Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences and Health Services

Original Article

Comparison of cartilage specific gene expression between condrcoyets treated with adipose derived stem cells supernatant and chondrocytes co-cultured with stem cells

Azadeh Montaseri[1]*, Maryam Zeynali[2], Seyyedeh Mahdiyeh Hatami[3], Maryam Hassan famian[3]

[1]Stem Cell Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[2]Department of Genetics, Tabriz Azad University, Tabriz, Iran
[3]Department of Molecular Biology, School of Basic Sciences, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran
*Corresponding author; E-mail: montaseri_azi@yahoo.com, montaseria@tbzmed.ac.ir

Received: 29 April 2017 Accepted: 18 June 2017 First Published online: 20 May 2019
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2):97-105

Abstract

Background: It has been accepted that different effects of stem cells can be contributed to their paracrine secretions into the supernatant. Accordingly, the goal of this study is to evaluate the probable effects of adipose derived stem cells (ASCs) supernatant on chondrocyte gene expression and to compare it with co-culture condition of chondrocyte and ASCs.

Methods: To evaluate the supernatant effects, chondrocyte at the second passage were treated with ASCs-supernatant for 72 hr. Co-culture of cells were performed by seeding the same number of chondrocytes and ASCs in culture flasks for 72 hr too. After this period, cells in both groups were prepared for evaluation of cartilage specific genes expression using Real time RT-PCR technique. Data were analyzed using Two-Way ANOVA and Tukey's post-test.

Results: Treatment of chondrocytes with ASCs supernatant resulted in significant increase in the expression of Collagen II and Sox-9, but that of the aggrecan and COMP did not change significantly.

Conclusion: ASCs supernatant can be a beneficial medium compared to the stem cells itself and can be introduced as a candidate for promotion of cartilage lesions healing.

Keyword: Chondrocyte, Cartilage, Stem Cells, Adipose Tissue, Gene.

How to cite this article: Montaseri A, Zeynali M, Hatami S.M, Hassan famian M. [Comparison of cartilage specific gene expression between condrcoyets treated with adipose derived stem cells supernatant and chondrocytes co-cultured with stem cells]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2):97-105. Persian.

© 2019 The Author(s). 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.

مقاله پژوهشی

مقایسهٔ بیان ژن‌های مختص بافت غضروفی توسط کندروسیت‌های تیمار شده با سوپرناتانت سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت چربی و کندروسیت‌های هم‌کشتی شده با سلول‌های بنیادی

آزاده منتصری[۱*]، مریم زینالی[۲]، سیده مهدیه حاتمی[۳]، مریم حسن فامیان[۳]

[۱]مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی بند ناف، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[۲]گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی تبریز، تبریز، ایران
[۳]گروه زیست شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی اهر، ایران
[*]نویسنده مسئول؛ ایمیل montaseri_azi@yahoo.com, montaseria@tbzmed.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۶/۲/۹ پذیرش: ۱۳۹۶/۳/۲۸ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۲/۳۰
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. خرداد و تیر ۱۳۹۸؛ ۴۱(۲):۹۷-۱۰۵

چکیده

زمینه: امروزه مشخص شده است که سلول‌های بنیادی عمدهٔ تاثیرات خود را از طریق ترشح فاکتورهای رشد متعدد در محیط کشت‌رویی (سوپرناتانت) اعمال می‌نمایند. بر این اساس هدف از طرح حاضر بررسی تاثیر سوپرناتانت به دست آمده از سلول‌های بنیادی چربی بر بیان ژن‌های مختص بافت غضروفی توسط کندروسیت‌ها و مقایسهٔ آن با شرایطی است که کندروسیتها به طور مستقیم (هم‌کشتی) در مجاورت سلول‌های بنیادی چربی قرار گیرند.

روش‌کار: جهت بررسی تاثیر سوپرناتانت، کندروسیت‌هایی که در پاساژ ۲ سلولی بودند به مدت ۷۲ ساعت تحت تیمار با سوپرناتانت حاصله از سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی قرار گرفتند. در گروه هم‌کشتی، کندروسیتها و سلول‌های بنیادی به نسبت مساوی و به مدت ۷۲ ساعت در شرایط کشت قرار داده شدند. در پایان این زمان، سلول‌های هر دو گروه جهت بررسی بیان ژن‌های مختص غضروف با روش Real time RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج به دست آمده با روش آماری Two Way ANOVA و Tukey post test تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: : نتایج طرح حاضر بیانگر افزایش بیان ژن‌های کلاژن نوع II و Sox-9 در گروه تیمار با سوپرناتانت در مقایسه با گروه هم‌کشتی بود، اما بیان ژن‌های Aggrecan و COMP تفاوت معنی‌داری را در دو گروه نشان نداد.

نتیجه‌گیری: استفاده از سوپرناتانت به دست‌آمده از سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در مقایسه با استفادهٔ مستقیم از خود این سلول‌ها می‌تواند اثرات سودمندتری داشته باشد و به عنوان گزینهٔ مناسبی جهت پیشبرد ترمیم ضایعات غضروف مفصلی در نظر گرفته شود.

کلید واژه‌ها: کندروسیت، غضروف، سلول‌های بنیادی، بافت‌چربی، ژن.

نحوه استناد به این مقاله: منتصری آ، زینالی م، حاتمی س م، حسن فامیان م. مقایسهٔ بیان ژن‌های مختص بافت غضروفی توسط کندروسیت‌های تیمار شده با سوپرناتانت سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت چربی و کندروسیت‌های هم‌کشتی شده با سلول‌های بنیادی. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی‌ـدرمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۲):۹۷-۱۰۵

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز تحت مجوز کریتو 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.

