolism.

**Materials and Methods:** The steatosis model was induced by oleic and palmitic acid in HepG2 cell line in two- and three-dimensional cultures (collagen gel). Then, the cells were treated with 100 ng/ml vaspin for 24 hours. We used Real time PCR for measurement of the expressions of FABP4, MCAD, FAS and ApoB100 genes.

**Results:** In two- and three-dimensional cultures, we found significant decrease in the expression of FABP4 and FAS genes. There was no significant difference between the expression of these genes in the two- and three-dimensional cultures. We detected significant increase in the expression of MCAD and ApoB100 genes in 2D and 3D cultures. We did not find any significant difference in the expressions of MCAD and ApoB100 genes between two- and three-dimensional cultures.

**Conclusion:** Alteration of the expressions of the genes involved in uptake, lipogenesis, oxidation and secretion of fatty acids occurred in the group treated with vaspin compared to the control group in the 2-D and 3-D cultures. But, we did not find any significant difference in the expressions of these genes between the 2-D and 3-D cultures.

**Keywords:** Collagen, Hep G2 cells, Non-alcoholic fatty liver disease, Lipogenesis

**Received:** April 24, 2021

**Accepted:** Aug 3, 2021

**How to cite the article:** Alina Abdollahi, Esmael Izadpanah, Zakaria Vahabzadeh, Mohammad Raman Moloudi. Effect of Vaspin on Fatty acids metabolism in steatosis model: comparison between two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) cultures. *SJKU*. 2022;27(2):28-37.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

## اثر واسپین بر متابولیسم اسیدهای چرب در مدل سلولی استئاتوز: مقایسه در محیط کشت

### دو بعدی و سه بعدی

آلینا عبدالهی<sup>۱</sup>، اسماعیل ایزدپناه<sup>۲</sup>، ذکریا وهاب زاده<sup>۳</sup>، محمد رمان مولودی<sup>۴</sup>

۱. دانشجوی دکتری پزشکی مولکولی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. کد ارکید: ۵۲۸۲-۴۶۷۲-۰۰۰۲-۰۰۰۰
۲. دانشیار فیزیولوژی، مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. کد ارکید: ۹۰۶-۸۰۹۰-۰۰۰۱-x
۳. دانشیار بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. (نویسنده مسئول) تلفن: ۰۸۷۳۳۶۶۶۶۷۴ داخلی ۸۳۵۸ پست الکترونیکی: zakariav@gmail.com کد ارکید: ۹۶۵۳-۹۸۵۴-۰۰۰۲-۰۰۰۰
۴. دانشیار فیزیولوژی، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. (نویسنده مسئول) تلفن: ۰۸۷۳۳۶۶۶۶۷۴ داخلی ۸۴۹۴ پست الکترونیکی: x.moloudi@muk.ac.ir کد ارکید: ۵۲۱۳-۲۸۸۳-۰۰۰۳-۰۰۰۰

### چکیده

**زمینه و هدف:** بیماری کبد چرب غیر الکلی که با تجمع غیرطبیعی چربی در کبد مشخص می‌شود، با چاقی و مقاومت به انسولین همراه است. واسپین، آدیوکائینی است که توسط بافت چربی ترشح می‌شود و با کاهش حساسیت به انسولین بیان ژن آن افزایش می‌یابد. در این مطالعه، اثر واسپین بر متابولیسم اسیدهای چرب در کشت سه بعدی و دو بعدی بررسی شد.

**مواد و روش‌ها:** مدل استئاتوز به وسیله اولئیک و پالمیتیک اسید در رده سلولی Hep G2 در کشت دو و سه بعدی (کلاژن ژل)، القا شد. سپس سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت با واسپین ۱۰۰ng/ml تیمار شدند. بیان ژن‌های FAS، ApoB100، FABP4 و MCAD توسط روش Real time PCR سنجیده شد.

**یافته‌ها:** در کشت دو و سه بعدی بیان ژن‌های FABP4 و FAS کاهش معنی‌داری را نشان داد. در مقایسه بین بیان این ژن‌ها در کشت دو و سه بعدی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. بیان ژن‌های MCAD و ApoB 100 در کشت دو و سه بعدی، افزایش معنادار داشت. بیان ژن MCAD و ApoB100 در کشت دو و سه بعدی، اختلاف معنی‌دار نبود.

