

مقایسه بیان ژن آگریکان در کندروژنز سلول‌های بنیادی مشتق از چربی در دو سیستم کشت Pellet و Micromass

چکیده

دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۱۴ ویرایش: ۱۳۹۷/۰۴/۲۱ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۲/۱۶ آنلاین: ۱۳۹۷/۰۲/۲۴

مهتاب تیموری^۱

بتول هاشمی‌بنی^{۲*}

محمد مردانی^۲

۱- گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۲- گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

زمینه و هدف: امروزه سلول‌های بنیادی مشتق از چربی (ADSC) به دلیل خصوصیات منحصر به فرد مانند راحتی و عدم استفاده از روش‌های تهاجمی حین استخراج به‌طور گسترده در مهندسی بافت استفاده می‌شوند. به منظور افزایش تعاملات بین سلولی مشابه با تراکم‌های پیش غضروفی جنینی، استفاده از سیستم‌های کشت سه بعدی همچون Pellet و Micromass ضروری می‌باشد. آگریکان یکی از مهمترین اجزای ماتریکس خارج سلولی است، بنابراین در مطالعه حاضر بیان آگریکان در طی روند کندروژنز ADSC های انسانی در دو سیستم کشت Pellet و Micromass بررسی شد.

روش بررسی: این مطالعه تجربی در گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان از فروردین ۱۳۹۲ تا بهمن ماه ۱۳۹۳ انجام شد. بافت چربی شکمی از سه بیمار در طی جراحی لیپوساکشن جدا شد. سلول‌های بنیادی با روش‌های مکانیکی و آنزیمی استخراج و در کشت تک لایه کشت داده شدند. سپس به منظور القای روند کندروژنز، تعداد 5×10^5 سلول‌های پاساژ سوم (P3) به سیستم‌های کشت Pellet و Micromass حاوی مدیوم کندروژنیک در گروه‌های آزمایش ۷ و ۱۴ روز منتقل شدند. ارزیابی بیان ژن آگریکان توسط تکنیک Real-time PCR انجام شد.

یافته‌ها: بررسی نتایج Real-time PCR نشان داد که بیان آگریکان در Micromass روز ۱۴ در مقایسه با Pellet روزهای ۷ و ۱۴ افزایش معناداری دارد ($P=0/008$). همچنین بیان آگریکان در Micromass روز هفتم در مقایسه با Pellet روز هفتم نیز افزایش معناداری نشان داد ($P=0/03$).

نتیجه‌گیری: با توجه به بیان بالای ژن آگریکان در سیستم کشت Micromass نسبت به کشت Pellet شاید بتوان نتیجه گرفت که کشت Micromass در مقایسه با کشت Pellet کارایی بیشتری در بیان ژن آگریکان در کندروژنز سلول‌های بنیادی مشتق از چربی داشته است.

کلمات کلیدی: کندروژنز، آگریکان، کشت Micromass, Pellet

* نویسنده مسئول: اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی.
تلفن: ۰۳۱-۳۷۹۲۹۱۵۳
E-mail: hashemibeni@med.mui.ac.ir

مقدمه

استخوان، پروست، بندناف و بافت چربی مشخص شده است.^{۱-۳} در سال‌های اخیر سلول‌های بنیادی مشتق از چربی (Adipose tissue-derived stem cell, ADSC) به دلیل پتانسیل بالا برای تمایز به انواع رده‌های سلولی، سهولت حین استخراج و حفظ توان تمایزی در انواع محیط‌های کشت و داربست‌ها کاربرد گسترده‌ای پیدا کرده‌اند.^۴ از آنجایی‌که در کشت تک لایه، کندروسیت‌ها دستخوش فرآیند

امروزه مهندسی بافت یک روش درمانی جایگزین مناسب برای ترمیم بافت غضروف مفصلی است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی به عنوان منبع سلولی مناسب در مهندسی بافت غضروف شناخته شده‌اند. تاکنون روند کندروژنز سلول‌های بنیادی مشتق از مغز