مقدمه

غضروف مفصلی بافت همبند نیمه جامد و انعطاف‌پذیری است که به عنوان ضربه‌گیر مفاصل عمل می‌کند. این بافت متشکل از تعداد محدودی سلول به نام کندروسیت است که در ماتریکس خارج سلولی ظریفی که غنی از پروتئوگلیکان‌ها و رشته‌های کلاژن است قرار گرفته‌اند (۱). بافت غضروف فاقد عروق بوده و به دلیل فقدان خون‌رسانی و تعداد محدود سلول‌های موجود، این بافت توانایی کمی در تعمیر و بازسازی خود دارد و آسیب آن در نهایت منجر به اختلالات مفاصل می‌شود. ضایعات غضروف مفصلی در اثر عوامل مختلفی ایجاد می‌شوند، در ابتدا ضایعات مختصری مانند ترک‌ها و شکاف‌ها در غضروف مفصلی شکل می‌گیرند که به مرور زمان وسیع تر شده و به دنبال آن استئوآرتریت ایجاد می‌شود (۲،۱). استئوآرتریت شایعترین بیماری درگیرکنندهٔ سیستم عضلانی- اسکلتی است که همراه با تخریب ماتریکس خارج سلولی، التهاب سینوویال و تخریب غضروف و استخوان زیرین می‌باشد (۳). در سطح مولکولی واسطه‌های پیش التهابی و کاتابولیک مانند اینترلوکین ۱- بتا (Interleukin 1-β) و فاکتور نکروز توموری آلفا (Tumor Necrosis Factor-α) در آغاز و پیشرفت بیماری دخیل هستند که منجر به فعالسازی مسیرهای التهابی و تحریک سنتز و ترشح آنزیمهای پروتئولیتیک مانند ماتریکس متالوپروتئینازها (Matrix metalloproteinases)، آگرکاناز و نیتریک اکسید می‌شوند که در نهایت تخریب ماتریکس خارج سلولی را به دنبال دارد (۴). تکنیک‌های رایج درمان آسیب‌های غضروف عبارتند از: روش خردکردن (Microfracture)، روش خراشیدن (Abrasion) و آرتروسکوپی (Arthroplasty). در طی چندین سال گذشته عمل پیوند سلول‌های غضروفی اتولوگ با نتایج امیدوار کننده‌ای همراه بوده است ولی این روش درمان دارای معایبی نیز می‌باشد از جمله از دست دادن فنوتیپ کندروسیت‌ها در محیط کشت تک لایه که شبیه به فیبروبلاست می‌شوند و همچنین عدم بیان کلاژن نوع II و آگریکان توسط کندروسیت‌های کشت داده شده در شرایط کشت طولانی مدت (۵). اخیرا در مهندسی بافت غضروف، برای رفع این محدودیت‌ها از منابع دیگری همچون سلولهای بنیادی مزانشیمی استفاده می‌شود. این سلولها مجموعه‌ای ناهمگن از سلول‌های استرومایی هستند که می‌توان آن‌ها را از مغز استخوان، عضله‌ی اسکلتی، بافت چربی، سینوویوم و بند ناف جدا کرد (۳). در میان منابع مختلف، بافت چربی گزینه‌ای ایده‌آل برای تهیه‌ی سلولهای بنیادی می‌باشد (۶). توزیع وسیع در بدن، دسترسی آسان و تعداد زیاد سلول‌های بنیادی که از این بافت به دست می‌آید، از جمله مزایای استفاده از این سلول‌ها می‌باشد (۶و۷). ذکر این نکته ضروری است که خوشبختانه، نه تنها پیوند اتوگرافت بلکه به‌دلیل نداشتن آنتی‌ژن HLA-DR، پیوند آلوگرافت سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی نیز بدون خطر رد پیوند و انتقال بیماری‌های واگیردار امکان‌پذیر است (۸). مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی مشتق از چربی (Adipose derived stem cells, ASCs) در مقایسه با کندروسیت‌های کشت داده شده دارای توانایی بیشتری برای بیان ژن کلاژن نوع II حتی در پاساژهای سلولی بالا می‌باشند. از طرفی مطالعات نشان داده‌اند که علی رغم توانایی‌های ذکر شده در رابطه با سلول‌های بنیادی مشتق از چربی، این سلول‌ها زمانی قادر به تولید بافت غضروفی هستند که القاء کندروژنز در آن‌ها صورت گیرد که گاهی اوقات ادامه فرآیند القاء سلولی می‌تواند نتایج نا خواسته‌ای مثل هایپرتروفی سلول‌ها و ایجاد بافت کلسیفیه شده را به دنبال داشته باشد (۹). جهت غلبه بر این مشکل می‌توان از روش هم‌کشتی (co-culture) سلول‌های بنیادی چربی با کندروسیت‌ها استفاده نمود که در این شرایط هر دو سلول از اثرات یکدیگر بهره‌مند خواهند شد (۹و۱۰). علی‌رغم مزایای فراوان استفاده از سلول‌های بنیادی در درمان بسیاری از بیماری‌ها، این مسئله قابل توجه است که این سلولها به دلیل خاصیت خود تجدیدی می‌توانند مانند سلول‌های سرطانی عمل کرده و در برخی موارد به دنبال کاشت در بدن، به سلول‌های توموری تبدیل شوند که این امر استفاده از سلول‌های بنیادی را با محدودیت مواجه کرده است (۱۰). محققین مختلف نشان دادند که سلول‌های بنیادی مشتق از چربی اثرات خود را عمدتا از طریق تولید و ترشح عوامل مختلف به صورت پاراکرین بروز می‌دهند بنابراین، سوپرناتانت سلول‌های بنیادی حاوی فاکتورهای متعددی است که توسط این سلول‌ها ترشح شده‌اند. در واقع این محیط شامل متابولیت‌ها، سایتوکاین‌ها، پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی و فاکتورهای رشد مانند FGF-2، VEGF، TGF-β و IGF-1 می‌باشد که توسط سلولهای بنیادی به محیط ترشح می‌شوند (۱۱). فاکتورهای رشد- IGF-1 و TGF-β باعث پیشبرد نسخه‌برداری کلاژن نوع II می‌شوند. این دو فاکتور رشد در سوپرناتانت سلولهای بنیادی مشتق از بافت چربی وجود داشته و سبب تسریع تحریک غضروف‌سازی می‌گردند (۱۲). بنابراین با توجه به حضور فاکتورهای تغذیه‌ای در محیط کشت به دست آمده از سلول‌های چربی (Adipose derived stem cells conditioned medium, ASC-CM) می‌توان به جای استفاده از سلول‌های بنیادی، از محیط کشت آن‌ها برای تحریک تکثیر و سنتز ماتریکس خارج سلولی توسط کندروسیت استفاده نمود (۱۳). با توجه به نتایج ضد و نقیض موجود در زمینهٔ استفاده از سلول‌های بنیادی به صورت مستقیم و یا استفاده از محیط کشت آنها، هدف از مطالعه حاضر مقایسهٔ بیان ژنهای مختص بافت غضروفی شامل اگرکان، پروتئین الیگومریک غضروفی (cartilage oligomeric matrix protein - COMP)، کلاژن نوع II و Sox-9 توسط کندروسیت های تیمار

