

# بررسی اثر تزریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از چربی انسانی پره کاندیشن شده با کلرید کبالت جهت القاء هیپوکسی بر پوکی استخوان ناشی از اوارکتومی

محمود گرجی ولو کلا<sup>۱</sup> (Ph.D)<sup>۳</sup>، حمیده بابالو<sup>۴</sup> (Ph.D)<sup>۴</sup>، حامد خردمند<sup>۵</sup> (M.D)<sup>۵</sup>، سمیه فلاح‌نژاد<sup>۶</sup> (Ph.D)<sup>۷</sup>

۱- معاونت غذا و دارو یزد، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

۲- مرکز تحقیقات بیولوژی سلول‌های بنیادی، پژوهشکده علوم تولید مثل یزد، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

۳- گروه فارماکولوژی، مرکز تحقیقات ترمیم ضایعات مغزی و نخاعی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، پردیس بین‌الملل، پژوهشکده علوم تولید مثل یزد، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، ایران

۵- گروه جراحی مغز و اعصاب، بیمارستان حضرت رسول اکرم (ص)، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۶- مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی سیستم عصبی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۷- گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۶/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۲۴

sfallahnejad@gmail.com

• نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۵۶۴۷۹۰۹

## چکیده

**هدف:** پوکی استخوان یک بیماری متابولیک مزمن است. کلرید کبالت (Cobalt (II) chloride; CoCl<sub>2</sub>) اثرات مطلوبی بر عملکرد سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از چربی انسانی (Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells; hAD-MSCs) ایجاد می‌کند. این مطالعه با هدف ارزیابی اثرات تزریق hAD-MSCs پره کاندیشن شده با کلرید کبالت جهت القاء هیپوکسی بر روی موش‌های صحرایی ماده مبتلا به پوکی استخوان ناشی از اوارکتومی انجام شد.

مواد و روش‌ها: ۲۴ سر موش صحرایی ماده تحت جراحی اوارکتومی دو طرفه قرار گرفتند و بعد از ۳/۵ ماه، پیشرفت پوکی استخوان با استفاده از روش سی تی اسکن و با ارزیابی دانسیتومتری انجام شد. سپس، حیوانات به سه گروه شم (کنترل)، نورموکسی و هیپوکسی تقسیم شدند و به ترتیب فسفات بافر سالین (Phosphate Buffered Saline; PBS)، hAD-MSCs و hAD-MSCs پره کاندیشن شده با ۱۰۰ میکرومول کلرید کبالت به مدت ۴۸ ساعت را از طریق ورید دمی دریافت کردند. دو ماه بعد، نمونه برداری از استخوان‌های تیبیا سمت راست و چپ جهت بررسی فاکتور القاء‌کننده هیپوکسی (Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ; HIF-1 $\alpha$ ) با روش وسترن بلات و هم‌چنین فاکتورهای رشد (Insulin-like Growth Factor; IGF1) و (Transforming Growth Factor Beta; TGF $\beta$ ) و (Tumor Necrosis Factor Alpha; TNF $\alpha$ ) و (Interleukin-1beta; IL-1 $\beta$ ) به روش Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) انجام شد.

یافته‌ها: در گروه دریافت‌کننده hAD-MSCs پره کاندیشن شده با کلرید کبالت در مقایسه با گروه‌های دریافت‌کننده سلول‌های نورموکسی و PBS به ترتیب افزایش بیان HIF-1 $\alpha$  ( $P < 0/001$  و  $P < 0/01$ )، افزایش بیان IGF-I ( $P < 0/001$  و  $P < 0/01$ ) و TGF- $\beta$  ( $P < 0/01$  و  $P < 0/05$ ) و کاهش بیان TNF- $\alpha$  و IL-1 $\beta$  ( $P < 0/01$ ) مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: کلرید کبالت منجر به افزایش کارایی و اثربخشی hAD-MSCs پره کاندیشن شده با کلرید کبالت بر افزایش ترشح فاکتورهای رشد و کاهش بیان سیتوکین‌های پیش التهابی از طریق افزایش بیان HIF-1 $\alpha$  شد.

واژه‌های کلیدی: پوکی استخوان، هیپوکسی، کلرید کبالت، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از چربی انسانی

## مقدمه

کاهش یافته، در حالی که فعالیت استئوکلاست‌ها افزایش می‌یابد، در نتیجه تعادل بین شکل‌گیری و جذب استخوان از بین رفته و منجر به از دست رفتن توده استخوانی و افزایش شکستگی استخوان می‌شود [۲].

پوکی استخوان بیماری متابولیک سیستم اسکلتی است که به‌وسیله تخریب ریز ساختار استخوان مشخص می‌شود [۱]. زمانی که پوکی استخوان رخ می‌دهد، فعالیت استئوبلاست‌ها

به طور کلی، هیپوکسی یا به وسیله کاهش غلظت اکسیژن جو در اتاق‌های هیپوکسی یا با استفاده از عوامل شیمیایی، مانند کلریدکبالت (Cobalt Chloride (CoCl<sub>2</sub>) در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) ایجاد می‌شود. از بین دو روش القاءکننده هیپوکسی، استفاده از عوامل شیمیایی در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی روشی جذاب‌تر است، زیرا این روش‌ها هزینه کم‌تری دارند، فشار اکسیژن را حفظ می‌کنند و پایدارتر از اتاق‌های هیپوکسی هستند. در حالی که، اتاق‌های هیپوکسی گران و نامطلوب بوده و مشکلاتی در کنترل و حفظ فشار اکسیژن ثابت را نیز دارند [۱۳].

مطالعه‌ای که توسط Nowak-Stepniowska و همکاران در سال ۲۰۲۲ انجام شد، نشان داد که پره کاندیشن کردن سلول‌ها در محیط هیپوکسی منجر به تقویت میزان زنده ماندن سلول‌ها در محیط هیپوکسی و ایسکمیک می‌شود و رگ‌زایی و ظرفیت استخوان‌سازی را در محیط in vitro و in vivo بهبود می‌بخشد [۱۴]. در واقع، Zhang و همکاران (۲۰۱۸) بیان کردند که پره کاندیشن کردن سلول‌ها در محیط هیپوکسی منجر به افزایش مقاومت به آسیب، تنظیم مهاجرت و تمایز و تقویت ترشح فاکتورهای رشد می‌شود [۱۵]. با توجه به این‌که، محیط مغز استخوان یک محیط هیپوکسیک می‌باشد و نقش فاکتورهای رشد و سیتوکین‌های التهابی در روند استئوژنریس، بنابراین استفاده از سلول‌های بنیادی که در محیطی مشابه مغز استخوان کشت داده شده باشند، می‌تواند میزان تاثیر درمانی این سلول‌ها را افزایش دهد. بر همین اساس، هدف اصلی این مطالعه بررسی تأثیر تزریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از چربی انسانی پره کاندیشن شده با کلرید کبالت بر میزان ترشح فاکتورهای التهابی و رشد در موش‌های ماده مبتلا به پوکی استخوان ناشی از اوارکتومی می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

مرحله حیوانی (In vivo). ۲۴ سر موش صحرایی ماده بالغ ۲ ماهه نژاد ویستار با وزن ۱۶۰ تا ۲۲۰ گرم تهیه شد. اصول اخلاق پزشکی برای کار با حیوانات آزمایشگاهی در کلیه مراحل کار عملی تحقیق مراعات گردید. به این صورت که، دسترسی آزاد به آب و خوراک استاندارد (شرکت بهرور، تهران، ایران) داشتند و در قفس‌های مخصوص با شرایط دمای حدود ۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۵-۶۵ درصد و چرخه تاریکی و روشنایی ۱۲ ساعت، نگهداری شدند. کلیه روش‌های آزمایشی مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مشهد با کد اخلاق IR.MUMS.REC.971869 قرار گرفت.