**نتیجه‌گیری:** تیمار واسپین می‌تواند موجب تغییر بیان ژن‌های درگیر در مسیر جذب، لیپوژنز، بتا اکسیداسیون و ترشح اسیدهای چرب نسبت به گروه کنترل در شرایط کشت دو و سه بعدی شود. در حالی که اختلاف بیان این ژن‌ها در کشت دو بعدی نسبت به سه بعدی معنا دار نبود.

**واژه‌های کلیدی:** کلاژن، سلول Hep G2، بیماری کبد چرب غیر الکلی، لیپوژنز

وصول مقاله: ۱۴۰۰/۲/۴ اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۰/۵/۱۲ پذیرش: ۱۴۰۰/۵/۱۲

## مقدمه

کبد چرب (steatosis) عارضه‌ای ناشی از تجمع چربی در کبد بوده و به علت عدم تعادل بین میزان ورودی و خروجی اسیدهای چرب به کبد به وجود می‌آید (۱). این فرآیند در موارد خفیف یا گذرا، برگشت‌پذیر بوده و عارضه جانبی مهمی به دنبال ندارد که به آن بیماری کبد چرب غیرالکلی گفته می‌شود (۲). کبد چرب غیرالکلی به شدت با چاقی، مقاومت به انسولین و دیابت نوع ۲ در ارتباط بوده (۳) به‌طوری‌که تجمع چربی در کبد منجر به تغییر مسیرهای جذب، سنتز، متابولیسم و ترشح اسیدهای چرب آزاد کبدی شده و باعث ایجاد مقاومت به انسولین در کبد و نهایتاً مقاومت محیطی به انسولین می‌شود (۴، ۵). بافت چربی به عنوان یک ارگان اندوکراین با ترشح آدیپوکاین‌ها نقش مهمی در تنظیم انرژی و متابولیسم دارد (۶). واسپین (Vaspin) آدیپوکاینی است که از بافت چربی سفید احشایی و زیرجلدی، کبد، پانکراس، مخاط معده، روده کوچک و چندین ارگان دیگر در انسان و موش ترشح می‌شود (۷-۹). بیان ژن واسپین در اثر کاهش حساسیت به انسولین و همچنین وجود میزان زیاد چربی زیر جلدی که به علت چاقی به وجود می‌آید، افزایش می‌یابد (۱۰). در چاقی و دیابت نوع ۲ سطح بیان ژن واسپین با اثرات جبرانی افزایش یافته، با چاقی و هومئوستاز گلوکز ارتباط دارد (۱۱). در بررسی‌های انجام شده در رابطه با سطح سرمی واسپین و بیماری کبد چرب غیر الکلی، سطوح افزایش یافته واسپین در سرم بیماران Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) و Non-alcoholic Steatohepatitis (NASH) نسبت به گروه کنترل گزارش شده است (۱۲-۱۴). همچنین ارتباط نزدیکی بین واسپین، مقاومت به انسولین، استئاتوز کبدی و پیشرفت فیروز گزارش شده است (۱۵). گرچه مکانیسم‌های مولکولی دخیل در NAFLD به خوبی شناخته نشده‌اند؛ اما در سلول‌های کبدی این فرآیند به ژن‌های مختلفی مربوط

می‌شود که یا از طریق افزایش بیان ژن‌های دخیل در جذب اسیدهای چرب مانند Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4) و یا لیپوژنز اسیدهای چرب مانند Fatty Acid Synthesis (FAS) مرتبط بوده و یا از طریق کاهش بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب مانند Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) و یا کاهش ترشح اسیدهای چرب مانند Apolipoprotein B100 (APOB-100) تجمع و رسوب اسیدهای چرب در سلول‌های کبدی ایجاد می‌شود (۱۶، ۱۷).