شده با سوپرناتانت سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی و کندروسیت‌هایی است که به‌طور مستقیم با سلول‌های بنیادی چربی هم کشتی داده شده‌اند.

روش‌کار

پس از اخذ رضایت‌نامهٔ کتبی از بیماران تحت جراحی تعویض مفصل، نمونه‌های غضروفی در لولهٔ مخروطی حاوی بافر فسفات (Phosphate buffer saline, PBS) به آزمایشگاه کشت منتقل شده پس از چندین مرتبه شستشو نمونه‌ها داخل ظرف کشت قرار گرفته، به تکه‌های یک میلی‌متری قطعه قطعه شدند و سپس سه بار با بافر فسفات شستشوی آنها انجام گرفت. جهت هضم بافت غضروفی و جداسازی کندروسیت‌ها، ابتدا به قطعات غضروفی آنزیم پروناز ۱٪ اضافه گردید و حدود ۶۰ دقیقه در بن ماری شیکردار انکوبه شدند. سپس به مدت ۲-۶ ساعت نمونه‌های غضروفی در آنزیم کلاژناز ۰/۲٪ قرار داده شدند. پس از هضم عمده قطعات بافتی، به منظور خنثی‌سازی آنزیم، محیط کشت حاوی FBS اضافه شد. جهت حذف قطعات هضم‌نشده، سوسپانسیون به دست آمده از صافی سلولی ۷۰ میکرون عبور داده شد و سپس به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰rpm سانتریفوژ انجام گردید. کندروسیت‌های به دست آمده شمارش‌شده و با تراکم 10^5 سلول در فلاسک کشت T75 حاوی محیط کشت (Dulbecco's Modified Eagled Medium-DMEM) مکمل‌شده با ۱۰٪ (Fetal Bovine serum, FBS) و استرپتومایسین- پنی‌سیلین ۱٪ قرار داده شدند. کندروسیت‌ها پس از ۲۴ ساعت به کف فلاسک چسبیده و شروع به تکثیر نمودند. زمانی که ۸۰٪ از کف فلاسک توسط سلول‌ها اشغال گردید، سلول‌ها با استفاده از آنزیم EDTA – Trypsin از کف فلاسک جدا شده و پاساژ سلولی انجام گرفت. بافت‌چربی زیر جلدی با کسب رضایت‌نامه کتبی از بیمارانی که تحت جراحی لاپاراتومی قرار گرفته بودند، جمع‌آوری شد. پس از انتقال به آزمایشگاه کشت، نمونه چربی به دست‌آمده سه بار با PBS شستشو داده شد و با استفاده از تیغ بیستوری به تکه‌های کوچک بریده شد. پس از توزین، به ازای هر گرم از بافت چربی یک سی‌سی آنزیم کلاژناز نوع I (۰/۰۲) اضافه شد و به مدت ۶۰-۹۰ دقیقه در بن‌ماری شیکردار به منظور هضم بافت قرار داده شدند. پس از هضم کامل بافت به منظور خنثی‌سازی آنزیم، محیط کشت DMEM با FBS ۱۰٪ اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۶۰۰ rpm سانتریفوژ انجام شد. سلول‌های بنیادی پس از جداشدن از بافت چربی شمارش شده و با تراکم 10^5 سلول در میلی‌متر مربع در فلاسک کشت T75 در محیط کشت DMEM حاوی FBS ۱۰٪ و آنتی‌بیوتیک ۱٪ کشت داده شدند. سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت به کف فلاسک چسبیده شروع به تکثیر نمودند و زمانی که ۸۰٪ از کف فلاسک را پر کردند پاساژ سلولی انجام شد. در این تحقیق سوپرناتانت یا conditioned medium (CM) از سلول‌های بنیادی بافت چربی که در پاساژ چهارم قرار داشتند جمع‌آوری شد. برای این منظور زمانی که سلول‌ها ۷۰٪ از کف ظرف را پر کردند، محیط کشت‌رویی آنها تخلیه شده، سلول‌ها با PBS شستشو داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در معرض محیط کشت فاقد سرم قرار گرفتند. پس از این مدت سوپرناتانت جمع‌آوری شده و در ابتدا به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰rpm و سپس با دور ۳۰۰۰rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ گردید تا هرگونه سلول یا قطعات سلولی اضافی از آن حذف شود، سپس تا زمان استفاده در دمای منفی ۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد.