در زنان یائسه نقص استروژن علت اصلی پوکی استخوان است. استروژن نقش پایه‌ای در رشد دستگاه اسکلتی و هموستاز استخوان از طریق گیرنده استروژن دارد. استئوبلاست‌ها و استئوسیت‌ها همانند بسیاری از سلول‌های بدن دارای گیرنده‌های اختصاصی برای استروژن هستند [۳]؛ از این رو عملکرد این سلول‌ها در زمان یائسگی به دلیل کاهش استروژن مختل می‌شود [۴].

مکانیسم‌های متعددی در تسریع سرعت بازسازی استخوان در شرایط کمبود استروژن نقش دارند که شامل افزایش تولید سیتوکین‌های فاکتور نکروز توموری آلفا (Tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), اینترلوکین یک (Interleukin-1 (IL-1) و اینترلوکین بتا (Interleukin-beta (IL- $\beta$ ) در ریز محیط استخوان [۵] و افزایش آزاد شدن فاکتورهای رشد موضعی در پاسخ به جذب استخوان است. با این وجود، تقویت شکل‌گیری استخوان در برابر جذب استخوان ناکافی بوده و این عدم تعادل منجر به از دست رفتن استخوان می‌شود [۶].

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells (MSCs)، سلول‌های استرومایی هستند که دارای ظرفیت خود نوسازی و تمایز به چندین رده سلولی را دارند. این سلول‌ها می‌توانند به انواعی از سلول‌ها مانند استئوبلاست، کندروسیت، آدیپوسیت و نورون تمایز یابند [۷].

در دهه‌های اخیر، استفاده از تکنیک‌های مهندسی بافت مبتنی بر سلول در درمان بیماری‌های غضروفی و استخوانی پیشنهاد شده است [۸]. تولید و تکثیر سلول‌های بنیادی با کیفیت بالا برای درمان با سلول و بازسازی بافت، به ویژه با توجه به قابلیت سلول‌های بنیادی برای تکثیر، مهاجرت و تمایز، امری ضروری است. با این حال، یکی از چالش‌های موجود، تکثیر تعداد کافی از سلول‌های بنیادی از بافت‌های محدود است. به علاوه، تاثیر کشت دراز مدت در محیط کشت بر روی قابلیت بقای سلول‌های بنیادی، مانند اختلالات تولید و تکثیر، یک چالش بزرگ دیگر است [۹]. میزان بقاء سلولی در استفاده بالینی سلول‌های بنیادی کم می‌باشد، به گونه‌ای که بیش از ۹۰ درصد سلول‌های بنیادی در طی ۲۴ ساعت اول پیوند تحت نکروز یا آپوپتوز قرار می‌گیرند [۱۰].

با توجه به موارد فوق، بسیاری از پژوهشگران از استراتژی‌های مختلف جهت بهینه‌سازی شرایط کشت MSCs برای بهبود رفتار سلولی در محیط کشت استفاده کردند [۱۱]. از میان این استراتژی‌ها، نگهداری سلول‌ها تحت شرایط هیپوکسی قبل از استفاده آن‌ها توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده است [۱۲].

در محیط کشت Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco) حاوی ۱۰ درصد فسفات بافر سالین (FBS) Fetal Bovine Serum (Gibco) ، ۱ درصد پنی‌سیلین/استرپتومایسین (Penicillin-Streptomycin; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) با تراکم  $1 \times 10^4$  سلول در هر چاهک در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO<sub>2</sub> کشت داده شدند. برای به‌دست آوردن دوز مناسب کلرید کبالت، از سلول‌های پاساژ ۴ استفاده شد. بدین منظور در حدود ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک میکروپلیت‌های ۲۴ خانه کاشته و سلول‌ها در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت با سه دوز ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومول کلرید کبالت (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) تیمار شدند. لازم بذکر است برای هر دوز ۵ تکرار بیولوژیک به همراه کنترل صورت گرفت و (MTT) 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma, St. Louis, MO) برای تعیین دوز مناسب انجام شد تا بهترین دوز و بهترین زمان تیمار برای مطالعه اصلی به‌دست آید. پس از تیمار، محیط رویی سلول‌ها خارج شد و بعد از ۲-۳ بار شست‌وشو با PBS به هر چاهک میکروپلیت ۲۴ خانه ۲۷۰ میکرولیتر محیط کشت و ۳۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور CO<sub>2</sub> قرار داده شد. پس از سپری شدن این مدت، محیط رویی هر چاهک تخلیه و به منظور حل شدن بلورهای فورمازان ۳۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکساید Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma, St. Louis, MO) به آن‌ها اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی قرار داده شد. بعد از گذشت این مدت، ۱۰۰ میکرولیتر از محتوی هر چاهک از میکروپلیت ۲۴ خانه به چاهک‌های مشخص از یک میکروپلیت ۹۶ خانه منتقل شد. جذب نوری محلول‌ها در طیف نوری ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه ELISA reader (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Anthos 2020 ساخت کشور انگلستان و با مشخصات Microplate Readers, Biochrom Ltd., UK خوانده شد [۱۸]. برای هر گروه آزمایش ۴ بار تکرار شد.

تزریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از چربی انسانی. پس از به‌دست آوردن دوز بهینه با روش MTT، سلول‌های پاساژ ۴ به دو گروه نورموکسی و هیپوکسی تقسیم شدند. در گروه نورموکسی سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد پنی‌سیلین/استرپتومایسین کشت داده شدند و در گروه هیپوکسی علاوه بر موارد ذکر شده ۱۰۰ میکرومول کلرید کبالت نیز به محیط کشت اضافه گردید. سلول‌های هر دو گروه به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند و

برداشتن تخمدان‌ها (اوارکتومی) جهت ایجاد مدل پوکی استخوان. ابتدا جهت بی‌هوشی از ترکیب کتامین (Rotex, Germany) به میزان ۵۰ mg/kg و دیازپام (جابر بن حیان، ایران) به میزان ۵ mg/kg به صورت تزریق داخل عضلانی استفاده شد. پس از بی‌هوش شدن موش‌ها، موش‌ها به پهلو خوابانده شده و برش پوستی دو طرفه به طول تقریبی ۲ سانتی‌متر در ناحیه کمری تحت شرایط استریل ایجاد شد و پس از برش عضلات ناحیه، لوله تخمدان به همراه تخمدان خارج گردید. سپس، تخمدان به همراه بخش کوچکی از لوله تخمدان برداشته شد و نهایتاً مابقی لوله تخمدان وارد حفره شکم شده، عضلات و پوست ناحیه بخیه شدند. از آنتی‌بیوتیک سفتریاکسون (جابر بن حیان، ایران) به میزان ۵۰ mg/kg به مدت ۴۸ ساعت به صورت پیشگیرانه جهت جلوگیری از آلودگی‌های میکروبی استفاده شد [۱۶].