امروزه استفاده از کشت سه بعدی به خصوص در مطالعات بنیادی افزایش یافته است و آن‌ها را به ابزارهایی مناسب برای مطالعه بالینی تبدیل کرده است. کشت سه بعدی نسبت به کشت دو بعدی تصویر واقعی‌تری از شرایط سلول‌ها در بافت‌ها و ارگان‌های بدن ارائه می‌کند (۱۸). در کشت دو بعدی سلول‌ها، عملکردهای بیولوژیکی مانند تماس سلول با سلول و سلول با ماتریس خارج سلولی در همه ابعاد مانند بافت‌های بدن وجود ندارد در حالی که در کشت سه بعدی سلول‌ها به یکدیگر متصل شده تشکیل اتصالات طبیعی سلول به سلول و سلول با ماتریکس خارج سلولی می‌دهند و ارتباطات لازم برای عملکرد سلول‌ها نسبت به کشت دوبعدی بیشتر است (۱۹). این تفاوت‌ها منجر به کاهش تمایز و تغییر فعالیت، سلول شده که نهایتاً تغییر در مسیرهای سیگنالینگ و عملکردی سلول‌ها (مانند تولید و ترشح پروتئین‌ها) را به دنبال دارد. کلاژن نوع یک مولکولی با وزن ۳۰۰ کیلو دالتون است که از دو زنجیره آلفا ۱ و ۲ تشکیل شده است که در pH خنثی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، خود به خود یک داربست مارپیچ سه‌گانه به‌صورت ژل تشکیل می‌دهد و باعث حمایت و رشد انواع سلول‌ها (رده‌های سلولی سرطانی، سلول‌های اندوتلیال، کبدی، استئوبلاست‌ها و ... فیبروبلاست‌ها) در کوتاه مدت و بلند مدت می‌شود. این ماده جزء اصلی ساختاری ماتریس‌های خارج سلولی در بافت همبند و اندام‌های داخلی

۲۴ ساعت جهت بررسی بیان ژن مورد ارزیابی قرار گرفتند (۲۳).

القای مدل سلولی کبد چرب

به منظور القای مدل سلولی کبد چرب، پس از اینکه سلول‌های Hep G2 به تراکم صد هزار سلول رسید، سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت فاقد سرم کشت داده شدند. سپس به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار با اولئیک اسید و پالمیتیک اسید به نسبت ۲ به ۱ به غلظت ۱۲۰۰ میکرومولار قرار گرفتند.

بیان ژن

استخراج RNA سلول‌ها طبق دستورالعمل کیت Jena Bioscience (PP-210S) انجام و غلظت RNA هر نمونه با روش اسپکتروفتومتری سنجیده شد. برای سنتز cDNA نیز از کیت (K1621). ThermoScientific طبق پروتکل شرکت سازنده استفاده شد. به منظور انجام Real-Time PCR ترکیب هر نمونه شامل: ۱۰ میکرولیتر سایرگرین، ۰/۵ میکرولیتر Forward Primer، ۰/۵ میکرولیتر Reverse Primer، ۸ میکرولیتر Water RNase free در حجم نهایی هر واکنش ۲۰ میکرولیتر بود. در کنترل منفی تمامی ترکیب بالا به جز cDNA وجود داشت. برای تعیین بیان نسبی به دیگر ژن‌ها ( $\Delta\Delta Ct$ ) سنجیده شد. جدول شماره ۱ توالی پرایمرهایی که در این مطالعه استفاده شده‌اند را نشان می‌دهد.

آزمون آماری

نتایج به دست آمده در این مطالعه بر اساس حداقل سه تکرار استوار بود که به صورت  $Mean \pm SEM$  با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism محاسبه و از آزمون one-way ANOVA استفاده شد و در صورت مشاهده تفاوت در بین گروه‌ها سطح معناداری آن ( $p < 0.05$ ) در نظر گرفته شد.

است (۲۰، ۲۱)؛ لذا در این مطالعه با توجه به وضعیت قرارگیری سلول‌ها در بافت‌های بدن اثر واسپین بر بیان ژن‌های دخیل در فرآیند جذب، ترشح، بتا اکسیداسیون و لیپوژنز اسیدهای چرب در کشت دو بعدی و سه بعدی با استفاده از کلاژن نوع یک مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی تحلیلی از رده سلولی Hep G2 که از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران، خریداری شد استفاده شد. سلول‌ها تحت تأثیر غلظت (۱۰۰ ng/ml) واسپین قرار گرفتند و نتایج در دو پروتکل دو بعدی و سه بعدی با گروه کنترل مقایسه شد.