برای اندازه‌گیری فاکتور رشد transforming growth factor beta-1 (TGF-β1) موجود در سوپرناتانت به دست‌آمده از سلول‌های بنیادی چربی، از کیت BOSTER,CAT.NO:EKOSB,CA، و جهت اندازه‌گیری فاکتور رشد Insulin-like (IGF-1) growth factor 1 موجود در سوپرناتانت از کیت BOSTER,CAT. NO:EKO382,CA، استفاده شد. براساس پروتکل شرکت تولید-کننده، نمودارها و استاندارد در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه انکوبه شدند و پس از آن آنتی‌بادی بیوتینیله اضافه گردید (۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) و سپس پلیت‌ها ۳ مرتبه با استفاده از TBS ۰/۰۱ مولار شستشو داده شدند. پس از اضافه-کردن TMB به محض تغییر رنگ، محلول توقف اضافه شد و پس از آن نمونه‌ها در محل تاریک انکوبه شدند و نهایتا جذب نور در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر (ELISA Reader, Tecan, CH-8708, Australia) اندازه‌گیری شد. به منظور بررسی اینکه آیا بیان ژن‌های مختص بافت غضروفی در شرایط کشت کندروسیت‌ها در حضور محیط‌رویی (سوپرناتانت) جدا شده از سلول‌های بنیادی چربی (ASC-CM) دستخوش تغییر می‌شود و یا هم‌کشتی مستقیم کندروسیت‌ها با سلول‌های بنیادی چربی می‌تواند منجر به افزایش بیان ژن‌ها گردد، کندروسیت‌هایی که در پاساژ دوم سلولی بودند مورد استفاده قرار گرفتند. در گروه هم‌کشتی، نسبت مساوی از سلول‌های کندروسیت (پاساژ دوم سلولی) و سلول‌های بنیادی چربی (پاساژ چهارم سلولی) با یکدیگر در فلاسک کشت T75 حاوی محیط کشت DMEM مکمل شده توسط ۱٪ آنتی‌بیوتیک و ۰/۰۵٪ FBS به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شدند. در گروه تیمار با ASC-CM، کندروسیت-های پاساژ دوم سلولی به تعداد 10^5 عدد در فلاسک T75 قرار داده شدند و پس از چسبیدن به کف فلاسک و رسیدن به حدود ۵۰-۶۰٪ confluency، محیط کشت‌رویی آن‌ها برداشته شد و سلول‌ها در معرض محیط کشت جدا شده از سلول‌های بنیادی چربی (ASC-CM) به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفتند. در پایان مدت ۷۲ ساعت، سلول‌ها با استفاده از آنزیم EDTA/trypsin برداشته شدند و جهت بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از روش Real time RT-PCR، استخراج RNA آنها صورت گرفت. بررسی بیان ژن-های collagen II, Aggrecan, Sox-9 و COMP در هر دو گروه توسط Real time RT- PCR انجام شد. برای این منظور کل RNA

سلول‌ها با استفاده از کیت استخراج RNA (شرکت یکتا تجهیز با Cat NO:YT9065) و براساس دستور کار مربوطه استخراج شد. تعیین کیفیت و کمیت RNAی استخراج شده توسط اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با دستگاه Nano drop 2000 تعیین گردید. سنتز cDNA با استفاده از کیت primer script RT reagent kit (Takara,RRO371, Japan) و براساس دستور کار ارائه شده توسط شرکت سازنده صورت گرفت. واکنش Real time RT-PCR با استفاده از SYBR Green PCR Master Mix (Takara, RR82OL, Japan) و دستگاه Rotor Gene 6000 (Corbett, 010755, Australia)) در دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و با زمان‌ها و درجه حرارت‌های مختلف (annealing temperature) برای هر ژن (جدول ۱) انجام شد. جدول ۱ توالی پرایمرهای طراحی شده توسط نرم افزار Oligo7 که در این مطالعه استفاده شدند را نشان می‌دهد. از ژن بتا اکتین (β-actin) به عنوان کنترل درونی استفاده شد و در نهایت سطح بیان هر کدام از ژن‌ها با استفاده از فرمول Pfaffl محاسبه شد. اعداد به دست آمده با استفاده از نرم افزار آماری Graph pad (version6) و با روش One-Way ANOVA و Tukey's Post test مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. در تمامی گروه‌ها P-value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

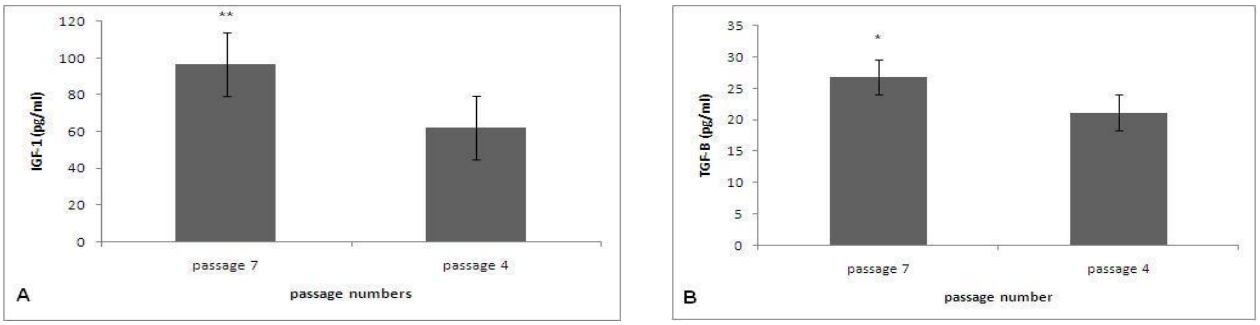
جهت بررسی تولید فاکتورهای رشد TGF-ß و IGF-1 توسط سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت چربی، سوپرناتانت به دست آمده از آنها با استفاده از روش ELISA اندازه‌گیری گردید. تصویر شماره A و B ۱ نتایج حاصل از این ارزیابی را توصیف می‌نماید. همانطور که در این تصویر مشاهده می‌شود میزان تولید و ترشح فاکتورهای رشد نامبرده با افزایش پاساژ سلولی، افزایش معنی‌داری داشته است. تصویر A -۱ نشان می‌دهد که سطح IGF-1 در سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی که در پاساژ هفتم بوده‌اند به نسبت پاساژ چهارم به‌طور معنی‌داری (P=۰/۰۰۴) افزایش یافته است، همچنین میزان فاکتور رشد TGF-ß در سلول‌های پاساژ هفت به نسبت پاساژ چهارم افزایش معنی‌داری (P<۰/۰۱) را نشان داد (تصویر B- ۱). تصویر شمارهٔ ۲ (A-D) نتایج حاصل از بررسی بیان ژنهای Collagen II، Sox-9، Aggrecan و COMP در سلول‌های هر دو گروه را نشان می‌دهد. همانطور که در تصویر– ۲A, B مشاهده می‌شود میزان بیان ژن Aggrecan (ACAN) و COMP در کندروسیت‌های هم‌کشتی شده با سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در مقایسه با کندروسیت‌هایی که تحت تیمار با سوپرناتانت به دست آمده از سلول‌های بنیادی بافت چربی (ASC-CM) قرار گرفته بودند، اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. تصویر C- ۲ بیان ژن کلاژن نوع II در دو گروه را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود، در حضور ACS-CM بیان این ژن به طور معنی‌داری (P=۰/۰۰۰۴) . در مقایسه با گروه هم‌کشتی افزایش یافته است. همچنین تیمار کندروسیت‌ها با سوپرناتانت به دست آمده از سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی منجر به افزایش معنی‌دار (P=۰/۰۰۴) . بیان ژن Sox-9 در مقایسه با گروه هم‌کشتی گردید (تصویر D–۲). نتایج آماری از آنالیز داده‌های به دست آمده به طور کامل در جدول شمارهٔ ۲ نمایش داده شده‌اند.

