





## Premature cellular senescence in isolated chondrocytes from polydactyl cartilage in FBS containing serum in comparison to human serum

Hajar Shafaei<sup>1</sup> , Azam Farani<sup>2</sup> , Zahra Baghaei<sup>2</sup> , Fatemeh Mortazavi<sup>3</sup> <sup>1</sup>Stem Cells Research Center, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran<sup>2</sup>Research and Science Azad University of Tabriz, Tabriz, Iran<sup>3</sup>Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

### ARTICLE INFO

#### Article History:

Received: 13 Apr 2021

Accepted: 28 Jul 2021

ePublished: 12 Jan 2022

#### Keywords:

Cellular Senescence,  
Chondrocytes, IGF1, P16,  
Polydactyly, Serum

### Abstract

**Background.** Transplantation of chondrocytes is one of the methods for treatment of articular cartilage defects. For this purpose, it is necessary to isolate these chondrocytes and expand in serum containing culture medium. Sera contain growth factors that are added to medium. Fetal bovine serum (FBS) is used for standard cell culture. However bovine proteins of FBS are accompanied with risk of host immune system reactions. Therefore, it is necessary to replace FBS with human serum for clinical cases. In addition, infants have chondrocytes with high proliferation potency versus adults. In this study, the effects of FBS and human placental serum was investigated on morphology and cellular senescence related genes expression of chondrocytes of infants.

**Methods.** Chondrocytes after isolation from polydactyl cartilage tissue samples, were cultured in 10% FBS and human serum up to 5 passage. Human placental serum was obtained from venous blood of embryonic surface of human placenta. Chondrocytes in two culture medium were compared morphologically by inverted microscope. For cellular senescence evaluation, relative expression of IGF1 and P16 genes were assessed by quantitative real-time RT PCR.

**Results.** Proliferation of chondrocytes is markedly decreased in FBS groups in comparison with human serum. In FBS containing medium, phenotypes of cells were changed from spindle shape to flat appearance after five passages. The expression of IGF1 and P16 genes are increased in chondrocytes grown in FBS containing medium and it was significant about P16. Morphologic results were compatible with Real-time RT PCR results.

**Conclusion.** Human placental serum has advantages such as high proliferation rate on human chondrocytes, prevention from cellular senescence and immunological problems in using cultured chondrocytes for cartilage tissue engineering.

**How to cite this article:** Shafaei H, Farani A, Baghaei Z, Mortazavi F. Premature cellular senescence in isolated chondrocytes from polydactyl cartilage in FBS containing serum in comparison to human serum. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2022;43(6):497-505. doi: 10.34172/mj.2022.002. Persian.

### Extended Abstract

#### Background

Chondrocyte cell transplantation is one of the treatment approaches for articular cartilage injuries. Transplantation of chondrocytes requires the

isolation of these cells from the tissue and their proliferation in culture medium containing serum. Serum is added to the culture medium for cell growth due to its growth factors. Fetal bovine serum

\*Corresponding author; Email: shafaei49@gmail.com shafaeih@tbzmed.ac.ir

© 2022 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited

(FBS) is used in standard cell culture medium. However, the bovine proteins in FBS probably activate the immune system of host. Therefore, for clinical cases, replacement of human serum with FBS seems indispensable. Our hypothesis was that FBS results in chondrocyte senescence. For this reason, in this study cartilage samples were obtained from children with a higher proliferative capacity and the effect of FBS and human placenta serum on the morphology and expression of associated genes was investigated.

### Methods

Extra finger disorder is called polydactyly and after birth is surgically removed. The cartilage of this waste tissue has high proliferative capacity than adult cartilage. The cartilage was divided into small pieces. The net weight of the samples was measured and proteinase and collagenase 2 enzymes were separately added to cartilage tissues. Samples were then placed on the shaker. After isolation of chondrocytes for tissue, cell suspension was cultured in low glucose DMEM, 10% human of serum or FBS and 1% penicillin and streptomycin. The chondrocytes adhered to the bottom of the flask and formed spindle shape. Proliferated cells were passaged when they reached 70% confluency. In passages 1 and 5, cells were cultured in two types serum (Fetal Bovine Serum and Fetal human Serum). Fetal human serum was collected from human placenta blood near the origin of umbilical cord. The blood samples were kept at 4° C for 4 h without anti-coagulants and allowed to clot and then centrifuged twice at 2500 r.p.m. for 10min, and pure sera were aliquoted and stored at -20° C until use. Proliferative potential of serums on chondrocytes was compared. To evaluate the expression of cellular senescence genes, mRNA of chondrocytes was extracted and after cDNA synthesis, Real Time RT PCR was done. The relative gene expression was calculated to housekeeping gene expression. For statistical analysis, the data were presented as means  $\pm$ SEM. Statistical differences between different groups were tested by t test using Graph Pad Prism software.  $P < 0.05$  was determined as significant. All

experiments were performed on three sets of samples.

### Results

In this study, it was observed that the first passage chondrocytes in FBS had less growth rate than the chondrocytes grown in human serum and the morphology of the cells in human serum is spindle-shaped. In the fifth passage, the proliferating spindle chondrocytes fill the bottom of the flask. While flat chondrocytes were observed in the medium containing FBS with lower growth rate. During cell passage, cells grown in culture medium containing FBS were isolated later than cells grown in medium containing human serum from the bottom of the cell flask. The average doubling time of cells in culture medium containing fetal bovine serum was 6 days and in culture medium containing human serum was 2 days.

In this study, the results of IGF1 gene expression obtained by Real Time RT PCR technique depicted that chondrocytes of groups containing FBS have a high level of expression of senescence genes, but their differences with groups containing human serum have not significant variations. The comparative expression of p16INK4a gene in the medium containing FBS was significantly increased compared to the groups cultured in the medium containing human serum in the fifth passage.