کشت دو بعدی و سه بعدی سلول

رده سلولی Hep G2 در کشت دو بعدی به صورت تک لایه در محیط کشت DMEM که حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاو و ۱٪ آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین - استرپتومایسین (۱۰۰U/ml) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO<sub>2</sub> کشت داده شد. در کشت سه بعدی سلول‌های Hep G2، ۶۶۰ میکرولیتر از محیط کشت DMEM حاوی ۱×۱۰<sup>۵</sup> سلول را در ۳۳۰ میکرولیتر از کلاژن ژل (۱۰۰ کلاژن نوع I (sigma) و ۳۳ میلی‌لیتر در اسید استیک (۱٪) حل نموده و بلافاصله با اضافه نمودن جزئی و تدریجی NAOH ۱ مولار PH آن به ۷/۴ رسانده شد. محلول حاصل در اسلایدهای ۲۴ خانه از نوع Untreated که مشابه با لام لبه‌دار است، کشت داده شد. بعد از گذشت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق، اسلایدهای Untreated به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل گردید (۲۲). پس از گذشت یک شبانه‌روز و القای مدل استئاتوز، سلول‌ها تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ ng/ml واسپین (SRP4915, sigma) قرار گرفتند و پس از مدت زمان

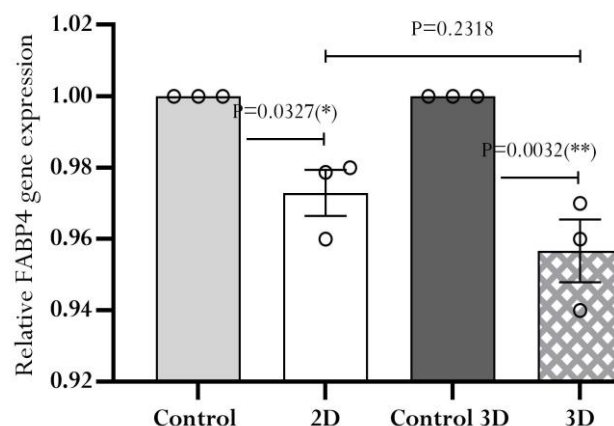
## یافته ها

بررسی بیان ژن FABP4 دخیل در مسیر جذب اسیدهای چرب نشان داد که تیمار سلول‌های Hep G2 با اولتیک و پالمیتیک اسید به نسبت ۲ به ۱ با غلظت ۱۲۰۰ میکرومولار و سپس تیمار سلول‌ها با واسپین در غلظت ۱۰۰ ng/ml، باعث کاهش بیان معنی‌دار آن در کشت دو بعدی شد

( $P=0.0327$ ). در کشت سه بعدی نیز کاهش بیان این ژن با اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. ( $P=0.0032$ ) مقایسه بیان این ژن در کشت دو بعدی و سه‌بعدی اختلاف معنی‌دار نداشت ( $P<0.2318$ ). نمودار ۱

جدول ۱: توالی پرایمرهای استفاده شده

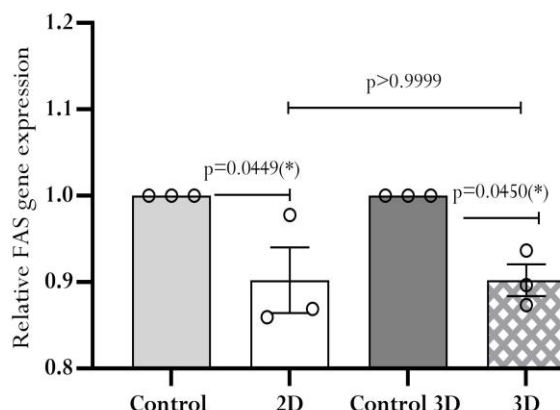
Gene	Accession numbers	Primer sequence	Length (bp)
ApoB100	NM_000384.3	F:CTCAGTGGAGGCAACACATTAC R: GCTGGCGTTGGAGTAAGC	150
FABP4	NM_001442.3	F:GCAGCTTCCTTCTCACCTTG R: GCCCACTCCTACTTCTTTC	127
ACADM	NM_001286044.2	F:CGGAAAGCTACTTGTAGAGCAC R:CCATTGCCTCCAAGTATCTGC	213
FAS	NM_004104.5	F:CAAGTGGCTGACGTGGTG R:CGTGTGGGGAGTGAAGCA	150
GAPDH	NM_008084	F:5'-CCATCCGGGTTCTATAAAAT-3' R:5'-AATCTCCACTTTGCCACTG-3'	198



نمودار ۱. میزان بیان نسبی ژن FABP4 در سلول‌های Hep G2 (چرب شده با اسیدهای چرب پالمیتیک و اولتیک) تیمار شده با واسپین ۱۰۰ ng/ml در مقایسه با گروه کنترل در محیط کشت دو بعدی (2D) و سه بعدی