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام Real time RT-PCR

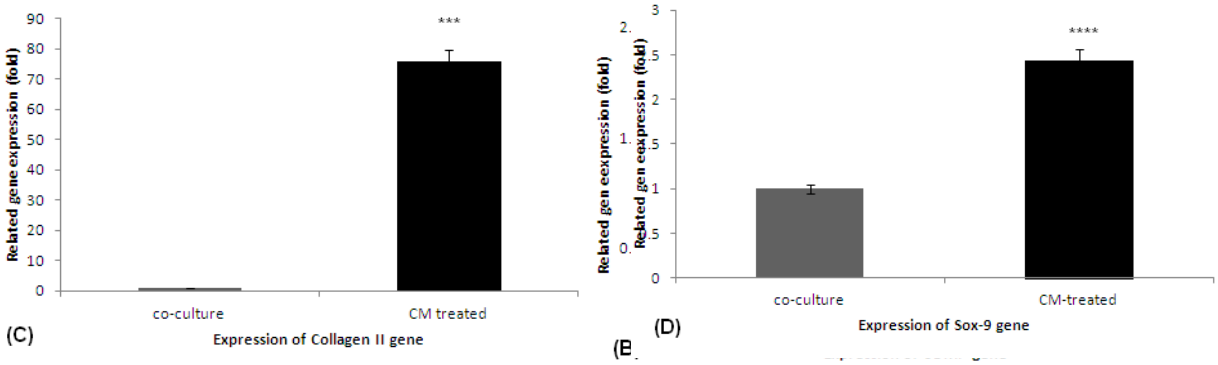
ژن	پرایمر	دمای Annealing
Sox9-F	AGAGAGGACCAACCAGAATTC	57°c for 30 sec
Sox9-R	TGGGTAATGCGCTTGGATAG	57°c for 30 sec
Coll2-F	GGCAATAGCAGGTTCACGTACA	59°c for 30 sec
Coll2-R	CGATAACAGTCTTGCCCCACTT	59°c for 30 sec
Comp-F	TGCAATGACACCATCCCAG	56°c for 30 sec
Comp-R	ACACACACTTTATTTTGTCCTCTC	56°c for 30 sec
ACAN-F	CAACTACCCGGCCATCC	56°c for 30 sec
ACAN- R	GATGGCTCTGTAATGGAACAC	56°c for 30 sec
B actin-F	TCCTCCCTG GAG AAG AGC TA	58°c for 45 sec
B actin-R	TCA GGAGGA GCA ATG ATC TTG	58°c for 45 sec

جدول شمارهٔ ۲: نتایج به دست آمده از آنالیز آماری داده های حاصله از بیان ژن های مختص بافت غضروف بین گروههای مورد مطالعه

ژن مورد مطالعه	گروه	انحراف معیار	میانگین	P-value
کلاژن نوع ۲	هم‌کشتی	۰	۱	۰/۰۰۱
	تیمار با سوپرناتانت	۱۸/۹۹	۷۶/۰۸۱	
آگرگان	هم‌کشتی	۰	۱	۰/۲
	تیمار با سوپرناتانت	۱/۸۳۵	۲/۴۵۸	
پروتئین الیگومریک غضروف	هم‌کشتی	۰	۱	۰/۴
	تیمار با سوپرناتانت	۰/۸۹۴۲	۱/۸۸۷۸	
ساکس–۹	هم‌کشتی	۰	۱	۰/۰۰۱
	تیمار با سوپرناتانت	۰/۲۳۲۸	۲/۴۳۵۲	



نمودار ۱: اندازه‌گیری سطح فاکتورهای رشد IGF-1 (A) و TFG-β (B) ترشح شده توسط سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در سوپرناتانت *P<۰/۰۱ و **P=۰/۰۰۴



نمودار ۲: بیان ژنهای Aggrecan (A)، COMP (B)، کلاژن نوع II (C) و Sox-9 (D) در بین گروه تیمار با سوپرناتانت مشتق از سلول‌های بنیادی بافت چربی و گروه هم‌کشتی ***P=۰/۰۰۴****P=۰/۰۰۴