### Conclusion

Human placenta serum has advantages such as faster proliferation of human chondrocytes, prevention of cellular aging and immunological problems in the use of cultured chondrocytes for cartilage tissue engineering. Hence, human serum could be better than fetal bovine serum for supplementation. For clinical purposes replacing FBS with human serum seems to be a logical decision. The possible reasons for the proliferative effects of human serum could include the presence of plentiful growth factors in the fetal serum. FGF-2, among placental growth factors, is known to have a most powerful effect on cell proliferation. This study shows that species compatibility is necessary between serum and cell.

## پیری سلولی زودرس در کندروسیت‌های جدا شده از غضروف انگستان پلی‌داکتیلی در محیط حاوی سرم جنین گاوی در مقایسه با سرم انسانی

هاجر شفائی<sup>۱\*</sup>، اعظم فارانی<sup>۲</sup>، زهرا بقائی<sup>۲</sup>، فاطمه مرتضوی<sup>۳</sup> ID

<sup>۱</sup>مرکز تحقیقات سلولهای بنیادی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران  
<sup>۲</sup>دانشگاه آزاد واحد علوم تحقیقات تبریز، تبریز، ایران  
<sup>۳</sup>دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

### اطلاعات مقاله

#### سابقه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۰/۱/۲۴  
پذیرش: ۱۴۰۰/۵/۶  
انتشار برخط: ۱۴۰۰/۱۰/۲۲

#### کلیدواژه‌ها:

کندروسیت، پلی‌داکتیلی، پیری سلولی، سرم، IGF1 و P16

### چکیده

**زمینه.** پیوند سلول‌های کندروسیت، یکی از روش‌های درمان ضایعات غضروف مفصلی است. برای پیوند کندروسیت‌ها نیاز به جداسازی این سلول‌ها از بافت و تکثیر آنها در محیط کشت حاوی سرم هست. سرم‌ها به دلیل داشتن فاکتورهای رشد، برای رشد سلول‌ها به محیط کشت افزوده می‌شوند. سرم جنین گاوی (FBS) در کشت سلولی استاندارد استفاده می‌شود. اما پروتئین‌های گاوی موجود در FBS سیستم ایمنی میزبان را به خطر می‌اندازد. بنابراین برای موارد بالینی، جایگزینی سرم انسانی به جای FBS ضروری به نظر می‌رسد. همچنین کودکان کندروسیت‌های با قدرت تکثیر بالا نسبت به بالغین دارند. بنابراین در این مطالعه اثر FBS و سرم خون جفت انسانی روی مورفولوژی و بیان ژن‌های مرتبط با پیری سلولی کندروسیت‌های کودکان بررسی شده است.

**روش کار.** کندروسیت‌ها، پس از جداسازی از نمونه‌های بافت غضروف افراد پلی‌داکتیلی، در محیط حاوی ۱۰ درصد سرم FBS و سرم انسانی تا پاساژ پنجم کشت داده شدند. سرم جفتی انسانی از خون وریدی سمت جنینی جفت حاصل شد. مورفولوژی سلول‌ها در دو محیط رشد با میکروسکوپ معکوس مقایسه شد. برای بررسی پیری سلولی، بیان نسبی ژن‌های IGF1 و p16 با استفاده از real time RT-PCR بررسی شد.

**یافته‌ها.** تعداد کندروسیت‌ها در محیط حاوی FBS به‌طور قابل توجهی نسبت به گروه سرم انسان کاهش یافت. در محیط حاوی FBS، فنوتیپ‌های سلول‌ها در طی پنج پاساژ از دوکی به پهن تغییر شکل یافتند. بیان ژن‌های IGF1 و P16 در کندروسیت‌های رشد یافته در محیط حاوی FBS به‌طور قابل توجهی افزایش یافته است و این افزایش در مورد P16 معنی‌دار بود. نتایج مورفولوژیکی با نتایج RT-PCR مطابقت داشت.

**نتیجه‌گیری.** سرم جفت انسانی مزایایی مانند سرعت تکثیر بیشتر کندروسیت‌های انسانی، پیشگیری از پیری سلولی و مشکلات ایمونولوژیک در استفاده از کندروسیت‌های کشت داده شده برای مهندسی بافت غضروفی دارد.

### مقدمه

نقش ارزشمند سلول درمانی جهت ترمیم بافت غضروفی را به‌خوبی نشان داده است که سلول‌های کندروسیتی به محل ضایعه پیوند (Autologous chondrocyte transplantation, ACT) می‌شوند. اگرچه امروزه روش ACT تکامل یافته و از کندروسیت‌ها در روش‌های پیشرفته (Matrix-Assisted Chondrocyte Implantation) MACI استفاده می‌شود.<sup>۳</sup> محققین برای استخراج کندروسیت از بافت، با محدودیت تعداد کندروسیت‌های بافت غضروفی مواجهه

آسیب‌های بافت غضروفی یکی از مشکلات جوامع در سراسر دنیا بوده و افراد زیادی را درگیر می‌کند. این آسیب‌ها معمولاً در اثر ضربه، بیماری‌های دژنراتیو و با افزایش سن ایجاد می‌شود.<sup>۱</sup> بافت غضروفی، به‌طور طبیعی قابل ترمیم نیست و امروزه تلاش‌های گسترده‌ای جهت درمان آسیب‌های غضروفی صورت می‌گیرد، با این حال روش کاملاً مناسب برای ترمیم و بازسازی بخش آسیب‌دیده غضروف ارایه نشده است.<sup>۲</sup> تحقیقات قبلی،

\*نویسنده مسؤول؛ ایمیل: shafaei49@gmail.com و shafaeih@tbzmed.ac.ir

حق تالیف برای مولفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کرییتیو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

### نکته کاربردی

می‌توان از غضروف‌های جوان انگشت اضافی در ترمیم بیماری‌های غضروفی افراد مسن با استفاده از جفت انسان - که پس از تولد نوزاد، بافتی زاید است ولی سرم خون آن برای تکثیر سلول‌های انسانی مفید است - استفاده کرد.