نتایج آنالیز کمی بیان ژن FAS که در مسیر لیپوژنز اسیدهای چرب نقش دارد، نشان داد که تیمار با غلظت ۱۰۰ ng/ml واسپین پس از القای مدل استئاتوز در سلول‌های Hep G2 باعث کاهش معنی‌دار بیان این ژن در کشت دو بعدی شد ( $P=0.0449$ ). همچنین در کشت

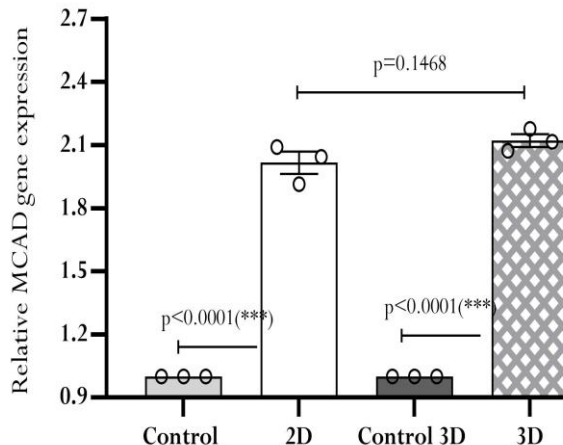
سه‌بعدی نیز نسبت به گروه کنترل، بیان ژن کاهش معنی‌دار داشت ( $P=0.0450$ ). اختلاف میزان تغییر بیان ژن FAS در کشت دو بعدی نسبت به کشت سه بعدی معنی‌دار نبود ( $P>0.9999$ ). نمودار ۲



نمودار ۲. میزان بیان نسی ژن FAS در سلول‌های Hep G2 (چرب شده با اسیدهای چرب پالمیتیک و اولئیک) تیمار شده با واسپین ۱۰۰ ng/ml در مقایسه با گروه کنترل در محیط کشت دو بعدی (2D) و سه بعدی (3D)

دو بعدی و هم در کشت سه بعدی، نسبت به گروه کنترل افزایش بیان معنی‌دار داشت ( $P < 0.0001$ ). در مقایسه بین کشت دو بعدی و کشت سه بعدی، بیان ژن MCAD اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $p < 0.1468$ ). نمودار ۳

همچنین بیان ژن MCAD که در مسیر بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب نقش دارد، در سلول‌های Hep G2 با پالمیتات و اولئات چرب شده و تحت تیمار با واسپین MCAD (۱۰۰ ng/ml) قرار گرفتند، هم در شرایط کشت

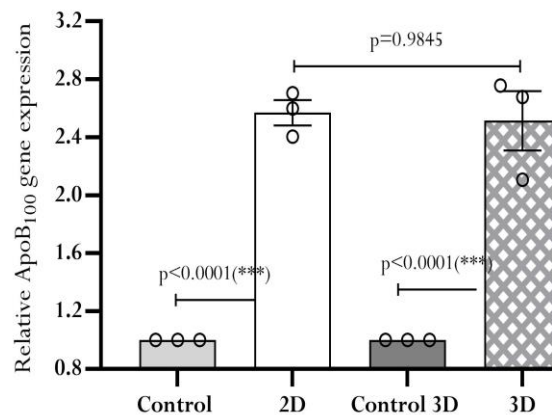


نمودار ۳. میزان بیان نسی ژن MCAD در سلول‌های Hep G2 (چرب شده با اسیدهای چرب پالمیتیک و اولئیک) تیمار شده با واسپین ۱۰۰ ng/ml در مقایسه با گروه کنترل در محیط کشت دو بعدی (2D) و سه بعدی (3D)

نسبت به گروه کنترل داشت ( $P < 0.0001$ ) همچنین در کشت سه بعدی نیز افزایش بیان معنی‌دار آن پس از تیمار با واسپین مشاهده شد ( $P < 0.0001$ ). اختلاف معنی‌داری در

در کشت دو بعدی ژن ApoB 100 که در مسیر ترشح اسیدهای چرب نقش دارد، در اثر تیمار سلول‌ها Hep G2 چرب شده با واسپین (۱۰۰ ng/ml) افزایش معنی‌داری

مقایسه میزان بیان ژن ApoB 100 در سیستم کشت دو بعدی و سه بعدی وجود ندارد ( $P=0.984$ ). نمودار ۴



نمودار ۴. میزان بیان نسبی ژن ApoB 100 در سلول‌های Hep G2 (چرب شده با اسیدهای چرب پالمیتیک و اولئیک) تیمار شده با واسپین ۱۰۰ ng/ml در مقایسه با گروه کنترل در محیط کشت دو بعدی (2D) و سه بعدی