در حین جراحی لیپوساکشن از بیمارستان الزهرا اصفهان برداشته شد. سپس نمونه‌ها در محلول PBS (Sigma, USA) به حجم ۱۵-۱۰ ml به آزمایشگاه کشت سلول گروه علوم تشریحی دانشکده پزشکی اصفهان منتقل گردید. پس از وزن کردن نمونه‌ها، تحت شرایط استریل در زیر هود لامینار کلاس II بافت چربی با اسکالپل به قطعات چند میلی‌متری بریده شد و بافت همبند و عروق خونی از آن جدا گردید.

جهت تجزیه بافت، محلول آنزیم کلاژناز نوع I A (Sigma, USA) به میزان ۱/۵ میلی‌گرم به ازای هر گرم بافت چربی به‌کار گرفته شد. سپس نمونه‌ها در دمای 37°C به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه گردید. پس از اطمینان از تجزیه شدن کامل بافت، هم حجم محلول آنزیم به‌کار رفته محیط کشت DMEM low glucose (Gibco, USA) حاوی FBS 10% (Invitrogen, USA) و penicillin/streptomycin (Gibco, USA) و 1% جهت خنثی کردن فعالیت آنزیم به سوسپانسیون سلولی اضافه گردید.

در ادامه سوسپانسیون سلولی در لوله‌های فالكون ۱۵ ml با دور ۱۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی همراه با سلول‌های چربی تخلیه گردید. به رسوب سلولی حاصله محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) low glucose (Gibco, USA)+FBS 10% (Invitrogen USA) و 1% penicillin/streptomycin (Gibco, USA) افزوده شد و در مرحله پایانی سلول‌ها در فلاسک 25 cm^2 کشت شدند و به انکوباتور با دمای 37°C ، با CO_2 و رطوبت نسبی ۵٪ منتقل شدند.^{۱۶} جهت کشت سلول‌ها در سیستم کشت Pellet ابتدا سلول‌های بنیادی پاساژ سوم را ترپسیسینه و با محلول Phosphate buffered saline, PBS (Sigma, USA) شستشو داده و پس از سانتریفیوژ و شمارش تعداد 5×10^5 سلول به لوله‌های فالكون پلی‌پروپیلن ۱۵ ml انتقال داده شدند و با دور 1500 rpm به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی با دقت و بدون به هم ریختن ساختار توده سلولی تشکیل شده در کف فالكون برداشته شد و ۱ cc مدیوم کندروژنیک DMEM high glucose (Gibco, USA)+Penicilin/streptomycine 1%+ITS (6.25 $\mu\text{g/ml}$ bovine insulin, 6.25 $\mu\text{g/ml}$ transferrin, 6.25 $\mu\text{g/ml}$ selenous acid) +Ascorbate 2phosphate 50 $\mu\text{g/ml}$ +dexamethason 10^{-7}M +Linoleic Acid 5 $\mu\text{g/ml}$ +TGF- β 3 10 ng/ml) اضافه گردید. با دور ۱۵۰۰ به مدت پنج دقیقه دیگر