استفاده از FBS به عنوان فاکتور رشد در تکثیر کندروسیت‌ها نیز یک روش استاندارد هست و مطالعات متعدد مشکلات گونه‌ای بین گاو و سلول‌های انسانی، آلودگی ویروسی و تفاوت بچ به بچ محصولات تولید شده را بحث کرده‌اند.<sup>۱۳، ۱۴</sup> در مقایسه اثر انواع سرم بر سلول‌های بنیادی چربی نشان داده شده است که سلول‌های بنیادی چربی کشت داده شده در FBS مورفولوژی پهن با توان تکثیر پایین دارند ولی پس از تغییر سرم در محیط کشت، مجدد به تکثیر ادامه می‌دادند.<sup>۱۴، ۱۵</sup> این احتمال وجود دارد که سلول‌های بنیادی در اثر استفاده از FBS وارد مرحله برگشت‌ناپذیر پیری سلولی نشده باشند. ژن P16 روی کروموزوم p21.39 که در نزدیکی ژن‌های سرکوب‌کننده تومور قرار داشته و به عنوان مهارکننده فعالیت CDK است - قرار دارد.<sup>۱۶</sup> ژن IGF-1 یکی از مهمترین ژن‌هایی است که در رشد و توسعه بافت بدن حیوانات نقش مهمی دارد. هایپرتروفی عضله در اثر بیان بیش از حد ژن IGF-1 ایجاد می‌شود. IGF-1 و دو پروتئین دیگر از لحاظ تکاملی حفظ شده‌اند و یک نقش مرکزی در بسیاری از روندهای سلولی مانند رشد، تکثیر، بقا، تکامل و سرطان ایفا می‌کنند.<sup>۱۷</sup> مکانیسم‌های مولکولی شامل تنظیم روند پیری توسط سیگنالینگ IGF-1 که هنوز به طور کامل مشخص نشده است. سیگنالینگ IGF-1 باعث افزایش طول عمر با تاخیر در روند پیری به طور پیوسته می‌شود و IGF-1 ژن P53 را تثبیت و فعال می‌کند.<sup>۱۸</sup> برای موارد پیوند کندروسیت، کشت کندروسیت با استفاده از سرم اتولوگ انجام می‌شود. ولی بیماران که اندیکاسیون ACT دارند معمولا افراد مسنی هستند که کندروسیت‌های با قدرت تکثیر پایین دارند و همچنین فاکتورهای رشد پایینی در سرم این افراد موجود هست. برای رفع محدودیت سرم اتولوگ برای تکثیر سلول‌ها در کنار مطالعه قبلی ما، نشان داده شده است که سرم جفتی انسان در تکثیر سلول‌های بنیادی چربی و کندروسیت از سرم اتولوگ بهتر است.<sup>۱۹، ۲۰</sup> اما در مورد کندروسیت‌ها شواهد اخیر نشان می‌دهد کیفیت تولید ماتریکس اختصاصی غضروف در حضور FBS بیشتر از سرم انسانی است.<sup>۲۱</sup> با در نظر گرفتن این شواهد و مزایای سرم انسانی نسبت به FBS، پژوهش در این زمینه نیاز است. بنابراین این مطالعه در نظر دارد میزان وقوع پیری

هستند (۱۰-۰) درصد و از طرفی تهیه تعداد کافی کندروسیت جهت پیوند، نیازمند ایجاد آسیب‌های بیشتر در بافت غضروف طبیعی فرد طی عمل جراحی خواهد بود. برای اجتناب از وارد شدن آسیب‌های بیشتر به غضروف مفصلی بیمار و همچنین بدست آوردن کندروسیت کافی از تعداد بدست آمده محدود این سلول‌ها از بافت کم فرد، کندروسیت‌ها باید در آزمایشگاه تکثیر داده شوند. مشکل اصلی دیگر در این روش، تکثیر پایین کندروسیت‌ها در محیط کشت است زیرا معمولا نمونه از افراد مسنی است که مشکلات غضروفی دارند و کندروسیت‌های آنان نیز رشد کمتری دارند.<sup>۴</sup> به نظر می‌رسد که کندروسیت‌های غضروف‌های تازه تشکیل یافته قدرت تکثیر بالایی داشته باشند. طی مطالعه‌ای نشان داده‌اند که کندروسیت‌های مشتق از غضروف مکل جنین توانایی تکثیر بالایی داشته و نسبت به کندروسیت‌های بالغ جهت کاربردهای مهندسی بافت غضروفی مناسب‌تر هستند.<sup>۵</sup> همچنین راجاگوپال و همکاران به کیفیت بالای کندروسیت‌های حاصل از اپی‌فیز اشاره کرده‌اند.<sup>۶</sup>