## بحث

نتایج مطالعه نشان داد که آدیپوکاین واسپین از طریق کاهش بیان ژن FABP4 و FAS باعث کاهش جذب اسیدهای چرب و لیپوژنز می‌شود. همچنین واسپین نسبت به گروه کنترل با افزایش بیان ژن MCAD و APOB100 باعث افزایش روند بتا اکسیداسیون و ترشح اسیدهای چرب شد. تیمار سلول‌ها در محیط کشت دو بعدی و سه بعدی (کلاژن ژل) صورت گرفت و بیان ژن‌های مذکور مورد بررسی قرار گرفت و بیان این ژن‌ها در این دو محیط تفاوت معنی داری نداشت.

گزارش شده است که واسپین آدیپوکاین تنظیم‌کننده متابولیسم ذخیره چربی در بدن بوده (۲۴) و باعث تحمل گلوکز و بهبود حساسیت به انسولین در موش‌های چاق می‌شود (۲۵). هرچند که به واسپین آدیپوکاین «خوب» اطلاق شده است، با این وجود

گزارش‌هایی منتشر شده اند که سطح آن در افراد چاق مبتلا به دیابت به طور متناقضی افزایش یافته بود (۲۶). این احتمال وجود دارد که القای بیان واسپین یک اثر جبرانی در چاقی، مقاومت به انسولین یا بیماری‌های متابولیک باشد. در برخی از مطالعات غلظت واسپین در سندرم متابولیک (MS) بیشتر

بود (۲۷)؛ اما در برخی دیگر تغییر نکرده و یا حتی کمتر بود (۲۸). نتایج این مطالعه به صورت واضح نشان می‌دهد که واسپین در فرآیند مسیرهای متابولیکی با تحریک بتا اکسیداسیون و مهار لیپوژنز تا حد زیادی نقش محافظتی دارد. در رابطه با معنی دار نبودن نتایج کشت سه بعدی نسبت به کشت دو بعدی می‌توان گفت که در مطالعات کبدی کشت اولیه سلول‌های کبدی در اولویت است؛ اما به دلیل کمبود نمونه‌های کبدی انسان، طول عمر کوتاه، اختلافات فردی بین اهداکنندگان و همچنین هزینه‌های زیاد استفاده از آن بسیار محدود است (۲۹). روش‌های کشت سلولی سه بعدی این امکان را به وجود آورده که پاسخ‌هایی را که محققان نتوانسته‌اند با استفاده از تکنیک‌های کشت سلول دو بعدی کشف کنند، تا حدی پاسخگو باشد. اگرچه از برخی جهات کشت سه بعدی نسبت به کشت دو بعدی سودمند است؛ اما هزینه بالاتر و قابلیت تکرارپذیری ساخت محیط‌های کشت سه بعدی دشوار است (۳۰). علاوه بر این، ماتریکس‌های استفاده در سیستم کشت سه بعدی متفاوت بوده و همخوانی کاملی با ساختار ماتریکس خارج سلولی در بافت‌ها ندارد (۳۱). شاید یکی از عوامل معنی دار نبودن نتایج کشت دو بعدی و سه بعدی در این مطالعه مدت زمان

سلول‌ها در نقاط مختلف داربست سلولی منجر به پاسخ‌های متفاوت در بیان ژنی در اثر تیمار سلول‌ها می‌شود (۳۵).

### نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که در بازه زمانی ۲۴ ساعته تیمار واسپین، علی‌رغم تغییرات معنی‌دار بیان ژن‌های مورد مطالعه در محیط دو بعدی و سه بعدی نسبت به گروه‌های کنترل تیمار نشده با واسپین، اما بیان ژن‌های مورد مطالعه تیمار شده با واسپین در محیط دو بعدی در مقایسه با محیط سه بعدی تفاوت معنی‌داری نشان نداد. یکی از دلایل احتمالی تعیین‌کننده عدم تفاوت ممکن است مدت‌زمان تیمار با واسپین باشد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی، مراکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی و گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی کردستان جهت تأیید و تصویب و اجرای این مطالعه تشکر و قدردانی می‌نمایند. این مطالعه قسمتی از پایان‌نامه دکترای بوده که با کد اخلاق IR.MUK.REC.1397/46 ثبت گردیده است. مطالعه در سال ۱۳۹۸ در آزمایشگاه مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی انجام شد. هیچ‌کدام از نویسندگان این مقاله تعارض منافع برای انتشار آن ندارند.