تمایززدایی شده و مورفولوژی غضروف فیبری را به دست می‌آورند. به منظور تولید غضروف مناسب و دارای عملکرد باید از تمایززدایی کندروسیت‌ها جلوگیری شود.^۶ همچنین با توجه به ضرورت تعاملات سلول-سلول، تراکم سلولی بالا که یکی از نیازهای اساسی برای حفظ فنوتیپ کندروسیت‌ها می‌باشد، باید با استفاده از سیستم‌های سه بعدی ایجاد شود که شامل سیستم‌های وابسته به داربست مانند آلژینات و ژل کلاژن و سیستم‌های بدون داربست همچون Pellet و Micromass می‌باشد.^{۱۱-۷} سیستم کشت Pellet که به وسیله سانتریفیوژ کردن سلول‌ها دانسیته بالایی از آنها شکل می‌گیرد به‌طور گسترده برای ارزیابی توان کندروژنیک Human mesenchymal stem cells (hMSCs) و مسیرهای سیگنالی درگیر در کندروژنز مورد استفاده قرار می‌گیرد. این سیستم سه بعدی به سلول‌ها اجازه تعاملات سلول-سلول مشابه با آنچه در تراکم‌های پیش غضروفی در طی رشد و نمو جنینی دیده می‌شود را می‌دهد. همچنین فنوتیپ کندروسیت‌ها در این سیستم به دلیل جلوگیری از تمایززدایی کندروسیت‌ها حفظ می‌شود و بافت غضروفی بدون استفاده از مواد اضافی مانند داربست‌های حمایتی یا ژل‌ها که امکان ایجاد عوارضی مثل پاسخ‌های التهابی-ایمنی را دارند ساخته می‌شود.^{۱۳ و ۱۲} سیستم کشت دیگر Micromass است که در ابتدا برای مطالعه رشد و نمو اسکلت درون غضروفی با استفاده از MSCs جوانه جنینی اندام جوجه استفاده شد.^{۱۴} به‌تازگی این روش برای القای کندروژنز MSCs های بالغ روشی مناسب تشخیص داده شده است. در این سیستم کشت سلول‌ها با غلظت بالا به‌صورت قطره‌هایی در چاهک‌های پلیت کشت داده می‌شوند. در نتیجه این توده سلولی فضای سه بعدی مطلوب برای سلول‌ها ایجاد می‌شود که به‌دنبال آن تماس سلول-سلول افزایش پیدا می‌کند.^{۱۵} هدف از انجام مطالعه مقایسه بیان ژن آگریکان در کندروژنز سلول‌های بنیادی مشتق از چربی در دو سیستم کشت Pellet و Micromass بود.

روش بررسی

این مطالعه تجربی در گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شد. در ابتدا نمونه بافت چربی به صورت تصادفی با دریافت رضایت کتبی از سه بیمار با میانگین سنی ۳۵ سال

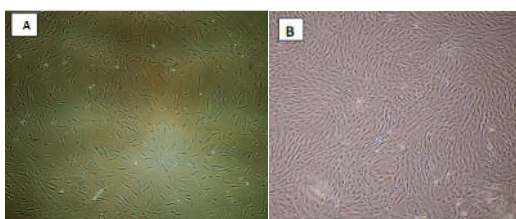
جدول ۱: پرایمرهای به کار رفته در تکنیک Real-time PCR

Gene	Primer sequences	(Size, Base pair)
Aggrecan-F	GTGGGACTGAAGTTCTTG	130
Aggrecan-R	GTGTGCATGGTCTGAAGT	
GAPDH-F	AAGCTCATTTCCTGGTAT	125
GAPDH-R	CTTCCTCTGTGCTCTTG	

برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها از روش Kolmogorov-Smirnov و برای آنالیز داده‌ها از روش ANOVA (One-way analysis of variance, ANOVA) SPSS software, version 19 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) استفاده گردید. $P \leq 0.05$ معنادار تلقی شد.

یافته‌ها

سلول‌های بنیادی حاصل از بافت چربی در کشت تک لایه در زیر میکروسکوپ اینورت به شکل چند وجهی، ستاره‌ای و دوکی با زوائد سیتوپلاسمی کوتاه و اندک مشاهده شدند (شکل ۱). سلول‌های بنیادی در حال تمایز در سیستم کشت سه بعدی Pellet و Micromass به ترتیب به شکل یک توده کروی و سفید رنگ در ته لوله فالکون و کف پلیت مشاهده می‌شوند (شکل ۲). بررسی نتایج به‌دست آمده از تکنیک Real-time PCR نشان داد که میزان بیان ژن آگریکان در گروه Micromass روز ۱۴ ($3/0 \pm 98/59$) در مقایسه با گروه Pellet روز ۱۴ ($2/24 \pm 0/20$) افزایش معناداری نشان داد ($P=0/008$). بیان آگریکان در گروه Micromass روز ۱۴ ($3/0 \pm 98/59$)