مطالعه مشابهی نیز نشان داده است سلول‌های کندروپروژنیتر جهت درمان ضایعات غضروفی گزینه بهتری می‌توانند باشند.<sup>۷</sup> میزان تکثیر، مورفولوژی و فنوتیپ مولکولی کندروسیت‌های نابالغ با منشا انگشت اضافی از کودکان پلی داکتیلی از کندروسیت افراد بالغ بهتر بود.<sup>۸</sup> این اواخر توانایی تکثیر زیاد و بیان بالای ژن TGFβ به عنوان فاکتور کندروژنیک در ورقه‌های سلولی کندروسیت‌های افراد پلی داکتیلی گزارش شده است.<sup>۹</sup> در کنار این مزایا، برای بدست آوردن این غضروف نیاز به آسیب به بافت غضروفی سالم نیست. در شرایط *in vitro*، سلول‌های طبیعی طول عمر محدودی دارند و پس از تعداد مشخصی پاساژ سلولی و تکثیر، رشد آنها متوقف می‌شود که به این پدیده پیری سلولی (cellular senescence) گفته می‌شود. مرگ سلولی پیامد اصلی فرآیند پیری است. پیری سلولی توسط استرس‌های مختلف سلولی ایجاد می‌شود.<sup>۱۰</sup> پیری سلولی یک روند غیرقابل برگشت است که فیروبلاست‌های طبیعی انسانی وارد آخرین مرحله رونویسی از مسیر زندگی خود شده و توقف رشد را به دنبال دارد. این پدیده در بسیاری از سلول‌های سوماتیک نیز اتفاق می‌افتد که از گونه‌های مختلفی مشتق شده‌اند. سلول‌های بنیادی پیر به طور غیرقابل برگشت در فاز G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> از سیکل سلولی متوقف می‌شوند و توانایی پاسخ به فاکتورهای رشد را از دست می‌دهند. این سلول‌ها فعالیت متابولیکی قابل تحملی را به مدت طولانی نشان می‌دهند و مقاوم به آپوپتوزیس می‌شوند و همچنین سلولی بزرگ و مسطح می‌شوند.<sup>۱۱</sup>

### تهیه سرم انسانی

از جفت يك نوزاد تازه متولد شده با کسب رضایت شخصی و رعایت کامل شرایط استریل در اتاق عمل با سرنگ، خون وریدی آسپیره شد. برای تشکیل لخته یک ساعت به حالت ساکن گذاشته شد. سپس قسمت مایع آن به فالکون منتقل شده و با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس مایع زرد شفاف رویی از فیلتر سرنگی ۰/۲ میکرون عبور داده شد تا استریل شده و برای تهیه محیط کشت استفاده شود.

### نحوه انجام Real time RT PCR

سلول‌های کشت شده در FBS و سرم انسانی از پاساژهای اول و پنجم به تعداد  $5 \times 10^5$  از هر نمونه برداشته شدند. سلول‌ها از کف فلاسک توسط تریپسین-EDTA جدا شده و به میکروتیوپ‌های RNase Free منتقل شدند. RNA با افزودن ۱ سی سی PLUS (سیناژن، ایران) استخراج شده و طبق پروتکل شرکت ادامه یافت. بعد از تعیین OD، RNA استخراج شده برای سنتز cDNA با کیت تاکارا استفاده شد. در مرحله Real time RT PCR، با رنگ سایبرگرین (سایبرگرین: آمپلیکون) میزان آمپلیفیکاسیون (Amplification) در هر چرخه با سه بار تکرار برای هر نمونه دنبال شد و عدد سیکل آستانه (CT) بدست آمد که نشان دهنده سیکلی از واکنش است که در آن میزان فلورسنس به آستانه تشخیص دستگاه ABI رسید. برای محاسبه میزان بیان ژن‌ها از روش  $\Delta\Delta Ct$  استفاده شد. در نهایت اعداد حاصل شده با نرم افزار Graph prism pad و با روش آماری آزمون تی آنالیز آماری شدند. در تمامی گروه‌ها  $P < 0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

کندروسیت‌های جداسازی شده در کشت اولیه (پاساژ صفر) در شکل ۱ (A) نشان داده شده است که بصورت سلول‌های منفرد با چگالی  $10^3 \times 5$  در سانتی‌متر مربع در محیط حاوی ۱۰ درصد از سرم انسانی و FBS کشت داده شده است. شکل ۱ (B) کندروسیت‌های پاساژ اول در حال رشد در ۱۰ درصد FBS را نشان می‌دهد که نسبت به کندروسیت‌های رشد یافته در سرم انسانی ۱۰ درصد (شکل ۱ (C)) کمتر رشد داشته‌اند و مورفولوژی سلول‌ها در سرم انسانی دوکی است. در پاساژ پنجم (شکل ۱ (D,E)) کندروسیت‌های دوکی شکل به سرعت در حال تکثیر باعث پر شدن کف فلاسک (confluency) شده‌اند (شکل ۱ (E)). در حالی‌که کندروسیت‌های یه‌ن با رشد کمتر در مدیوم حاوی FBS دیده می‌شود (شکل ۱ (D)).

سلولی در محیط کشت حاوی سرم جنین گاوی و سرم جفتی انسان را با استفاده از کندروسیت‌های با کیفیت رشد بالا از کودکان پلی داکتیلی بررسی کند.