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تیمار سلولهای کندروسیت با استفاده از سوپرناتانت به دست آمده از سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی منجر به افزایش بیان ژن‌های کلاژن II و Sox-9 در این سلول‌ها در مقایسه با شرایطی می‌شود که کندروسیت‌ها به‌طور مستقیم در هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی قرار گرفتند. همچنین این نتایج بیانگر تولید فاکتورهای رشد IGF-1 و TGF-β توسط سلول‌های بنیادی مشتق از چربی بود که میزان ترشح این فاکتورها با افزایش پاساژ سلولی، به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. غضروف مفصلی بافت همبند تخصص یافته‌ای است که تنها دارای یک نوع سلول به نام کندروسیت (chondrocyte) می‌باشد و این سلول‌ها در بافت غضروف طبیعی، حفظ یکپارچگی ماتریکس خارج سلولی را عهده‌دار می‌باشند (۱۴). بیماری استئوآرتریت در نتیجهٔ افزایش تولید فاکتورهای کاتابولیک مانند اینترلوکین ۱-β (IL-1β) و فاکتور نکروز توموری (TNF-α) و کاهش تولید فاکتورهای آنابولیک حاصل می‌شود که این عدم تعادل منجر به تخریب ماتریکس خارج سلولی غضروف می‌گردد (۱۵). با توجه به اینکه تغذیهٔ کندروسیت‌ها از طریق پدیدهٔ انتشار صورت می‌گیرد، بنابراین این سلول‌ها دارای توانایی اندکی جهت ترمیم آسیب ایجاد شده در غضروف هستند و در نتیجه پیشرفت این ضایعات به مرور زمان منجر به نازک‌شدن غضروف مفصلی، شکل‌گرفتن استخوان در محل آسیب دیده (استئوفیت) و آسیب سایر بافت‌های موجود در حفرهٔ مفصلی خواهد شد (۱۶). در چند دههٔ اخیر، استفاده از علم نوین مهندسی بافت جهت درمان آسیب‌های غضروف مفصلی به کار گرفته شده است. جهت انجام موفقیت‌آمیز مهندسی بافت غضروف، استفاده از منبع سلولی مناسب دارای اهمیت بسیار زیادی می‌باشد (۱۷). سلول‌های کندروسیت با توجه به اینکه سلولهای اصلی بافت غضروف هستند و قادر به تولید ماتریکس ویژهٔ این بافت می‌باشند، به عنوان یک گزینهٔ مناسب در نظر گرفته می‌شوند (۱۸). علی‌رغم مزایای فراوان، استفاده از کندروسیت‌ها محدودیت‌هایی را به همراه دارد که از جملهٔ آنها می‌توان به مشکل و محدودیت در نمونه‌برداری از بافت غضروف، جراحی دو مرحله‌ای، توانایی محدود این سلول‌ها جهت تکثیر یافتن در شرایط آزمایشگاهی و از تمایز خارج شدن آنها (dedifferentiation) پس از چندین مرحله پاساژ سلولی اشاره

نمود (۱۹). با توجه به محدودیت‌های ذکر شده در به کار بردن کندروسیت‌ها، در طی سالیان اخیر تلاش محققین در جهت استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به منظور درمان ضایعات غضروفی سوق داده شده است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی قابل استخراج‌شدن از منابع مختلفی همچون بافت چربی، مغز استخوان و بند ناف هستند. از بین منابع گوناگون، بافت‌چربی به دلیل در دسترس‌بودن، فراوان‌بودن سلول‌های بنیادی در آن و توانایی تمایز یافتن به کندروسیت‌ها، گزینهٔ مناسبی به نظر می‌آید. مطالعات نشان داده‌اند که علی‌رغم داشتن مزایای متعدد، کاشت سلول‌های بنیادی در بدن بیماران می‌تواند عوارضی مانند تومورزایی را به دنبال داشته‌باشد (۲۰). با توجه نتایج ضد و نقیضی که در استفاده از سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در هم‌کشتی با کندروسیتها وجود دارد (۲۱)، در مطالعهٔ حاضر ما بر آن شدیم تا مقایسهٔ بین روش هم‌کشتی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت‌چربی با کندروسیت‌ها و تیمار کندروسیت‌ها با سوپرناتانت به دست آمده از سلول‌های بنیادی چربی را انجام دهیم. مطالعات متعددی نشان‌دهندهٔ این مطلب هستند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی اثرات محرک خود بر کندروسیت‌ها را از طریق تولید فاکتورهای رشد به شکل سکروتوم و میکرووزیکول انجام می‌دهند (۲۲). بنابراین استفاده از سوپرناتانت این سلول‌ها می‌تواند به‌عنوان جایگزین مناسبتری برای خود سلول‌های بنیادی در نظر گرفته شود. در مطالعهٔ حاضر نیز به منظور بررسی توانایی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، میزان تولید فاکتورهای رشد IGF-1 و TGF-β در سوپرناتانت آنها سنجیده شد. نتایج نشان‌دهندهٔ حضور فاکتورهای رشد نامبرده در سوپرناتانت و همچنین افزایش میزان آنها متناسب با افزایش تعداد پاساژ سلولی بود. در این مطالعه هم‌چنین مشخص گردید که در کندروسیت‌های تیمار شده با سوپرناتانت به دست آمده از سلولهای بنیادی مشتق از بافت چربی، میزان بیان ژن‌های مختص بافت غضروفی مانند کلاژن نوع II و Sox-9 در مقایسه با گروه هم‌کشتی افزایش معنی‌داری داشت، اما بیان ژن‌های COMP و Aggrecan در دو گروه تفاوتی را نشان نداد. فاکتور نسخه‌برداری Sox-9 یک مولکول کلیدی در طی فرآیند کندروژنز است که در سلول‌های اجدادی کندروسیت (Chondroprogenitors) و کندروسیت‌های بالغ بیان می‌شود و نقش مهمی در تمایز سلول‌های مزانشیمی به کندروسیت‌ها دارد (۲۴,۲۳). حضور Sox-9 برای تنظیم تولید سایر اجزای ماتریکس خارج‌سلولی مانند کلاژن نوع II و Aggrecan ضروری است، همچنین این فاکتور نسخه‌برداری از حجیم‌شدن (hypertrophy) کندروسیت‌ها ممانعت به عمل می‌آورد (۲۵). مطالعهٔ حاضر نشان داد که در حضور سوپرناتانت به دست‌آمده از سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت چربی میزان بیان ژن Sox-9 به طور معنی‌داری نسبت به زمانی که کندروسیت‌ها با سلول‌های بنیادی هم‌کشتی داده می‌شوند افزایش یافت. این افزایش بیان ژن Sox-9 می‌تواند توجیه‌کنندهٔ افزایش بیان ژن کلاژن نوع II در گروه تیمار با سوپرناتانت نیز در نظر گرفته شود زیرا همانطور که ذکر گردید تنظیم بیان ژن کلاژن نوع II توسط فاکتور نسخه‌برداری Sox-9 در کندروسیت‌ها تنظیم می‌گردد. کلاژن نوع II یکی از عناصر اصلی تشکیل‌دهندهٔ ماتریکس غضروف مفصلی است که منجر به ایجاد استحکام و سایر ویژگی‌های مکانیکی این بافت می‌شود (۲۶). بنابراین پیداکردن عاملی که بتواند منجر به افزایش توانایی کندروسیت‌ها در تولید این عامل شود از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. همانطور که قبلا اشاره شد، سلول‌های بنیادی قادر به تولید و ترشح فاکتورهای رشد متعدد در سوپرناتانت رویی خود می‌باشند بنابراین نتایج به دست آمده از این مطالعه را می‌توان به حضور فاکتورهای رشد آنابولیک در سوپرناتانت سلول‌های بنیادی به دست‌آمده از بافت چربی نسبت داد. مطالعهٔ حاضر بیانگر حضور فاکتورهای رشد IGF-1 و TGF-β در سوپرناتانت این سلول‌ها بود که هر دوی آنها در تنظیم متابولیسم غضروف مفصلی نقش دارند (۱۵). از طرفی در مطالعهٔ حاضر تفاوت معنی‌داری در بیان ژن های Aggrecan و COMP در دو گروه مورد بررسی مشاهده نشد. Aggrecan پروتئوگلیکانی است که منجر به ایجاد استحکام و انعطاف‌پذیری در ماتریکس غضروف می‌شود و در بیماری استئوآرتریت تحت تاثیر آنزیم‌های تخریب‌کنندهٔ ماتریکس، ساختار آن دستخوش آسیب می‌شود (۲۷). جزء دیگر در ماتریکس خارج سلولی غضروف، مولکولی غیر کلاژنی به نام پروتئین الیگومریک ماتریکس غضروف (Cartilage ologomeric matrix protein-COMP) است که در ماتریکس زمینه‌ای غضروف قرار داشته و منجر به حفظ شبکهٔ کلاژنی در ماتریکس این بافت می‌شود (۲۸). کاهش میزان بیان ژنهای Aggrecan و COMP در کندروسیت‌های تحت تیمار با سوپرناتانت سلول‌های بنیادی به دست‌آمده از بافت چربی را می‌توان به قرار گرفتن این سلول‌ها در شرایط کشت تک لایه‌ای و هم‌چنین حضور فاکتورهای ناشناخته در سوپرناتانت نسبت داد. در راستای مطالعهٔ حاضر، Lee و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که سوپرناتانت به دست‌آمده از سلول‌های بنیادی بافت‌چربی حاوی فاکتورهای رگ‌زایی (angiogenic factors) می‌باشد که می‌توان علت عدم افزایش در بیان ژن‌های نامبرده را به حضور این فاکتور نسبت داد (۲۱). بنابراین ضروری است که جهت بهینه ساختن سوپرناتانت سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت‌چربی جهت استفاده در روش‌های مهندسی بافت غضروف، فاکتورهای مختلف موجود در آن را شناسایی نمود و عواملی را که می‌توانند منجر به حصول نتایج ناخواسته شوند از آن حذف کرد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از مطالعهٔ حاضر نشان داد که استفاده از سوپرناتانت به دست آمده از سلول‌های بنیادی بافت چربی در مقایسه با هم‌کشتی مستقیم این سلول‌ها می‌تواند منجر به افزایش بیان ژنهای مختص بافت غضروفی از جمله کلاژن نوع II و Sox-9 شود. بنابراین می‌توان از ترشحات پاراکرینی سلول‌های بنیادی به جای خود این سلول‌ها جهت پیشبرد ترمیم ضایعات غضروف مفصلی استفاده نمود که نسبت به استفادهٔ مستقیم خود سلول‌ها دارای عوارض جانبی کمتری نیز می‌باشد.