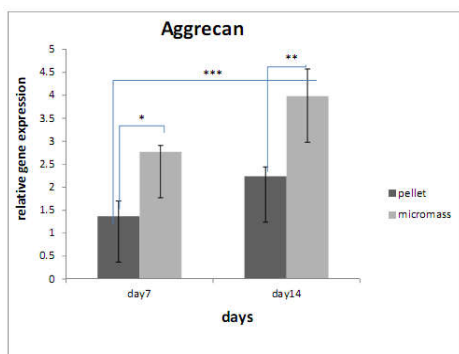
شکل ۱: تصویر میکروسکوپ اینورت از سلول‌های بنیادی مشتق از چربی در کشت لایه‌ای A: سلول‌ها در پاساژ اول، B: سلول‌ها در پاساژ سوم $\times 40$

سانتریفیوژ شد تا توده سلولی در کف لوله فالکون ایجاد شود. سپس فالکون‌های حاوی توده‌های سلولی به انکوباتور با دمای $37^{\circ}C$ و میزان CO_2 و رطوبت نسبی ۵٪ منتقل گردیدند. سلول‌ها در طی روزهای دوم و سوم به صورت یک توده از کف فالکون جدا شدند. برای تبادل گازها، درب لوله‌ها نیمه باز گذاشته شد. مدیوم هر سه روز یک بار تعویض شد. سپس در روزهای ۷ و ۱۴ نمونه‌ها برای بررسی Real-time PCR برداشته شدند.^{۱۶}

به‌منظور کشت سلول‌ها در سیستم کشت Micromass ابتدا سلول‌های بنیادی پاساژ سوم ترپسینه شدند و پس از خشتی کردن با محلول PBS (Sigma, USA) شستشو داده شدند. سپس در دور ۱۵۰۰ به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از آن شمارش سلولی انجام شد و تعداد 5×10^5 سلول در هر فالکون برای انتقال به پلیت ۲۴ خانه‌ای دوباره سانتریفیوژ شدند و پس از تخلیه مایع رویی $12/5 \mu l$ مدیوم کندروژنیک مشابه با مدیوم به‌کار رفته در کشت Pellet به هر فالکون حاوی سلول اضافه شد. پس از آن محتویات هر فالکون به صورت یک قطره سوسپانسیون سلولی در هر خانه از پلیت قرار داده شد و پلیت بلافاصله به انکوباتور منتقل شد و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. پس از آن $1 ml$ مدیوم کندروژنیک به آرامی به هر خانه از پلیت اضافه شد و پلیت دوباره در انکوباتور قرار داده شد. مدیوم هر سه روز یک بار تعویض شد و در روزهای ۷ و ۱۴ نمونه‌ها برای بررسی Real-time PCR برداشته شدند.^{۱۶} اندازه‌گیری میزان بیان نسبی ژن آگریکان با استفاده از پرایمر GAPDH به عنوان کنترل داخلی و با استفاده از کیت Maxima SYBR® Green/Rox qPCR master Mix (Fermentas, England) 2X با روش Ct $\Delta\Delta$ Comparative Ct انجام شد. برای هر ژن و هر بار بررسی واکنش‌ها یک مستر میکس در حجم $20 \mu l$ ، با ترکیب $10 \mu l$ سایبرگرین، $5/7 \mu l$ آب دو بار تقطیر، $25/0 M\mu$ پرایمرهای Forward & Reverse ساخته شد. تمام آزمایشات برای هر نمونه به صورت سه بار تکرار و همراه با یک کنترل منفی انجام شد. دستگاه پس از کامل شدن واکنش‌ها، میانگین CT یا سیکل آستانه را محاسبه کرده که با استفاده از آن میزان بیان ژن بر اساس فرمول زیر به‌دست آمد: میزان بیان نسبی هر ژن برابر با $\Delta\Delta CT-2$ در نظر گرفته شد.