### روش کار

با کسب رضایت شخصی از والدین ۳ کودک مبتلا به پلی داکتیلی بین ۱ ماه تا ۴ سال، عمل جراحی نمونه‌های بافتی برای بدست آوردن کندروسیت در بیمارستان کودکان تبریز انجام شد. معیار ورود داشتن سن کمتر از ۵ سال و تمایل والدین به جراحی انگشت اضافی و معیار خروج از مطالعه، ابتلا به سایر ناهنجاری‌های مادرزادی، بیماریهای زمینه‌ای و هیپاتیت و ایدز بود. غضروف‌ها به قطعات کوچک  $2 \times 2 \times 2$  میلی‌متری تقسیم شدند. بعد از اندازه‌گیری وزن خالص نمونه‌ها، بر اساس وزن از آنزیم‌های تجزیه‌کننده پروناز و کلاژناز ۲ برای جداسازی سلول‌های کندروسیت از بافت غضروف استفاده شد. ابتدا به مدت ۱ ساعت آنزیم پروناز با غلظت ۲/۵ درصد (سیگما، ایالات متحده آمریکا) به نمونه‌های خالص‌سازی شده اضافه و به داخل بن ماری شیکردار با دمای آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دور چرخش ۴ منتقل شد. بعد از ۱ ساعت آنزیم کلاژناز ۲ با غلظت ۰/۱۲۵ درصد (گیبکو، ایالات متحده آمریکا) به ظرف حاوی نمونه‌ها اضافه شد و دوباره به داخل بن ماری شیکردار برگردانده شد. مدت‌زمان لازم جهت فعالیت آنزیم کلاژناز ۲ به مدت ۱۰-۶ ساعت بود. شرایط مناسب جهت کشت سلول، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و میزان  $CO_2$ ، ۵ درصد است که بر اساس شرایط محیطی مناسب انکوباتور و مواد غذایی موجود در مدیوم، کندروسیت‌ها پس از دوکی شدن و چسبیدن به کف فلاسک تکثیر یافته و داخل ظرف کشت فلاسک T25 را پر می‌کنند. بعد از گذشت n روز - که برای هر سرم این مدت متفاوت بود - سلول‌های کف فلاسک به مرحله Confluence 70% رسیدند که باید در این زمان سلول‌ها را برای پاساژ سلولی آماده کرد. از روز اول کشت تا پاساژ سلولی هر ۷۲ ساعت یکبار محیط کشت سلول‌ها تعویض می‌شود. کندروسیت‌ها در پاساژ یک و پاساژ ۵ با دو نوع سرم انسانی و گاوی کشت داده شدند. میزان تکثیر سلول‌ها با زمان دو برابر شدن سلول‌ها (Population Doubling Time) در یک زمان مساوی با فرمول PDT زیر مقایسه شد.

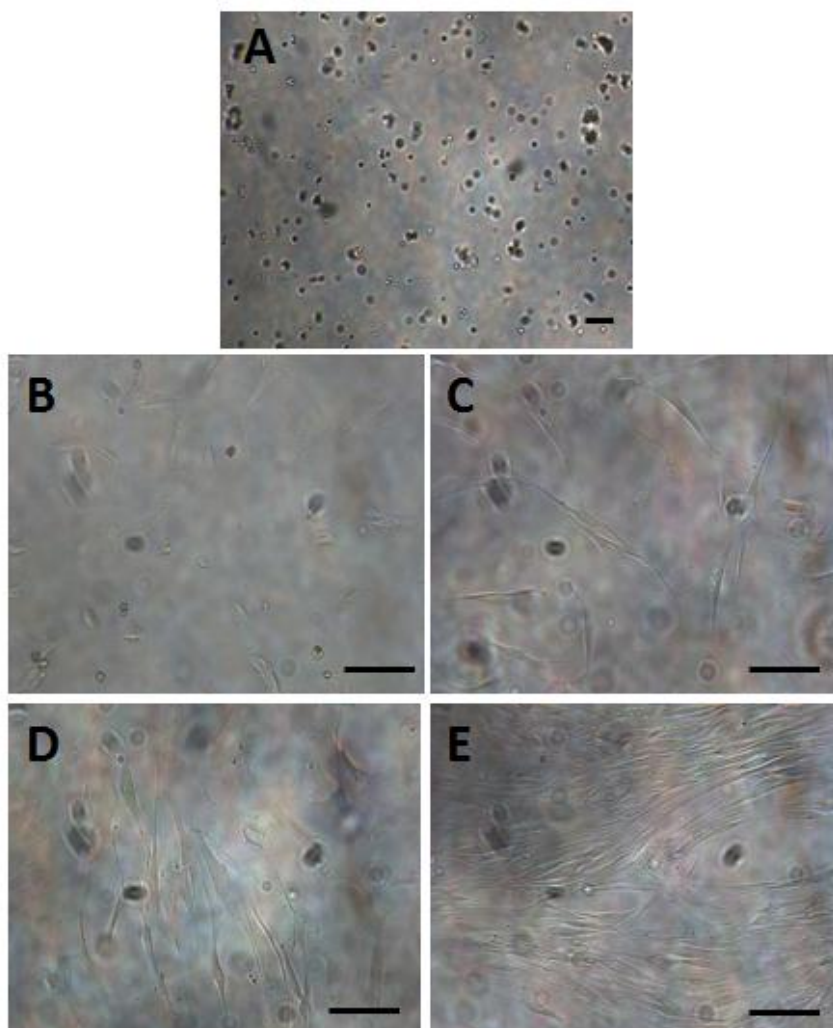
$$T_d = T \times \frac{\log 2}{\log \left( \frac{N_t}{N_0} \right)}$$

Td = زمان دو برابر شدن سلول‌ها بر اساس روز

T = تعداد روزهای کشت

N0 = تعداد سلول‌های کاشته شده

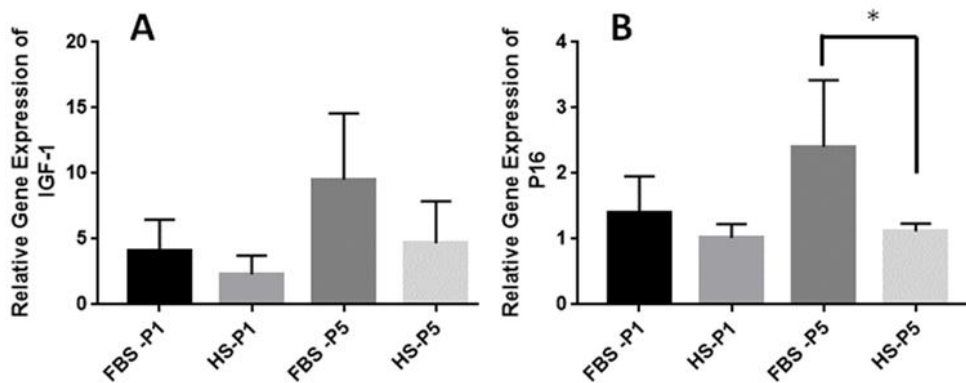
Nt = تعداد سلول‌های بدست آمده بعد از مدت کشت