تأیید پوکی استخوان با تعیین دانسیته استخوانی توسط سی تی اسکن. سه و نیم ماه پس از اوارکتومی جهت تأیید پوکی استخوان، دانسیته استخوان‌های تیبیا هر دو سمت با روش سی تی اسکن تعیین شد. موش‌ها با استفاده از ترکیب کتامین/دیازپام (۵۰ mg/kg کتامین و ۵ mg/kg دیازپام) به صورت تزریق داخل صفاقی تحت بی‌هوشی عمومی قرار گرفته و استخوان‌های تیبیا هر دو سمت با دستگاه سی تی اسکن (Toshiba Aquilion 16, Japan) (از نوع انسانی) با شرایط (KV=100, ma=50, sections=2 mm, and FOU=240 mm) و توسط رادیولوژیست بررسی و دانسیته استخوانی با واحد هانسفیلد (Hounsfield unit; HU) گزارش شد [۱۷]. لازم بذکر است که رادیولوژیست از گروه‌ها هیچ‌گونه اطلاعاتی نداشت. پس از مقایسه واحد هانسفیلد و تأیید پوکی استخوان، گروه‌بندی به این صورت انجام شد: موش‌های اوارکتومی شده دریافت‌کننده فسفات بافر سالین (Phosphate Buffer Saline (PBS) (۸ سر: گروه شم)، موش‌های اوارکتومی شده دریافت‌کننده سلول‌های نورموکسی (۸ سر: گروه نورموکسی) و موش‌های اوارکتومی شده دریافت‌کننده سلول‌های هیپوکسی (۸ سر: گروه هیپوکسی).

#### مرحله آزمایشگاهی (In vitro)

تهیه سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از چربی انسانی. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از چربی انسانی Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells; (hAD-MSCs) (از شرکت بن‌یاخته (کشور ایران) با کد IR.MUMS.REC.1398.126 تهیه شد. بررسی سمیت سلولی و انتخاب دوز بهینه

شرکت Bio-Rad انتقال داده شدند. سپس، غشاء PVDF با استفاده از محلول تریس- بافر سالین حاوی توئین ۲۰ (TBST) Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20 (BSA) Bovine Serum Albumin 5 گاوی سرم (Sigma) به مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه برای بلوکه کردن پروتئین‌های غیراختصاصی بلوک شدند. کاغذ PVDF از محلول TBST بلوک‌کننده خارج شد و با TBST 1X شست‌وشو شد. آنتی‌بادی اولیه (Cat No: orb216126; Biorbyt, UK) مطابق با رقت پیشنهادی (۱:۲۵۰۰) با TBST 1X رقیق شد. به این صورت که برای هر کاغذ ۳ میکرولیتر (۱۰۰ μL) آنتی‌بادی اولیه با ۳ ml از TBST 1X کاملاً مخلوط و به کاغذ اضافه شد. پس از گذشت مدت زمان لازم (یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد)، مجدداً کاغذها ۳ بار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه با TBST 1X شست‌وشو شد. در مرحله‌ی بعدی، غشاء PVDF به منظور حذف آنتی‌بادی‌های اضافی توسط محلول TBST 1X 3 بار هر کدام به مدت ۱۰ دقیقه شست‌وشو و سرانجام آنتی‌بادی‌های ثانویه کونژوگه با (Cat No: ab7074; Biotin, abcam) با رقت ۱:۱۰۰۰ آماده گردید. یعنی، برای هر کاغذ ۱ μL آنتی‌بادی ثانویه با ۳ ml از TBST 1X کاملاً مخلوط و به کاغذ PVDF ریخته شد. در این مرحله نیز ظرف روی راکر در حالت تکان ملایم تنظیم شد. پس از گذشت مدت زمان لازم (یک ساعت در دمای اتاق)، مجدداً کاغذها ۳ بار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه با TBST 1X شست‌وشو شد. سپس، جهت ظاهر شدن باندها، به بلات‌ها محلول ECL (۵۰۰ میلی‌لیتر) و H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (۵۰۰ میلی‌لیتر) زده شد و به محض مشاهده نور فیلم رادیوگراف را روی بلات گذاشته و سپس فیلم رادیوگراف را در محلول ظهور و سپس ثبوت قرار دادیم. در نهایت، توسط نرم‌افزار Gel Analyser باندها ظاهر شده را آنالیز شدند. سپس، مساحت زیر سطح منحنی برای هر فاکتور و کنترل آن یعنی بتا-اکتین (برای نرمالیزه کردن پروتئین cell signaling (Cat No: 4967; technology, USA) محاسبه شده و شدت نسبی با تقسیم مساحت زیر سطح منحنی هر فاکتور به مساحت زیر سطح منحنی بتا-اکتین به دست آمد. نتایج را با گروه کنترل برای هر کدام از سلول‌ها مقایسه شد [۲۰].

بررسی میزان ترشح فاکتورهای رشد و سیتوکین‌های پیش‌التهابی در بافت استخوانی تیبا به روش الیزا جهت بررسی میزان ترشح فاکتورهای رشد (Cat No: IGF-1 (MG100, R&D, USA) و (Cat No: TGF-β (R&D, USA) و سیتوکین‌های پیش‌التهابی (Cat No:

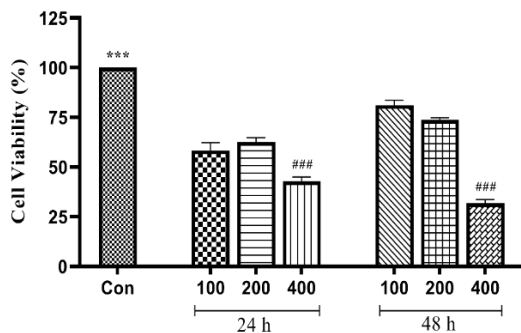
پس از گذشت ۴۸ ساعت به روش سیستمی و از طریق ورید دمی، ۱۰۶ سلول به موش‌های گروه نورموکسی و هیپوکسی و ۰/۵ سی‌سی PBS به گروه شم تزریق شد. دو ماه پس از مداخله، با جدا کردن پوست و عضلات ناحیه ساق، استخوان‌های تیبا چپ و راست به‌طور کامل خارج گردید و در یخچال منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس، جهت ارزیابی فاکتور القاء‌کننده هیپوکسی Hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) از روش وسترن‌بلات و جهت ارزیابی فاکتورهای رشد Insulin-like Growth Factors (IGF-1) (Cat No: MG100, R&D, USA) و Transforming Growth Factor Beta (TGF-β) (Cat No: DB100C, R&D, USA) و سیتوکین‌های پیش‌التهابی Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-α) (Cat No: IL-1β) Interleukin-1beta (Cat No: RTA00, R&D, USA) و (Cat No: RLB00, R&D, USA) از روش الیزا استفاده شد [۱۹].

روش وسترن‌بلات. به منظور استخراج پروتئین، در ابتدا، ۱۰۰ میکرولیتر محلول لیز سلولی Pro-PRETm (iNtRON Biotechnology, Korea) را روی سلول‌های مشتق شده از استخوان تیبا سمت راست ریخته شد و سپس عمل لیز سلول‌ها با کمک هموژنایزر بر روی یخ انجام شد. بعد از انجام لیز سلولی، تعلیق سلولی به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سرانجام، سوسپانسیون سلولی به‌دست آمده حاوی محلول لیز سلولی و سلول‌های لیز شده را با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (Hettich universal 320R, Germany) کرده و محلول بالایی یک‌دست هموژن برداشته شد. سپس، محلول بالایی توسط روش پروتئین‌سنجی با استفاده از روش پروتئین‌سنجی BCA (iNtRON Biotechnology, Korea) و دستگاه اسپکتوفوتومتری (Smartspec Plus spectrophotometer, Bio-Rad) محاسبه شد.