$$\Delta\Delta CT = CT \text{ target gene} - CT \text{ reference gene}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta\Delta CT \text{ treated} - \Delta\Delta CT \text{ untreated}$$



نمودار ۱: مقایسه بیان نسبی ژن آگریکان در سلول‌های بنیادی تمایز یافته مشتق از چربی در دو سیستم کشت Pellet و Micromass در روزهای ۷ و ۱۴ (Means± SE) و (P≤۰/۰۰۱***, P≤۰/۰۰۱***, P≤۰/۰۰۱***, P≤۰/۰۰۱***, P≤۰/۰۰۱***, P≤۰/۰۰۱***) از لحاظ آماری معنادار است.

سه مرحله‌ای معرفی شد که بر اساس آنالیز بیان ژن‌ها یک بازه زمانی ۱۴ روزه را شامل می‌شود که در آن مکانیسم‌های مولکولی تنظیم کننده کندروژنز مانند ارتباط مولکول‌های پیام‌رسان متفاوت درگیر در کندروژنز سلول‌های بنیادی مزانشیمی در هر مرحله به تفکیک رخ می‌دهد.^{۱۸} از این رو در پژوهش حاضر سعی شد این بازه زمانی مطلوب لحاظ شود. بیان بالای آگریکان در کشت‌های Micromass در مقایسه با کشت‌های Pellet در روزهای ۷ و ۱۴ نشان داد که کشت Micromass نسبت به سیستم کشت Pellet کارآمدتر عمل کرده است. کشت Micromass با ایجاد دانسیته سلولی متعادل ممکن است در انتشار مواد غذایی بهتر از کشت Pellet عمل کند، چرا که در کشت Pellet یک محیط با تراکم سلولی بالا و با فشار اکسیژن پایین ایجاد می‌شود که خود منجر به انتشار ضعیف مواد و در نهایت افزایش آپوپتوز سلول‌های مرکزی کشت Pellet می‌شود.^{۱۹}

پس بایستی بین دانسیته سلولی بالا و انتشار مواد غذایی در فرآیند کندروژنز سلول‌های بنیادی مزانشیمی تعادل وجود داشته باشد که شاید بتوان گفت در کشت Micromass این تعادل برقرار است.^{۲۰} با توجه به نتایج پژوهش حاضر شاید بتوان نتیجه گرفت که کشت Micromass در مقایسه با کشت Pellet کارایی بیشتری در بیان ژن آگریکان در کندروژنز سلول‌های بنیادی مشتق از چربی داشته است.



شکل ۲: C توده سلولی حاصل از کشت سلول‌ها در سیستم کشت Pellet در روز ۱۴، D توده سلولی حاصل از کشت سلول‌ها در سیستم کشت Micromass در روز ۱۴.

در مقایسه با گروه Pellet روز ۷ (۱/۰±۳۷/۳۳) افزایش معناداری داشت (P=۰/۰۰۰). همچنین میزان بیان آگریکان در گروه Micromass روز ۷ (۲/۷۷±۰/۱۳) در مقایسه با گروه Pellet روز ۷ (۱/۰±۳۷/۳۳) هم افزایش معناداری را نشان داد (P=۰/۰۰۳).

بحث

از آنجایی که آگریکان یکی از اجزای مهم ماتریکس خارج سلولی بافت غضروف است، در مطالعه حاضر مقایسه‌ی بیان ژن آگریکان در کندروسیت‌های حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از چربی استفاده گردید که با پژوهش Zhang و همکاران که در مورد بررسی روند کندروژنز سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان بود در استفاده از سیستم کشت مشابهت داشت، اما در منبع سلول‌های بنیادی متفاوت بود.^{۱۶} با توجه به این‌که برداشت و استخراج سلول‌های بنیادی مغز استخوان کاری پر هزینه و تهاجمی می‌باشد شاید بتوان گفت مطالعه حاضر در زمینه استفاده از سلول‌های ارزان و کم هزینه چربی نسبت به تحقیق Zhang و همکارانش در آینده کاربردی‌تر باشد. تفاوت دیگر در آنالیز ژن‌ها در روزهای ۷ و ۱۴ بود، اگرچه آن‌ها تنها در روز ۱۴ بررسی خود را انجام دادند. در مطالعه‌ای که توسط Kulyk و همکاران انجام شد، مشابه مطالعه حاضر از سیستم کشت Micromass استفاده کردند، اگرچه آن‌ها روند کندروژنز سلول‌های بنیادی جنینی را بررسی کردند.^{۱۷} بر اساس مطالعه Pelltari و همکاران روند کندروژنز سلول‌های بنیادی در *in vitro* یک فرآیند