**شکل ۱.** فوتومیکروگراف کندروسیت‌های در حال کشت. (A) کشت اولیه کندروسیت‌ها قبل از چسبیدن به ته فلاسک حاوی محیط کشت با سرم انسانی و FBS. (B) کندروسیت‌های پاساژ اول در مدیوم حاوی FBS با مورفولوژی پهن. (C) کندروسیت‌های پاساژ اول در مدیوم حاوی سرم انسانی با مورفولوژی به نسبت دوکی. (D) کندروسیت‌های پاساژ پنجم در مدیوم حاوی FBS با مورفولوژی پهن. (E) کندروسیت‌های پاساژ اول در مدیوم حاوی سرم انسانی با مورفولوژی به نسبت دوکی. هر Scale bar برابر صد میکرومتر است.

خون جفت انسان به سرعت در حال رشد هستند. سلول‌هایی که در FBS رشد یافته بودند به صورت پهن و سلول‌های رشد یافته در سرم انسانی به صورت دوکی شکل بودند. در این مطالعه نتایج بیان ژن IGF1 حاصل از روش Real Time RT PCR نشان داد که کندروسیت‌های گروه‌های حاوی FBS میزان بالایی از بیان این ژن دارند ولی تفاوت آنها با گروه‌های حاوی سرم انسانی معنی‌دار نبود (شکل ۲ (A)). میزان بیان نسبی ژن p16INK4a در محیط حاوی سرم گاوی به طور معنی‌داری نسبت به گروه‌های کشت داده شده در محیط کشت حاوی سرم انسانی در پاساژ پنجم افزایش یافته بود ( $P < 0.05$ ) (شکل ۲ (B)).

در این مطالعه تکثیر کندروسیت در محیط حاوی سرم گاوی به طور قابل توجهی نسبت به گروه‌های کشت داده شده در محیط کشت حاوی سرم انسانی کاهش یافت. هنگام پاساژ سلولی، سلول‌های رشد یافته در محیط کشت حاوی سرم جنین گاوی هنگام جداسازی با آنزیم تریپسین از کف فلاسک سلولی نسبت به سلول‌هایی که در مدیوم حاوی سرم انسانی رشد یافته بودند دیرتر جدا می‌شدند. زمان دو برابر شدن سلول‌های کشت داده شده در سرم جنین گاوی به‌طور متوسط ۶ روز و در سرم جفت انسانی ۲ روز بود. فنوتیپ‌های سلول‌ها در زمان عبور از پنج پاساژ تغییر شکل ظاهری داشتند. بنابراین کندروسیت‌ها در محیط حاوی سرم



شکل ۲. نمودار میزان بیان نسبی ژن‌های IGF-1 و P16 نسبت به GAPDH در کندروسیت‌های کشت داده شده در مدیوم کشت حاوی FBS و سرم انسانی (HS) در پاساژ سلولی اول (P1) و پاساژ پنجم (P5) (A) IGF-1 و (B) P16.  $P < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شده است.

این احتمال وجود دارد در مواجهه طولانی مدت با FBS در پاساژهای بالا در تشدید پیری سلولی کندروسیت‌ها نقش داشته باشد. با این حال نشان داده شده است در صورتی که پروتئین‌های FBS در مواجهه با کربن فعال قرار گیرند و با این کار IGF از FBS حذف شود، مسیر سیگنالی IGF تغییر می‌کند.<sup>۳۰</sup> با توجه به اینکه در این مطالعه، IGF اندوژن نیز در گروه‌های FBS بیشتر از سرم انسانی در پاساژ اول و پنجم است می‌تواند عامل کاهش رشد کندروسیت‌ها باشد و ممکن است بیان‌گیرنده این فاکتور رشد نیز تحت تاثیر انواع سرم تغییر یابد. IGF-1 یک عملکرد دوگانه وابسته به زمان در افزایش تکثیر سلولی اجرا می‌کند. این ژن توسط p53 سرکوب می‌شود و تیمار کردن طولانی IGF-1 پیری زودرس سلول‌ها را با یک روش وابسته به p53 القا می‌کند.<sup>۳۱</sup> این احتمال وجود دارد کندروسیت‌ها همانند سلول‌های بنیادی چربی قبل از پاساژ هفتم توقف رشد قابل برگشتی داشته باشند.<sup>۳۱</sup> به نظر می‌رسد همه سلول‌های در حال کشت پاسخ یکسانی به FBS ندارند. جهت اثبات وقوع پیری یا خاموشی موقتی تقسیم سلولی به مطالعه در پاساژهای بالاتر و بررسی‌های بیشتر نیاز است. همچنین لازم است قابل برگشت بودن پیری سلولی کندروسیت ناشی از FBS، بعد از استفاده مجدد از سرم انسانی مشخص شود.

### نتیجه‌گیری

سرم جفت انسانی مزایایی مانند سرعت تکثیر بیشتر کندروسیت‌های انسانی، پیشگیری از پیری سلولی و مشکلات ایمنولوژیک در استفاده از کندروسیت‌های کشت داده شده برای مهندسی بافت غضروفی دارد.