قدردانی

بودجه اختصاص داده شده جهت انجام طرح حاضر توسط مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی بند ناف دانشگاه علوم پزشکی تبریز تامین شده است که بدینوسیله نویسندگان نهایت قدردانی خود را ابراز می‌دارند. لازم به ذکر است که مقالهٔ حاضر بخشی از طرح تحقیقاتی است که به عنوان پایاننامهٔ خانم سیده مهدیه حاتمی دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی اهر با شمارهٔ ۲۲۰۳۰۵۰۳۹۳۱۰۳۲به ثبت رسیده است.

ملاحظات اخلاقی

پروتکل این مطالعه در یکصد و نود و هفتمین جلسهٔ کمیتهٔ اخلاق مورخه ۱۳۹۴/۹/۱۶ مورد تایید قرار گرفته است.

منابع مالی

حمایت مالی از این طرح تحقیقاتی تحت شمارهٔ گرنت ۵/۴/۱۳۹۶۶ از طرف مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تبریز صورت گرفته است.

منافع متقابل

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

مشارکت مؤلفان

آ.م: طراحی تحقیق حاضر را به عهده داشته است.
همچنین، همه مولفان اجرای مراحل آزمایشگاهی و جمع‌آوری داده‌ها را عهده‌دار بوده‌اند، همچنین نسخه نهایی آن را خوانده و تایید کرده‌اند.