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اصفهان در سال ۱۳۹۲ به کد ۳۹۱۲۳۳ می باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اصفهان اجرا شده است.

سپاسگزارى: این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی تحت عنوان مقایسه روند کندروژنز سلول های بنیادی مشتق از چربی انسانی در دو سیستم کشت سه بعدی Pellet and Micromass مصوب

References

1. Keeney M, Lai JH, Yang F. Recent progress in cartilage tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol* 2011;22(5):734-40.
2. Im GI, Shin YW, Lee KB. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13(10):845-53.
3. Mara CS, Sartori AR, Duarte AS, Andrade AL, Pedro MA, Coimbra IB. Periosteum as a source of mesenchymal stem cells: the effects of TGF- β 3 on chondrogenesis. *Clinics (Sao Paulo)* 2011;66(3):487-92.
4. Arufe MC, De la Fuente A, Fuentes I, Toro FJ, Blanco FJ. Umbilical cord as a mesenchymal stem cell source for treating joint pathologies. *World J Orthop* 2011;2(6):43-50.
5. Bajek A, Gurtowska N, Olkowska J, Kazmierski L, Maj M, Drewa T. Adipose-Derived Stem Cells as a Tool in Cell-Based Therapies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2016;64(6):443-454.
6. Dai R, Wang Z, Samanipour R, Koo KI, Kim K. Adipose-derived stem cells for tissue engineering and regenerative medicine applications. *Stem Cells Int* 2016;2016:6737345.
7. Estes BT, Guilak F. Three-dimensional culture systems to induce chondrogenesis of adipose-derived stem cells. *Methods Mol Biol* 2011;702:201-17.
8. Shen B, Wei A, Tao H, Diwan AD, Ma DD. BMP-2 enhances TGF-beta3-mediated chondrogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in alginate bead culture. *Tissue Eng Part A* 2009;15(6):1311-20.
9. Bernstein P, Dong M, Corbeil D, Gelinsky M, Günther KP, Fickert S. Pellet culture elicits superior chondrogenic redifferentiation than alginate-based systems. *Biotechnol Prog* 2009;25(4):1146-52.
10. Zamani S, Hashemibeni B, Esfandiari E, Kabiri A, Rabbani H, Abutorabi R. Assessment of TGF- β 3 on production of aggrecan by human articular chondrocytes in pellet culture system. *Adv Biomed Res* 2014;3:54.
11. Hashemibeni B, Razavi SH, Esfandiari 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. *J Isfahan Medical School* 2009;27(100):618-31. [Persian]
12. Hashemibeni B, Razavi SH, Esfandiari E, Salehi M, Karbasi S, Mardani M, et al. Induction of chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells with TGF- β 3 in pellet culture system. *Iran J Basic Med Sci* 2008;11(37):10-7.
13. Chang CH, Lin HY, Fang HW, Loo ST, Hung SC, Ho YC, et al. Chondrogenesis from immortalized human mesenchymal stem cells: comparison between collagen gel and pellet culture methods. *Artif Organs* 2008;32(7):561-6.
14. Ralphs JR, Dhoot GK, Tickle C. Differentiation of myogenic cells in micromass cultures of cells from chick facial primordium. *Dev Biol* 1989;131(1):189-96.
15. Battistelli M, Borzi RM, Olivetto E, Vitelozzi R, Burattini S, Facchini A, et al. Cell and matrix morpho-functional analysis in chondrocyte micromasses. *Microsc Res Tech* 2005;67(6):286-95.
16. Zhang L, Su P, Xu C, Yang J, Yu W, Huang D. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: a comparison between micromass and pellet culture systems. *Biotechnol Lett* 2010;32(9):1339-46.
17. Kulyk WM, Franklin JL, Hoffman LM. Sox9 expression during chondrogenesis in micromass cultures of embryonic limb mesenchyme. *Exp Cell Res* 2000;255(2):327-32.
18. Peltari K, Winter A, Steck E, Goetzke K, Hennig T, Ochs BG, et al. Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice. *Arthritis Rheum* 2006;54(10):3254-66.
19. Eslaminejad M, Nikmahzar P, Eftekhari Yazdi A, Piryaei A. The structure of human mesenchymal stem cells differentiated into cartilage in micromass culture system. *Yakhteh Med J* 2006;8(3):1612-71.
20. Giovannini S, Diaz-Romero J, Aigner T, Heini P, Mainil-Varlet P, Nestic D. Micromass co-culture of human articular chondrocytes and human bone marrow mesenchymal stem cells to investigate stable neocartilage tissue formation in vitro. *Eur Cell Mater* 2010;20:245-59.