### بحث

در این مطالعه کاهش رشد کندروسیت‌ها، تغییر مورفولوژی آنها و افزایش معنی‌دار بیان ژن P16 در کندروسیت‌های کشت داده شده در مدیوم حاوی ۱۰ درصد FBS نسبت به سرم انسانی در پاساژ پنجم مشاهده شد. مطالعه مشابهی روی کشت سلول‌های بنیادی چربی با FBS و لیز پلاکتی انسانی صورت گرفته و نشان داده است گرچه سلول‌ها در اثر FBS، میزان بالایی از بیان ژن P16 دارند ولی بعد از تعویض مدیوم به لیز پلاکتی از فاز G0 خارج می‌شوند<sup>۳۱</sup> و سلول‌ها با بیان پایین سیکلین‌ها در فاز خاموش قرار دارند.<sup>۳۲</sup> مطالعه قبلی ما روی سلول‌های بنیادی چربی در نیز برگشت قدرت تکثیر با تعویض سرم را نشان دادند.<sup>۳۵</sup> در مورد کندروسیت‌ها نیز شواهد حاکی از آن است که پیری این سلول‌ها با طول تلومر مرتبط نیست.<sup>۳۳</sup> در سال ۲۰۰۷ سیس و همکارانش از افزایش ژن P16 برای تشخیص پیری در سلول‌های کلیوی با بیماری‌های گلوامرولی استفاده کردند.<sup>۳۴</sup> در سال ۲۰۱۱ بیکر دی و همکاران اعلام کردند که p16 با پیری MSCs مرتبط است. حذف ژن P16 می‌تواند فرآیند پیری سلولی و اختلالات مرتبط با پیری را به تاخیر اندازد.<sup>۳۵</sup> مسیر سیگنالی انسولین و IGF یک فرآیند حفاظت شده پیری در ارگان‌های ما از مخمر تا پستانداران است.<sup>۳۶</sup> مطالعه حاضر افزایش بیان IGF را در کندروسیت‌های تکثیر یافته در FBS نسبت به سرم انسانی در پاساژ ۱ و ۵ نشان می‌دهد. گرچه این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نیست. آنچه قطعی است این است که IGF در کوتاه مدت در تکثیر سلولی نقش دارد<sup>۳۷</sup> و نقص در بیان IGF-1 باعث پیری سلولی می‌شود.<sup>۳۸</sup> ولی در مواجهه بلند مدت در پیری سلولی موثر است.<sup>۳۹</sup> از آنجایی که IGF-1 یکی از ترکیبات FBS است<sup>۳۹</sup>

**قدردانی**

از مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی برای فراهم کردن امکانات انجام مطالعه سپاسگزاری می‌کنیم. کد طرح پایان‌نامه ۵/۴/۱۴۸۷۳ مصوب در این مرکز است.

**منافع متقابل**

مؤلف اظهار می‌دارد که منافع متقابلی از تالیف و یا انتشار این مقاله ندارد.

**ملاحظات اخلاقی**

پرونتکل این مطالعه در کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی استان آذربایجان شرقی به شماره مرجع کد اخلاقی TBZMED.REC.1394.1222 تایید شده است.

**مشارکت مولفان**

هاجر شفائی ۵۰ درصد تالیف مقاله شامل طراحی مطالعه، تحلیل نتایج و ویرایش نهایی را عهده داشته است. اعظم فارابی (۲۰ درصد) و زهرا بقائی (۲۰ درصد) اجرای طرح و تهیه دست‌نوشته را عهده داشتند. فاطمه مرتضوی (۱۰ درصد) جداسازی سلول‌ها را انجام داده است. همه نویسندگان نسخه نهایی مقاله را خوانده و تایید کرده‌اند.

**منابع مالی**

این طرح با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی تبریز با شماره طرح ۵/۴/۱۴۸۷۳ انجام شده است.

**References**

1. Widuchowski W, Widuchowski J, Trzaska T. Articular cartilage defects: study of 25,124 knee arthroscopies. *The Knee*. 2007 Jun 1;14(3):177-82.
2. Cipollaro L, Ciardulli MC, Della Porta G, Peretti GM, Maffulli N. Biomechanical issues of tissue-engineered constructs for articular cartilage regeneration: in vitro and in vivo approaches. *Br. Med. Bull.* 2019 Dec 11;132:53-80. doi: 10.1093/bmb/ldz034
3. Hede KT, Gomoll AH, Foldager CB. Demographics in Patients Receiving Matrix-Assisted Chondrocyte Implantation (MACI) in the Ankle. *Cartilage*. 2019 Aug 20;1947603519870854. doi: 10.1177/1947603519870854
4. Giannoni P, Cancedda R. Articular chondrocyte culturing for cell-based cartilage repair: needs and perspectives. *Cells Tissues Organs*. 2006;184(1):1-5. doi: 10.1159/000096946
5. Maor G, inventor; CARTICURE Ltd, assignee. Method for non-autologous cartilage regeneration. United States patent application US 12/093,323. 2010 Aug 19.
6. Rajagopal K, Dutt V, Manickam AS, Madhuri V. Chondrocyte source for cartilage regeneration in an immature animal: Is iliac apophysis a good alternative?. *Indian journal of orthopaedics*. 2012 Aug;46(4):402-6. doi: 10.4103/0019-5413.98828
7. Darwiche S, Scaletta C, Raffoul W, Pioletti DP, Applegate LA. Epiphyseal chondroprogenitors provide a stable cell source for cartilage cell therapy. *Cell Medicine*. 2012 Apr;4(1):23-32. doi:10.3727/215517912X639324
8. Mortazavi F, Shafaei H, Rad JS, Rushangar L, Montaceri A, Jamshidi M. High quality of infant chondrocytes in comparison with adult chondrocytes for cartilage tissue engineering. *World journal of plastic surgery*. 2017 May;6(2):183.
9. Maehara M, Sato M, Toyoda E, Takahashi T, Okada E, Kotoku T, et al. Characterization of polydactyly-derived chondrocyte sheets versus adult chondrocyte sheets for articular cartilage repair. *Inflammation and regeneration*. 2017 Dec;37(1):1-10.
10. Pole A, Dimri M, Dimri GP. Oxidative stress, cellular senescence and ageing. *AIMS molecular science*. 2016;3(3). doi: 10.3934/molsci.2016.3.300
11. Fitzgerald K. Let us know how access to this document benefits you. *interferon*. 2011 Jan 15;2011:01-15. doi: 10.4061/2011/963172
12. Ecke A, Lutter AH, Scholka J, Hansch A, Becker R, Anderer U. Tissue specific differentiation of human chondrocytes depends on cell microenvironment and serum selection. *Cells*. 2019 Aug;8(8):934. doi: 10.3390/cells8080934
13. Heger JI, Froehlich K, Pastuschek J, Schmidt A, Baer C, Mrowka R, et al. Human serum alters cell culture behavior and improves spheroid formation in comparison to fetal bovine serum. *Experimental Cell Research*. 2018 Apr 1;365(1):57-65.