برای انجام وسترن‌بلات در این مطالعه از سیستم عمودی TV100 (Scie-Plas Ltd, UK) با یونیت‌های ژلی ۱۰×۱۰ سانتی‌متری و دستگاه مولد برق (Consort-EV202 (Sigma) استفاده شد. به‌طور خلاصه، مقدار ۱۵ میکروگرم از محلول‌های پروتئینی برداشته و تحت شرایط احیاء با استفاده از سرنگ همیلتون بر گودی ژل SDS-PAGE (ژل فوقانی) بارگذاری شدند. در یکی از گودی‌ها پروتئین مارکر pre-stained (Fermentas, USA) نیز بارگذاری شدند. در مرحله ترانسفرینگ، پروتئین‌های ران شده در طول ستون عمودی ژل به غشاهای ۰/۲ میکرومتری کاغذ پی وی دی اف (PVDF)

نگرفته بودند ( $681/16 \pm 6/43$ ) وقوع پوکی استخوان تایید شد ( $P < 0/001$ ).

اثرات کلرید کبالت بر زنده ماندن سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از چربی انسانی. نتایج تست سمیت سلولی با روش MTT نشان داد که پره کاندیشن شدن سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از چربی انسانی با دوزهای مختلف کلرید کبالت (۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومول) به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت منجر به کاهش زنده ماندن سلول‌ها نسبت به گروه کنترل شد ( $P < 0/001$ ). با این حال، پره کاندیشن شدن سلول‌ها با ۱۰۰ میکرومول کلرید کبالت به مدت ۴۸ ساعت بیش‌ترین میزان زنده ماندن را در مقایسه با دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومول نشان داد ( $P < 0/001$ ). دوز ۴۰۰ میکرومول کلرید کبالت به مدت ۴۸ ساعت بیش‌ترین میزان مرگ سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از چربی انسانی را نشان می‌دهد ( $P < 0/001$ ) (شکل ۱).



شکل ۱. ارزیابی زنده ماندن سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی انسانی پس از مواجهه با دوزهای مختلف (۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومول) کلرید کبالت به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت.  $***p < 0/001$  در مقایسه با گروه‌های دریافت کننده کلرید کبالت با دوزهای مختلف (۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومول) به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت و  $###p < 0/001$  در مقایسه با گروه‌های دریافت کننده کلرید کبالت با دوزهای مختلف (۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومول) به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت.

نتایج ارزیابی دانسیته بافت استخوانی تیبا با روش سی تی اسکن. دو ماه پس از مداخله با استفاده از سی تی اسکن دانسیته کال استخوانی در گروه‌های شم، نورموکسی و هیپوکسی مورد ارزیابی قرار گرفت و مقایسه عدد هانسفیلد نشان داد که بین گروه هیپوکسی و گروه شم اختلاف آماری معنی‌داری وجود دارد ( $P < 0/01$ ) اما بین گروه هیپوکسی و نورموکسی اختلاف معنی‌دار نبوده است (شکل ۲).

نتایج ارزیابی بیان فاکتور القاءکننده هیپوکسی به روش وسترن بلات. نتایج ارزیابی بیان فاکتور القاءکننده هیپوکسی ( $HIF-1\alpha$ ) در بافت استخوان تیبا سمت راست به روش وسترن بلات نشان داد که بیان این فاکتور در گروه هیپوکسی (با دوز ۱۰۰ میکرومول کلرید کبالت به مدت ۴۸ ساعت) نسبت به گروه‌های شم ( $P < 0/001$ ) و نورموکسی ( $P < 0/05$ )

(Cat No: RLB00, و RTA00, R&D,USA)  $TNF-\alpha$

IL- $1\beta$  (R&D,USA) در بافت استخوان تیبا سمت چپ، دو ماه پس از مداخله میزان ترشح این فاکتورها به روش الایزا و طبق پروتکل کیت اندازه‌گیری شد. هر کیت حاوی میکروپلیت، محلول‌های استاندارد، کنترل، کونزوگه، کالیبراتور، متوقف‌کننده، بافر شست‌وشو و معرف‌های رنگی A و B بود.

مراحل آماده‌سازی نمونه‌ها و محلول‌ها طبق راهنمای کیت انجام شد و سپس جهت بررسی میزان ترشح فاکتورهای رشد مراحل زیر به ترتیب صورت گرفت. این مراحل به ترتیب شامل موارد زیر بودند: در ابتدا، اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر محلول کالیبراتور به هر چاهک میکروپلیت موجود در کیت که توسط آنتی‌بادی مونوکلونال مخصوص برای فاکتور رشد پوشیده شده است و سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول‌های استاندارد، کنترل و نمونه (بافت استخوان) به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. بعد از آن، آسپیره کردن هر چاهک و شست‌وشو با بافر شست‌وشو انجام شد، ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونزوگه به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. در ادامه کار، ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا به هر چاهک اضافه شد، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید، ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده به هر چاهک اضافه شد و در نهایت جذب نوری محلول‌ها در طیف نوری ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه ELISA- reader ساخت کشور انگلستان با Anthos 2020 Microplate Readers، مشخصات Biochrom Ltd., UK خوانده شد [۲۱]. برای تعیین میزان ترشح فاکتورهای رشد و سیتوکین‌های پیش‌التهابی به طور جداگانه برای هر گروه آزمایش ۴ بار تکرار شد.

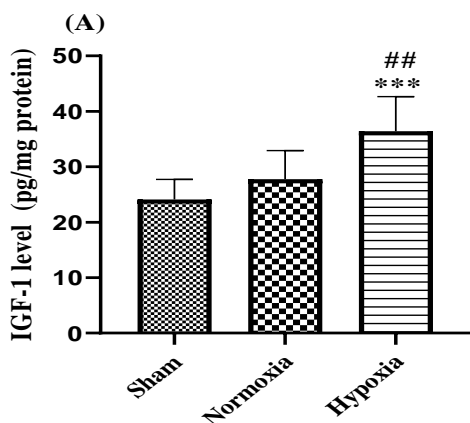
تجزیه و تحلیل آماری. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار گراف پد پریزم (Pad Graph Prism) نسخه ۸ انجام شد. از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی کرامر برای ارزیابی تفاوت‌های معنی‌داری بین گروه‌های تجربی استفاده شد و به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شدند.  $P < 0/05$  به عنوان یک تفاوت آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

## نتایج

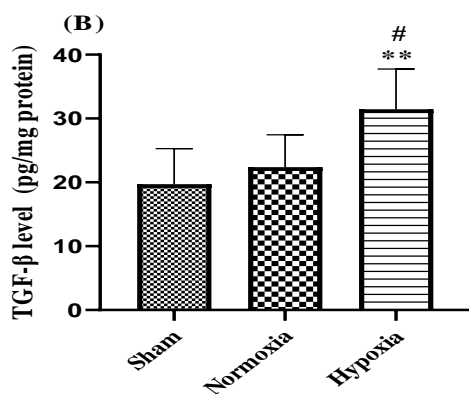
نتایج دانسیتومتری جهت تایید پوکی استخوان. سه و نیم ماه پس از اوارکتومی جهت تأیید پوکی استخوان، دانسیته استخوان‌های تیبا هر دو سمت با روش سی تی اسکن تعیین شد. پس از مقایسه واحد هانسفیلد موش‌های اوارکتومی شده ( $508/0 \pm 16/54$ ) با موش‌هایی که تحت جراحی فوق قرار