محدود ۲۴ ساعت تیمار در داربست کلاژنی باشد. در این رابطه Claudia و همکاران با مقایسه داده‌هایی که از کشت سلول‌های سه بعدی (کلاژن ژل) و سلول‌های Hep G2 با کشت دو بعدی انجام دادند، گزارش نمودند که ترشح آلبومین، بیان ژن آنزیم‌های متابولیزه‌کننده زنبیوتیک و همچنین فعالیت‌های CYP افزایش بیشتری دارند؛ اما این افزایش ظرفیت متابولیکی سلول‌ها به احتمال زیاد در اثر کشت سه بعدی نیست بلکه نتیجه‌ای از کشت طولانی مدت سلول‌های Hep G2 است. چرا که سلول‌های کشت دو بعدی با تمایز جزئی دچار پیری شود، باید در نظر داشت که هزینه‌های نسبتاً زیاد مواد کشت سه بعدی لزوماً منعکس‌کننده بهبود عملکرد کبدی سلول‌های Hep G2 در کشت سه بعدی نسبت به کشت دو بعدی نیست (۳۲).

علی‌رغم مزایای فراوان کشت سه بعدی نسبت به کشت‌های دو بعدی، محدودیت‌هایی در استفاده از کشت سلول سه بعدی وجود دارد. به عنوان مثال، عدم استاندارد سازی پروتکل‌های کشت سلولی غالباً منجر به تغییراتی در ساختار و ترکیب داربست سه بعدی ساخته شده، می‌شود که همگی به شدت بر نتیجه تحویل دارو تأثیر می‌گذارند (۳۳). توجه به این نکته مهم است که روش کشت انتخاب شده به طور قابل توجهی بر ویژگی‌های مکانیسمی و عملکردی سلول‌ها تأثیرگذار است که ممکن است رفتار آن‌ها را تغییر دهد (۳۴). علاوه بر تغییرات ساختاری، وضعیت قرارگیری

### منابع

1. Bradbury MW. Lipid metabolism and liver inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290(2):G194-G8.
2. Mulhall BP, Ong JP, Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview. *JGH*. 2002;17(11):1136-43.
3. Kotronen A, Yki-Järvinen H. Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. *ATVB*. 2008;28(1):27-38.
4. Gastaldelli A, Cusi K, Pettiti M, Hardies J, Miyazaki Y, Berria R, et al. Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects. *AJG*. 2007;133(2):496-506.