Comparison of aggrecan gene expression in chondrogenesis of adipose-derived stem cells in pellet and micromass culture systems

Mahtab Teimouri Ph.D.¹
Batool Hashemibeni Ph.D.^{2*}
Mohammad Mardani Ph.D.²

1- Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2- Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

* Corresponding author: Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
Tel: +98- 31- 37929153
E-mail: hashemibeni@med.mui.ac.ir

Abstract

Received: 05 Jul. 2017 Revised: 12 Jul. 2017 Accepted: 6 May 2018 Available online: 14 May 2018

Background: Nowadays, Human adipocyte-derived stem cells (hADSCs) has been widely used in tissue engineering because of its unique features such as extraction from more sources, more easily and non-invasive extraction methods. In order to increase cell-cell interactions, similar to embryonic pre-cartilage condensation, the use of three dimensional (3D) high-density cell culture systems such as Pellet and Micromass that simulates optimal condensation in chondrogenesis in vivo is necessary. Also, these culture systems provide the proper diffusion of nutrients. Aggrecan is a proteoglycan and one of the important components of extracellular matrix of cartilage tissue that plays an important role in the organization of the extracellular matrix. The high concentrations of aggrecan produces the osmotic properties that is necessary to normal tissue function of cartilage. In current study, Aggrecan gene expression was investigated during chondrogenesis of hADSCs in two Pellet and Micromass culture systems.

Methods: This experimental study was done in Department of Anatomical Sciences Department of Faculty Medical in Isfahan University of Medical Sciences, Iran, from April 2013 to January 2015. First, the abdominal adipose tissue was obtained from three patients after obtaining written consent during their liposuction surgeries. ADSCs were extracted by mechanical and enzymatic methods and were cultured in monolayer culture. Then, in order to induction of chondrogenic differentiation, 5×10^5 cells of third passage (P3) were transferred to three-dimensional culture systems Pellet and Micromass containing chondrogenic mediums in experimental groups of 7 and 14 days. The evaluation of aggrecan gene expression was performed by real-time PCR technique.

Results: Gene expression analysis revealed that aggrecan was significantly increased in micromass culture at day 14 compared to Pellet culture at days 14 and 7 ($P \leq 0.01$). Also, aggrecan was significantly increased in Micromass culture at day 7 compared to Pellet culture at day 7 ($P \leq 0.05$).

Conclusion: Due to higher expression of aggrecan gene in Micromass culture compared to Pellet culture, this system may be more efficient than Pellet culture in synthesis of aggrecan in chondrogenic differentiation of ADSCs.

Keywords: chondrogenesis, aggrecan, micromass culture, pellet.