به طور معنی‌داری افزایش یافته است. در حالی که، بین گروه نورموکسی و شم تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نشده است (شکل ۳).  
 به طور معنی‌داری افزایش یافته است. علاوه بر این، بیان فاکتور رشد  $TGF-\beta$  در بافت استخوان تیبیا در گروه هیپوکسی (با دوز ۱۰۰ میکرومول کلرید کبالت به مدت ۴۸ ساعت) نسبت به گروه‌های شم ( $P < 0.01$ ) و نورموکسی ( $P < 0.05$ ) به طور معنی‌داری افزایش یافته است (شکل B4). اما، بین گروه نورموکسی و شم در هیچ‌کدام از فاکتورهای رشد تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نشده است (شکل A4 و



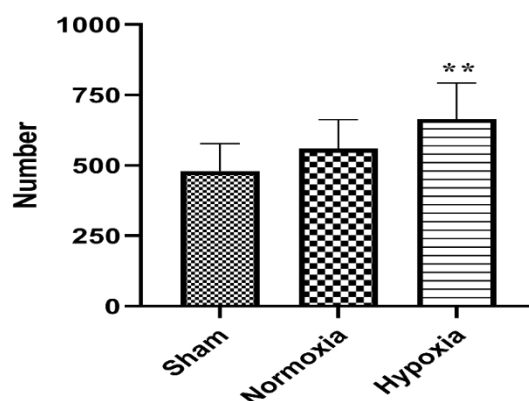
(۴B)



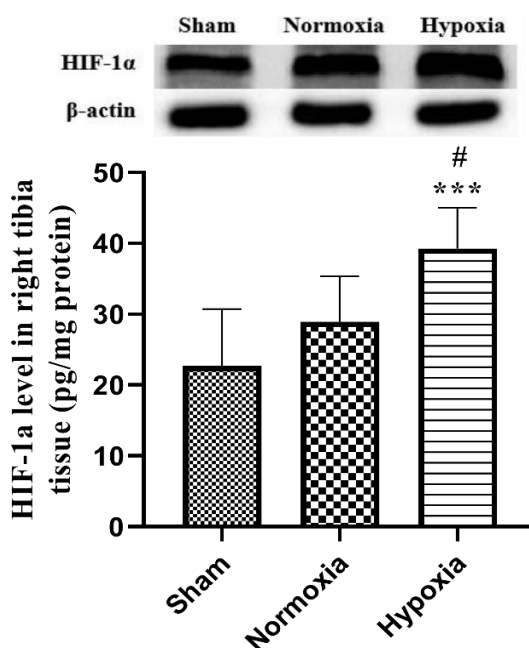
شکل ۴: اثرات سلولهای مواجهه یافته در شرایط هیپوکسی (با دوز ۱۰۰ میکرومول کلرید کبالت به مدت ۴۸ ساعت) و نورموکسی بر روی فاکتورهای رشد (A) IGF-1 و (B)  $TGF-\beta$  در بافت استخوان تیبیا سمت چپ.  $p < 0.01$  و  $p < 0.001$  در مقایسه با گروه شم و  $p < 0.05$  و  $p < 0.01$  در مقایسه با گروه نورموکسی. (# برای مقایسه گروه هیپوکسی با شم و # برای مقایسه گروه هیپوکسی و نورموکسی می‌باشد).

نتایج ارزیابی ترشح سیتوکین‌های پیش التهابی به روش الایزا. همان‌طور که در شکل A5 نشان داده شده است بیان ترشح سیتوکین پیش التهابی  $TNF-\alpha$  در بافت استخوان تیبیا سمت چپ در گروه نورموکسی ( $P < 0.001$ ) در مقایسه با گروه شم تفاوت معنی‌داری نشان داد. همچنین، بین گروه هیپوکسی (با دوز ۱۰۰ میکرومول کلرید کبالت به مدت ۴۸ ساعت) در مقایسه با گروه‌های شم ( $P < 0.001$ ) و نورموکسی ( $P < 0.05$ ) تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. به عبارت دیگر، مقدار  $TNF-\alpha$  در گروه‌های نورموکسی و هیپوکسی در مقایسه

شکل ۲: اثرات سلولهای مواجهه یافته در شرایط هیپوکسی (با دوز ۱۰۰ میکرومول کلرید کبالت به مدت ۴۸ ساعت) و نورموکسی بر روی عدد هانسفیلد بافت استخوان تیبیا راست یا چپ.  $p < 0.01$  در مقایسه با گروه شم.



شکل ۳: اثرات سلولهای مواجهه یافته در شرایط هیپوکسی (با دوز ۱۰۰ میکرومول کلرید کبالت به مدت ۴۸ ساعت) و نورموکسی بر روی عدد هانسفیلد بافت استخوان تیبیا راست یا چپ.  $p < 0.01$  در مقایسه با گروه شم.



شکل ۳: اثرات سلولهای مواجهه یافته در شرایط هیپوکسی (با دوز ۱۰۰ میکرومول کلرید کبالت به مدت ۴۸ ساعت) و نورموکسی بر روی بیان پروتئین  $HIF-1\alpha$  در بافت استخوان تیبیا سمت راست.  $p < 0.001$  در مقایسه با گروه نورموکسی. ( $p < 0.05$  و  $p < 0.01$  در مقایسه با گروه هیپوکسی با شم و # برای مقایسه گروه هیپوکسی و نورموکسی می‌باشد).

نتایج ارزیابی ترشح فاکتورهای رشد به روش الایزا. همان‌طور که در شکل A4 نشان داده شده است بیان فاکتور رشد IGF-1 در بافت استخوان تیبیا سمت چپ در گروه هیپوکسی (با دوز ۱۰۰ میکرومول کلرید کبالت به مدت ۴۸ ساعت) نسبت به گروه‌های شم ( $P < 0.001$ ) و نورموکسی

### بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه اثر تزریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از چربی انسانی (Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells; hAD-MSCs) پره‌کاندیشن شده با کلریدکالبت جهت القاء هیپوکسی در موش‌های اوارکتومی شده مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان‌دهنده افزایش ترشح  $TGF\beta$ ،  $IGF1$  و  $HIF-1\alpha$  و همچنین کاهش  $IL-1\beta$  و  $TNF\alpha$  بود.

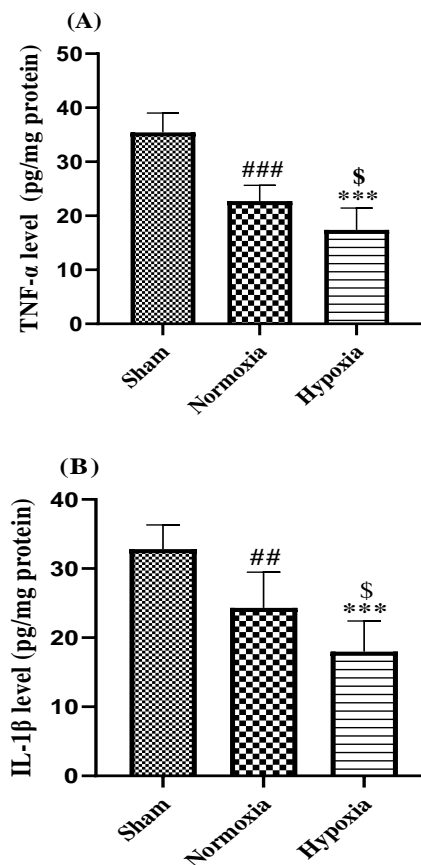
پوکی استخوان یک بیماری ناتوان‌کننده است که در اثر از دست دادن سیستمیک استخوان در سیستم اسکلتی عضلانی ایجاد می‌شود. به غیر از داروی هورمون پاراتیروئید، درمان‌های فعلی مورد تأیید سازمان غذا و دارو عمدتاً شامل عواملی هستند که هدفشان مهار تحلیل استخوان است. این نوع درمان‌ها با عوارض جانبی جدی همراه هستند و در نتیجه نیاز به یک رویکرد جایگزین برای درمان پوکی استخوان می‌باشد [۲۳].