14. Shafaei H, Esmaeili A, Mardani M, Razavi S, Hashemibeni B, Nasr-Esfahani MH, et al. Effects of human placental serum on proliferation and morphology of human adipose tissue-derived stem cells. *Bone Marrow Transplantation*. 2011 Nov;46(11):1464-71. doi: 10.1038/bmt.2010.313
15. Shafaei H, Esfandiari E, Baghernezhad H. Evaluation of morphology and immunophenotype of mesenchymal stem cells after switching of bovine serum of media to human serum. *Razi Journal of Medical Sciences*. 2017 Jan 10;23(151):105-13.
16. LaPak KM, Burd CE. The molecular balancing act of p16INK4a in cancer and aging. *Molecular Cancer Research*. 2014 Feb 1;12(2):167-83. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0350
17. Kobayashi S, Kamino Y, Hiratsuka K, Kiyama-Kishikawa M, Abiko Y. Age-related changes in IGF-1 expression in submandibular glands of senescence-accelerated mice. *Journal of Oral Science*. 2004;46(2):119-25.
18. Kim KS, Seu YB, Baek SH, Kim MJ, Kim KJ, Kim JH, Kim JR. Induction of cellular senescence by insulin-like growth factor binding protein-5 through a p53-dependent mechanism. *Molecular biology of the cell*. 2007 Nov;18(11):4543-52. doi: 10.1091/mbc.E07-03-0280.
19. Yanaga H, Yanaga K, Imai K, Koga M, Soejima C, Ohmori K. Clinical application of cultured autologous human auricular chondrocytes with autologous serum for craniofacial or nasal augmentation and repair. *Plastic and reconstructive surgery*. 2006 May 1;117(6):2019-30. doi: 10.1097/01.prs.0000210670.98945.5f
20. Kang SW, Yoo SP, Kim BS. Effect of chondrocyte passage number on histological aspects of tissue-engineered cartilage. *Bio-medical materials and engineering*. 2007 Jan 1;17(5):269-76.
21. Søndergaard RH, Follin B, Lund LD, Juhl M, Ekblond A, Kastrup J, et al. Senescence and quiescence in adipose-derived stromal cells: effects of human platelet lysate, fetal bovine serum and hypoxia. *Cytherapy*. 2017 Jan 1;19(1):95-106.
22. Cheung TH, Rando TA. Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2013 Jun;14(6):329-40. doi: 10.1007/978-1-4939-7371-2\_1.
23. López-Alcorocho JM, Guillén-Vicente I, Rodríguez-Iñigo E, Guillén-Vicente M, Fernández-Jaén TF, Caballero R, et al. Study of telomere length in Preimplanted cultured chondrocytes. *Cartilage*. 2019 Jan;10(1):36-42.
24. Sis B, Tasanarong A, Khoshjou F, Dadras F, Solez K, Halloran PF. Accelerated expression of senescence associated cell cycle inhibitor p16INK4A in kidneys with glomerular disease. *Kidney international*. 2007 Feb 1;71(3):218-26.
25. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Childs BG, Van De Sluis B, et al. Clearance of p16 Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*. 2011 Nov;479(7372):232-6.
26. Katic M, Kahn C. The role of insulin and IGF-1 signaling in longevity. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2005;62(3):320-43.
27. Tran D, Bergholz J, Zhang H, He H, Wang Y, Zhang Y, et al. Insulin-like growth factor-1 regulates the SIRT1-p53 pathway in cellular senescence. *Aging cell*. 2014;13(4):669-78. doi: 10.1111/accel.12219
28. Ferber A, Chang C, Sell C, Adamo M, Roberts Jr CT, LeRoith D. Failure of senescent human fibroblasts to express the insulin-like growth factor-1 gene. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268(24):17883-8. doi: 10.1016/S0021-9258(17)46787-1
29. Burke TW, Vuk-Pavlović S. Insulin-like growth factor-I is a serum component stimulating growth of human neuroblastoma. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*. 1993;29:391-4. doi: 10.1007/BF02633987
30. Tu Ch, Fiandalo M.V, Pop E, Stocking J.J, Azabtafari G, Li J, et al. Proteomic analysis of charcoal-stripped fetal bovine serum reveals changes in the insulin-like growth factor signaling pathway. *J Proteome Res*. 2018; 9:2963-7. doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00135