- 5.Holland WL, Brozinick JT, Wang L-P, Hawkins ED, Sargent KM, Liu Y, et al. Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab.* 2007;5(3):167-79.
- 6.Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature.* 2006;444(7121):847-53.
- 7.Lai X, Zhang C, Wang J, Wang C, Lan X, Zhang C, et al. mRNA expression pattern and association study with growth traits of bovine vaspin gene. *Mol Biol Rep* 2013;40(7):4499-505.
- 8.Klötting N, Kovacs P, Kern M, Heiker J, Fasshauer M, Schön M, et al. Central vaspin administration acutely reduces food intake and has sustained blood glucose-lowering effects. *Diabetologia.* 2011;54(7):1819-23.
- 9.Klötting N, Berndt J, Kralisch S, Kovacs P, Fasshauer M, Schön MR, et al. Vaspin gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;339(1):430-6.
- 10.Wada J. Vaspin: a novel serpin with insulin-sensitizing effects. *Expert Opin Investig Drugs.* 2008;17(3):327-33.
- 11.Dimova R, Tankova T. The role of vaspin in the development of metabolic and glucose tolerance disorders and atherosclerosis. *Biomed Med Res Int* 2015; 2015:823481.
- 12.Yilmaz Y, Kurt R, Gurdal A, Alahdab YO, Yonal O, Senates E, et al. Circulating vaspin levels and epicardial adipose tissue thickness are associated with impaired coronary flow reserve in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis.* 2011;217(1):125-9.
- 13.Aktas B, Yilmaz Y, Eren F, Yonal O, Kurt R, Alahdab YO, et al. Serum levels of vaspin, obestatin, and apelin-36 in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism.* 2011;60(4):544-9.
- 14.Genc H, Dogru T, Tapan S, Kara M, Ercin CN, Aslan F, et al. Circulating vaspin and its relationship with insulin sensitivity, adiponectin, and liver histology in subjects with non-alcoholic steatohepatitis. *Scand J Gastroenterol.* 2011;46(11):1355-61.
- 15.Carter-Kent C, Zein NN, Feldstein AE. Cytokines in the pathogenesis of fatty liver and disease progression to steatohepatitis: implications for treatment. *AJG.* 2008;103(4):1036-42.
- 16.Gao Y, Zhang S, Li J, Zhao J, Xiao Q ,Zhu Y, et al. Effect and mechanism of ginsenoside Rg1-regulating hepatic steatosis in HepG2 cells induced by free fatty acid. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2020;84(11):2228-40.
- 17.Chen H. Nutrient mTORC1 signaling contributes to hepatic lipid metabolism in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Res.* 2020;4(1):15-22.
- 18.Griffith LG, Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006;7(3):211-24.
- 19.Rangarajan A, Hong SJ, Gifford A, Weinberg RA. Species-and cell type-specific requirements for cellular transformation. *Cancer Cell Int.* 2004;6(2):171-83.
- 20.Dooley S, Hamzavi J, Ciuculan L, Godoy P, Ilkavets I, Ehnert S, et al. Hepatocyte-specific Smad7 expression attenuates TGF- $\beta$ -mediated fibrogenesis and protects against liver damage. *Gastroenterology.* 2008;135(2):642-59. e46.
- 21.Debnath J, Brugge JS. Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(9):675-88.
- 22.Ngo P, Ramalingam P, Phillips JA, Furuta GT. Collagen gel contraction assay. *Cell-Cell Interactions.* 2006:103-9.
- 23.Phalitakul S, Okada M, Hara Y, Yamawaki H. Vaspin prevents TNF- $\alpha$ -induced intracellular adhesion molecule-1 via inhibiting reactive oxygen species-dependent NF- $\kappa$ B

- and PKC $\theta$  activation in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Res.* 2011;64(5):493-500.
- 24.Kukla M, Mazur W, Bułdak RJ, Żwirska-Korczala K. Potential role of leptin, adiponectin and three novel adipokines—visfatin, chemerin and vaspin—in chronic hepatitis. *J Mol Med (Berl)*. 2011;17(11):1397-410.
- 25.Rabe K, Lehrke M, Parhofer KG, Broedl UC. Adipokines and insulin resistance. *J Mol Med (Berl)*. 2008;14(11):741-51.
- 26.Choi SH, Hong ES, Lim S. Clinical implications of adipocytokines and newly emerging metabolic factors with relation to insulin resistance and cardiovascular health. *Front Endocrinol.* 2013;4:97.
- 27.Choi SH, Kwak SH, Lee Y, Moon MK, Lim S, Park YJ, et al. Plasma vaspin concentrations are elevated in metabolic syndrome in men and are correlated with coronary atherosclerosis in women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;75(5):628-35.
- 28.Kim JM, Kim TN, Won JC. Association between serum vaspin level and metabolic syndrome in healthy Korean subjects. *Metab Syndr Relat Disord.* 2013;11(6):385-91.
- 29.Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, Andersen ME, Ansari N, Bhattacharya S, et al. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol.* 2013;87(8):1315-530.
- 30.Sarkar C, Mondal M, Torequl Islam M, Martorell M, Docea AO, Maroyi A, et al. Potential therapeutic options for COVID-19: current status, challenges, and future perspectives. *Front Pharmacol.* 2020 15;11:1428.
- 31.Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *Int J Mol Sci.* 2015;16(3):5517-27.
- 32.Luckert C, Schulz C, Lehmann N, Thomas M, Hofmann U, Hammad S, et al. Comparative analysis of 3D culture methods on human HepG2 cells. *Arch Toxicol.* 2017;91(1):393-406.
- 33.Hoffmann OI, Ilmberger C, Magosch S, Joka M, Jauch K-W, Mayer B. Impact of the spheroid model complexity on drug response. *J. Biotechnol.* 2015;205:14-23.
- 34.Härmä V, Schukov H-P, Happonen A, Ahonen I, Virtanen J, Siitari H, et al. Quantification of dynamic morphological drug responses in 3D organotypic cell cultures by automated image analysis. *PLoS One.* 2014;9(5):e96426.
- 35.Zanoni M, Piccinini F, Arienti C, Zamagni A, Santi S, Polico R, et al. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Sci. Rep.* 2016;6(1):1-11.