با توجه به این‌که عملکرد نادرست MSCs مغز استخوان، عمدتاً در پیشرفت عارضه پوکی استخوان نقش دارد [۲۴]؛ بنابراین بهبود تمایز استئوژنیک MSCs مغز استخوان استئوپروتیک ممکن است در درمان بیماران مبتلا به پوکی استخوان کاربردی باشد [۲۵].

اگرچه که مغز استخوان، اولین و شناخته شده‌ترین منبع MSCs است، اما روش جمع‌آوری نمونه از مغز استخوان روشی تهاجمی است. هم‌چنین، تعداد، توان تکثیر و تمایز این سلول‌ها با افزایش سن، کاهش می‌یابد [۲۶]. پریوستوم، اولین سلول‌هایی هستند که در ترمیم استخوان و شکستگی، شرکت می‌کنند [۲۷]. اما از این سلول‌ها نمی‌توان در مهندسی بافت استفاده کرد. چرا که علاوه بر دشواری جداسازی این لایه‌ی سلولی از روی استخوان، برداشت پریوستوم بر هموستاز و بهبود طبیعی بافت استخوان، اثر منفی دارد. وجود چنین شرایطی، دسترسی به منابع جایگزین MSCs را جهت انجام مطالعات پایه‌ای و بالینی، طلب می‌کند. بافت چربی از نظر رفتار سلولی در محیط کشت و قدرت تمایزی تفاوتی با سلول‌های مشتق شده از مغز استخوان ندارند [۲۸]. هم‌چنین، MSCs چربی، از توانایی خودتکثیری بیشتری برخوردار هستند [۲۹] و در پاساژهای طولانی مدت، زمان تقسیم کم‌تر و درصد زنده‌مانی بیشتری را دارند [۳۰] که وجود چنین ویژگی‌هایی سبب می‌شود که MSCs بافت چربی، منبع مناسبی برای سلول درمانی در کلینیک محسوب شوند.

عملکرد نادرست MSCs مغز استخوان، عمدتاً در پیشرفت عارضه پوکی استخوان نقش دارد [۳۱]؛ تزریق AD-MSCs

با گروه شم و هم‌چنین مقدار  $TNF-\alpha$  در گروه هیپوکسی در مقایسه با گروه نورموکسی کاهش قابل توجه نشان داد. به طوری که، کاهش ترشح  $TNF-\alpha$  در گروه هیپوکسی در مقایسه با گروه‌های نورموکسی و شم بسیار بیش‌تر می‌باشد. علاوه بر این، در شکل B5 نشان داده شده است که بیان ترشح سیتوکین پیش التهابی  $IL-1\beta$  در بافت استخوان تیبیا سمت چپ در گروه نورموکسی ( $P < 0/01$ ) در مقایسه با گروه شم تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بعلاوه، بین گروه هیپوکسی (با دوز ۱۰۰ میکرومول کلریدکالبت به مدت ۴۸ ساعت) در مقایسه با گروه‌های شم ( $P < 0/001$ ) و نورموکسی ( $P < 0/05$ ) تفاوت معنی‌داری وجود دارد. به عبارت دیگر، مقدار  $IL-1\beta$  در گروه‌های نورموکسی و هیپوکسی در مقایسه با گروه شم و هم‌چنین مقدار  $IL-1\beta$  در گروه هیپوکسی در مقایسه با گروه نورموکسی کاهش قابل توجه نشان داد. به طوری که، کاهش ترشح  $IL-1\beta$  در گروه هیپوکسی در مقایسه با گروه‌های نورموکسی و شم بسیار بیش‌تر می‌باشد.



شکل ۵: اثرات سلول‌های مواجهه یافته در شرایط هیپوکسی (با دوز ۱۰۰ میکرومول کلرید کالبت به مدت ۴۸ ساعت) و نورموکسی بر روی سیتوکین‌های پیش التهابی شامل  $TNF-\alpha$  (A) و  $IL-1\beta$  (B) در بافت استخوان تیبیا سمت چپ.  $p < 0/001$ ،  $***p < 0/001$ ،  $##p < 0/01$  و  $#p < 0/01$  در مقایسه با گروه نورموکسی. (در هر دو شکل (A) و (B) # برای مقایسه گروه نورموکسی با شم، \* برای مقایسه گروه هیپوکسی با شم و \$ برای مقایسه گروه هیپوکسی و نورموکسی می‌باشد).

در مطالعه انجام شده توسط Wagegg و همکاران مشاهده شد که پره کاندیشن کردن سلول‌ها در شرایط هیپوکسی منجر به افزایش تکثیر و تمایز سلول‌های مزانشیمی انسان می‌شود. به عبارت دیگر، القاءکننده‌های شیمیایی HIF-1 $\alpha$ ، استخوان‌سازی MSCs انسان را تسهیل می‌کنند. به طوری که، این تسهیل در شرایط نورموکسیک به میزان کم‌تری نسبت به شرایط هیپوکسیک بود [۴۳].

مکانیسم اثر کلریدکالت بر روی سلول‌های مزانشیمی عمدتاً توسط HIF-1 $\alpha$  تنظیم می‌شود. فاکتور HIF-1 $\alpha$  منجر به افزایش سنتز کلاژن، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی، فاکتورهای رشد و کاهش فاکتورهای التهابی می‌شود [۴۴]. در واقع، فاکتور HIF-1 $\alpha$  یک واسطه اصلی پاسخ سلولی به هیپوکسی است. در سال‌های اخیر، دست‌کاری درمانی مسیر HIF-1 $\alpha$  برای درمان اختلالات متابولیک استخوان، مانند پوکی استخوان، مورد توجه محققان ارتوپدی قرار گرفته است [۴۵].

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۹ توسط Chen و همکارانش انجام شد اثرات کلریدکالت با دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول بر روی میزان تکثیر، آپوپتوز، توانایی مهاجرت، و تمایز استخوانی سلول‌های بنیادی مشتق شده از دندان‌های شیری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که پره کاندیشن کردن با کلریدکالت منجر به افزایش سطح HIF-1 $\alpha$  به صورت وابسته به دوز شد [۱۹]. مطالعه ما هم‌راستا با این مطالعه بود. به طوری که، در مطالعه ما پره کاندیشن کردن hAD-MSCs با دوز ۱۰۰ میکرومول کلریدکالت به مدت ۴۸ ساعت منجر به افزایش بیان HIF-1 $\alpha$  در بافت استخوان تیبیا راست یا چپ در گروه هیپوکسی نسبت به گروه‌های شم و نورموکسی شد. با توجه به افزایش بیان فاکتور HIF-1 $\alpha$  و نقش این فاکتور در بیان ژن‌های استخوان‌ساز می‌توان این نتیجه را گرفت که کلریدکالت با ایجاد شرایط مشابه ریز محیط مغز استخوان در محیط *in vitro* می‌تواند به عنوان یک روش کارآمد برای پره کاندیشن MSCs قبل از تزریق استفاده شود.