References

1. Michael J, Schlüter-Brust K U, Eysel P. The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee. *Dtsch Arztebl Int* 2010; **107**(9): 152-162. doi: 10.1055/s-0031-1275302
2. Hoy D G, Smith E, Cross M, Sanchez-Riera L, Blyth F M, Buchbinder R, et al. Reflecting on the global burden of musculoskeletal conditions: lessons learnt from the Global Burden of Disease 2010 Study and the next steps forward. *Annals of the rheumatic diseases* 2014: annrheumdis-2014-205393. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-205393.
3. Montaseri A, Roshangar L, Rad J S, Shafaei H, Shakibaei M, Jarolmasjed S, et al. Formation of repaired hyaline cartilage using PDGF-treated chondrocyte/PCL construct in rabbit knee articular cartilage defect. doi: 10.1007/978-0-387-21553-2_11.
4. Getgood A, Bhullar T, Rushton N. Current concepts in articular cartilage repair. *Orthopaedics and Trauma* 2009; **23**(3): 189-200. doi: 10.1016/j.mporth.2009.05.002.
5. Chen Y, Ke J, Long X, Meng Q, Deng M, Fang W, et al. Insulin-like growth factor-1 boosts the developing process of condylar hyperplasia by stimulating chondrocytes proliferation. *Osteoarthritis and Cartilage* 2012; **20**(4): 279-287. doi: 10.1016/j.joca.2011.12.013.
6. Kasir R, Vernekar V N, Laurencin C T. Regenerative engineering of cartilage using adipose-derived stem cells. *Regenerative engineering and translational medicine* 2015; **1**(1-4): 42-49. doi: 10.1007/s40883-015-0005-0
7. Estes B T, Diekman B O, Gimble J M, Guilak F. Isolation of adipose-derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype. *Nature protocols* 2010; **5**(7): 1294-1311. doi: 10.1038/nprot.2010.81
8. Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *British journal of haematology* 2005; **129**(1): 118-129. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05409.x
9. Meretoja V V, Dahlin R L, Kasper F K, Mikos A G. Enhanced chondrogenesis in co-cultures with articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2012; **33**(27): 6362-6369. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.05.042.
10. Reya T, Morrison S J, Clarke M F, Weissman I L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; **414**(6859): 105-111. doi: 10.1038/35102167
11. Wu L, Leijten J C, Georgi N, Post J N, van Blitterswijk C A, Karperien M. Trophic effects of mesenchymal stem cells increase chondrocyte proliferation and matrix formation. *Tissue Engineering Part A* 2011; **17**(9-10): 1425-1436. doi: 10.1089/ten.tea.2010.0517
12. Van Buul G, Villafuertes E, Bos P, Waarsing J, Kops N, Narcisi R, et al. Mesenchymal stem cells secrete factors that inhibit inflammatory processes in short-term osteoarthritic synovium and cartilage explant culture. *Osteoarthritis and Cartilage* 2012; **20**(10): 1186-1196. doi: 10.1016/j.joca.2012.06.003.
13. Friedenstein A J, Chailakhyan R K, Latsinik N V, Panasyuk A F, Keiliss-Borok I V. Stromal cells responsible

for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues: cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 1974; **17**(4): 331-340.

14. Bomer N, den Hollander W, Suchiman H, Houtman E, Slieker R, Heijmans B, et al. Neo-cartilage engineered from primary chondrocytes is epigenetically similar to autologous cartilage, in contrast to using mesenchymal stem cells. *Osteoarthritis and Cartilage* 2016; **24**(8): 1423-1430. doi: 10.1016/j.joca.2016.03.009.
15. Montaseri A, Busch F, Mobasheri A, Buhrmann C, Aldinger C, Rad JS, et al. IGF-1 and PDGF-bb suppress IL-1β-induced cartilage degradation through down-regulation of NF-κB signaling: involvement of Src/PI-3K/AKT pathway. *PLoS One* 2011; **6**(12): e28663. doi: 10.1371/journal.pone.0028663.
16. Freitag J, Bates D, Boyd R, Shah K, Barnard A, Huguenin L, et al. Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of osteoarthritis: reparative pathways, safety and efficacy–a review. *BMC musculoskeletal disorders* 2016; **17**(1): 230. doi: 10.1186/s12891-016-1085-9
17. Platas J, Guillén M I, del Caz MDP, Gomar F, Castejón M A, Mirabet V, et al. Paracrine effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells in inflammatory stress-induced senescence features of osteoarthritic chondrocytes. *Aging (Albany NY)* 2016; **8**(8): 1703. doi: 10.18632/aging.101007
18. Kheir E, Shaw D. Management of articular cartilage defects. *Orthopaedics and Trauma* 2009; **23**(4): 266-273. doi: 10.1016/j.mporth.2009.01.013.
19. Haleem A M, Chu C R. Advances in tissue engineering techniques for articular cartilage repair. *Operative Techniques in Orthopaedics* 2010; **20**(2): 76-89. doi: 10.1053/j.oto.2009.10.004.
20. Kwon SH, Bhang SH, Jang H-K, Rhim T, Kim B-S. Conditioned medium of adipose-derived stromal cell culture in three-dimensional bioreactors for enhanced wound healing. *Journal of Surgical Research* 2015; **194**(1): 8-17. doi: 10.1016/j.jss.2014.10.053.
21. Lee C S, Burnsed O A, Raghuram V, Kalisvaart J, Boyan B D, Schwartz Z. Adipose stem cells can secrete angiogenic factors that inhibit hyaline cartilage regeneration. *Stem cell research & therapy* 2012; **3**(4): 35. doi: 10.1186/scrt126
22. Pawitan J A. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *BioMed research international* 2014; 2014. doi: 10.1155/2014/965849
23. Shintani N, Kurth T, Hunziker E B. Expression of cartilage-related genes in bovine synovial tissue. *Journal of orthopaedic research* 2007; **25**(6): 813-819. doi: 10.1002/jor.20345
24. Kawakami Y, Rodriguez-León J, Belmonte JCI. The role of TGFβs and Sox9 during limb chondrogenesis. *Current opinion in cell biology* 2006; **18**(6): 723-729. doi: 10.1016/j.ceb.2006.10.007.
25. Kondo M, Yamaoka K, Tanaka Y. Acquiring chondrocyte phenotype from human mesenchymal stem cells under inflammatory conditions. *International journal of molecular sciences* 2014; **15**(11): 21270-21285. doi: 10.3390/ijms151121270.
26. Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, Takagi S, Okumura M, Fujinaga T. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell and tissue research* 2005; **319**(2): 243-253. doi: 10.1007/s00441-004-1012-5
27. Kiani C, Liwen C, Wu Y J, Albert J Y, Burton B Y. Structure and function of aggrecan. *Cell research* 2002; **12**(1): 19-32. doi: 10.1038/sj.cr.7290106
28. Zaucke F, Dinser R, Maurer P, Paulsson M. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and collagen IX are sensitive markers for the differentiation state of articular primary chondrocytes. *Biochemical Journal* 2001; **358**(1): 17-24. doi: 10.1042/bj3580017.