رشد و تمایز استئوبلاستی توسط فاکتورهای موضعی و سیستمیک، فاکتورهای رشد و سیتوکین‌ها کنترل می‌شود [۴۶]. علاوه بر TGF- $\beta$ ، IGFs نیز برای فرایندهای رشد و تمایز انواع بافت‌ها اهمیت دارد. مطالعات نشان می‌دهد مسیر سیگنالی IGF-I در استئوبلاست‌ها و استئوسیت‌ها برای کنترل تکثیر و تمایز سلولی لازم است [۴۷].

با توجه به اهمیت فاکتورهای رشد در مسیر سیگنالینگ استئوژنیزس، دو فاکتور رشد IGF-I و TGF- $\beta$  در مطالعه ما مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که میزان ترشح این

می‌تواند شرایط پوکی استخوان را بهبود بخشد و باعث افزایش ترشح فاکتورهای رشدی شود که فرایند استخوان‌زایی را تسهیل می‌کنند [۳۲]. در واقع، AD-MSCs قادر به ترشح فاکتورهای رشد مانند فاکتور رشد مشتق از پلاکت، فاکتور رشد شبه انسولین و فاکتورهای رشد TGF- $\beta$ 1 می‌باشند [۳۳]. در مطالعه انجام شده توسط Mo و همکاران در سال ۲۰۲۲ مشاهده شد که ریز محیط التهابی بر تمایز استخوانی MSCs تأثیر می‌گذارد. به طوری که، TNF- $\alpha$  و IL-1 $\beta$  نقش‌های متفاوتی در تمایز استخوان‌سازی MSCs از طریق مسیرهای سیگنال مختلف ایفا می‌کنند [۳۴]. هم‌چنین، شواهد نشان می‌دهد که سیتوکین‌های التهابی نقش مهمی در تنظیم تخریب استخوان و استئوبلاستوزن دارند [۳۵]. فاکتور رشد TGF- $\beta$  در بازسازی استخوان پس از تولد نقش مهمی ایفا می‌کند. چندین گزارش نشان دادند که TGF- $\beta$  تکثیر استئوبلاست‌ها و تمایز اولیه استئوبلاست‌ها را تحریک می‌کند [۳۶]. هم‌چنین، IGF1 تمایز اولیه MSCs به استئوبلاست‌ها را تنظیم می‌کند [۳۷]. بر همین اساس، در مطالعه حاضر به تأثیرات هیپوکسی بر میزان بیان این فاکتورها پرداخته شده است.

سلول‌های بنیادی در یک ریز محیط منحصر به فرد قرار دارند که توسط عوامل سلولی و غیرسلولی تنظیم می‌شوند [۳۸]. یکی از چالش‌های تحقیقات بر روی سلول‌های بنیادی بالغ، تعیین شرایط بهینه برای افزایش تعداد سلول با حفظ وضعیت سلول‌های بنیادی است [۳۹]. شرایط کشت معمولی حاوی فشار اکسیژن بسیار بالاتر از شرایط فیزیولوژیکی است. طبق مطالعات فشار اکسیژن (اکسیژن ۲۰ درصد) با القای پیری زودرس، آسیب DNA، ناهنجاری‌های کروموزومی و تغییرات متابولیکی منجر به از دست دادن ویژگی‌های سلول‌های بنیادی می‌شود [۴۰].

مطالعات نشان می‌دهد که هیپوکسی منجر به افزایش تکثیر در سلول‌های مزانشیمی می‌شود و یک عامل ضروری برای تمایز و بلوغ سلول‌های مزانشیمی است [۴۱]. اثرات هیپوکسی معمولاً توسط عوامل القاءکننده هیپوکسی (HIFs)، یعنی HIF-1 $\alpha$  و HIF-2 $\alpha$ ، به‌عنوان یک فاکتور اصلی رونویسی، تنظیم می‌شود. بیش از ۱۰۰۰ ژن، هدف HIF هستند که به طور مستقیم یا غیرمستقیم توسط آن تنظیم می‌شوند [۴۲].

در مغز استخوان، یک گرادبان غلظتی اکسیژن وجود دارد که شرایط هیپوکسیک را برای سلول‌های استرومایی و بنیادی ایجاد می‌کند [۴۱]. بنابراین، تحقیقات انجام شده بر روی ویژگی‌های MSCs، مانند تکثیر، تمایز، پیری، تعادل متابولیکی و سایر ویژگی‌های فیزیولوژیکی، باید در شرایط هیپوکسیک، مشابه ریز محیط طبیعی این سلول‌ها، انجام شود.



Runt-Related Transcription Growth Factor (VEGF)  
Bone Morphogenetic Protein 2, Factor 2 (RUNX2)  
Receptor Activator Of Nfκ-B Ligand و (BMP2)  
(RANKL) نیز نقش دارند عدم بررسی این مارکرها از دیگر محدودیت‌های این مطالعه می‌باشد.

مطالعه حاضر نشان داد که پره کاندیشن شدن hAD- MSCs با کلریدکالت با دوز ۱۰۰ میکرومول به مدت ۴۸ ساعت منجر به افزایش بیان فاکتور HIF-1α، افزایش ترشح فاکتورهای رشد IGF-I و TGF-β و کاهش ترشح فاکتورهای التهابی TNF-α و IL-1β شد. با توجه به این نتایج می‌توان گفت که کلریدکالت یک محیط مشابه با ریز محیط مغز استخوان در محیط کشت ایجاد می‌کند و این منجر به افزایش کارایی و اثرات سلول‌های تزریق شده بر روی بیان فاکتورهای رشد و التهابی از طریق افزایش بیان فاکتور HIF-1α شود. بر همین اساس، پیشنهاد می‌شود در سلول درمانی برای بیماری پوکی استخوان از روش‌های القاء‌کننده شرایط ریز محیط مغز استخوان همانند کلریدکالت استفاده شود.

### تشکر و قدردانی

این پژوهش در قالب طرح تحقیقاتی در گروه علوم تشریح و علوم اعصاب دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شده است. بدین‌وسیله بر خود لازم می‌دانیم از تمامی اعضا این دو گروه تقدیر و تشکر نمایم. هم‌چنین از معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی مشهد، جهت حمایت مالی از این تحقیق نیز قدردانی می‌کنیم.

### مشارکت و نقش نویسندگان

محمود گرجی ولوکلا: ایده پردازی اولیه، انجام آزمایش‌های عملی، آنالیز داده‌ها، نوشتن متن اولیه مقاله، بازنگری نهایی مقاله. حمیده بابالو: نوشتن متن اولیه مقاله، آنالیز داده‌ها. حامد خردمند: نوشتن متن اولیه مقاله، آنالیز داده‌ها. سمیه فلاح نژاد: مدیر پروژه، ایده پردازی اولیه، نوشتن متن اولیه مقاله، بازنگری نهایی مقاله.

### منابع

- [1] Loi F, Córdova LA, Pajarinen J, Lin TH, Yao Z, Goodman SB. Inflammation, fracture and bone repair. *Bone* 2016; 86: 119-130.  
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.02.020>  
PMid:26946132 PMCID:PMC4833637
- [2] Faienza MF, Ventura A, Marzano F, Cavallo L. Postmenopausal osteoporosis: the role of immune system cells. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013: 575936.  
<https://doi.org/10.1155/2013/575936>  
PMid:23762093 PMCID:PMC3677008

دو فاکتور در بافت استخوان تیپا در گروه دریافت‌کننده سلول‌های هیپوکسی در مقایسه با گروه‌های نورموکسی و کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. با توجه به افزایش بیان HIF-1α در گروه هیپوکسی و اثر این فاکتور بر روی بیان سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد می‌توان این نتیجه را گرفت که افزایش ترشح فاکتورهای رشد IGF-I و TGF-β در این مطالعه به احتمال زیاد ناشی از اثر القائی فاکتور HIF-1α می‌باشد و از طرفی این فاکتورها در بیان ژن‌های استخوان‌ساز نقش دارند. بنابراین، پره کاندیشن کردن MSCs با کلریدکالت ممکن است میزان بهبود بافت استخوان را تسهیل کرده و استخوان‌سازی را افزایش دهد.

مکانیسم‌های متعددی در تسریع سرعت از دست رفتن استخوان در شرایط کمبود استروژن نقش دارند که شامل افزایش تولید TNFα، IL-1 و IL-1β در ریز محیط استخوان توسط منوسیت‌ها، لنفوسیت‌های T و سلول‌های استرومایی استئوبلاست همراه با افزایش نسبت RANKL به استئوپروترنگرین می‌باشد. علاوه بر این، بیان بیش از حد IL-1β و IL-6 در پاتوفیزیولوژی بیماری‌های التهابی اثبات شده است. مطالعات نشان می‌دهند که TNF-α در روند از دست رفتن استخوان موثر بوده و افزایش آن با پیشرفت پوکی استخوان ارتباط دارد [۴۸]. در این مطالعه میزان ترشح سیتوکین‌های پیش التهابی TNF-α و IL-1β در بافت استخوان تیپا مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که میزان ترشح این سیتوکین‌ها در گروه دریافت‌کننده سلول‌های هیپوکسی در مقایسه با گروه‌های دریافت‌کننده سلول‌های نورموکسی و شم کم‌تر بود. علاوه بر این، این سیتوکین‌ها در گروه نورموکسی در مقایسه با گروه شم نیز کاهش نشان داد. همان‌طور که ذکر شد احتمالاً فاکتور HIF-1α منجر به کاهش ترشح فاکتورهای التهابی، خصوصاً در گروه دریافت‌کننده سلول‌های هیپوکسی، شد. بنابراین، به احتمال زیاد می‌توان بیان کرد که کاهش ترشح فاکتورهای التهابی در گروه هیپوکسی ناشی از اثر فاکتور HIF-1α باشد.

با توجه به این‌که مطالعات نشان می‌دهند که اثر هیپوکسی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مختلف نتایج یکسانی نداشته و تاثیر کلرید کالت به نوع سلول وابسته می‌باشد؛ از جمله محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به استفاده از یک نوع سلول اشاره کرد. هم‌چنین با توجه به این‌که در مسیر آبشار سیگنالی استخوان‌سازی علاوه بر فاکتورهای رشد و سیتوکین‌های التهابی، مارکرهاى استخوان‌سازی مانند کلاژن، Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) و Vascular Endothelial Growth Factor (bFGF)

- expression on NFkB and TGFβ signaling pathways in liver cancer cells. 2020. (Persian)  
<https://doi.org/10.29252/koomesh.22.3.529>
- [19] Chen Y, Zhao Q, Yang X, Yu X, Yu D, Zhao W. Effects of cobalt chloride on the stem cell marker expression and osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Cell Stress Chaperones* 2019; 24: 527-538.  
<https://doi.org/10.1007/s12192-019-00981-5>  
 PMid:30806897 PMCid:PMC6527733
- [20] Fallahnezhad S, Ghorbani-Taherdehi F, Sahebkar A, Nadim A, Kafashzadeh M, Kafashzadeh M, et al. Potential neuroprotective effect of nanomicellar curcumin on learning and memory functions following subacute exposure to bisphenol A in adult male rats. *Metab Brain Dis* 2023.  
<https://doi.org/10.1007/s11011-023-01257-9>  
 PMid:37843661
- [21] Valokola MG, Karimi G, Razavi BM, Kianfar M, Jafarian AH, Jaafari MR, et al. The protective activity of nanomicelle curcumin in bisphenol A-induced cardiotoxicity following subacute exposure in rats. *Environ Toxicol* 2019; 34: 319-329.  
<https://doi.org/10.1002/tox.22687>  
 PMid:30496632
- [22] Fallahnezhad S, Piryaei A, Darbandi H, Amini A, Ghoreishi SK, Jalalifirozkouhi R, et al. Effect of low-level laser therapy and oxytocin on osteoporotic bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2018; 119: 983-997.  
<https://doi.org/10.1002/jcb.26265>  
 PMid:28681933
- [23] Antebi B, Pelled G, Gazit D. Stem cell therapy for osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep* 2014; 12: 41-47.  
<https://doi.org/10.1007/s11914-013-0184-x>  
 PMid:24407712
- [24] Berebichez-Fridman R, Montero-Olvera PR. Sources and clinical applications of mesenchymal stem cells: State-of-the-art review. *Sultan Qaboos Univ Med J* 2018; 18: e264-e277.  
<https://doi.org/10.18295/sgumj.2018.18.03.002>  
 PMid:30607265 PMCid:PMC6307657
- [25] Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration* 2013; 85: 3-10.  
<https://doi.org/10.1159/000345615>  
 PMid:23257690
- [26] Cui L, Liu B, Liu G, Zhang W, Cen L, Sun J, et al. Repair of cranial bone defects with adipose derived stem cells and coral scaffold in a canine model. *Biomaterials* 2007; 28: 5477-5486.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.08.042>  
 PMid:17888508
- [27] Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimões R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. *Clin Oral Implants Res* 2014; 25: 879-893.  
<https://doi.org/10.1111/clr.12194>  
 PMid:23742162
- [28] Noordin S, Allana S, Umer M, Jamil M, Hilal K, Uddin N. Unicameral bone cysts: Current concepts. *Ann Med Surg (Lond)* 2018; 34: 43-49.  
<https://doi.org/10.1016/j.amsu.2018.06.005>  
 PMid:30224948 PMCid:PMC6138978
- [29] Asnaashari M, Safavi N. Application of Low level Lasers in Dentistry (Endodontic). *J Lasers Med Sci* 2013; 4: 57-66.
- [30] Valchinov ES, Pallikarakis NE. Design and testing of low intensity laser biostimulator. *Biomed Eng Online* 2005; 4: 5.  
<https://doi.org/10.1186/1475-925X-4-5>  
 PMid:15649327 PMCid:PMC549208
- [31] Yuan LL, Guan YJ, Ma DD, Du HM. Optimal concentration and time window for proliferation and differentiation of neural stem cells from embryonic cerebral cortex: 5% oxygen preconditioning for 72 hours. *Neural Regen Res* 2015; 10: 1516-1522.  
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.165526>  
 PMid:26604915 PMCid:PMC4625520
- [32] Ye X, Zhang P, Xue S, Xu Y, Tan J, Liu G. Adipose-derived stem cells alleviate osteoporosis by enhancing osteogenesis and inhibiting adipogenesis in a rabbit model.  
 [3] Manolagas SC, O'Brien CA, Almeida M. The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 2013; 9: 699-712.  
<https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.179>  
 PMid:24042328 PMCid:PMC3971652
- [4] Bonjour JP, Chevalley T. Pubertal timing, bone acquisition, and risk of fracture throughout life. *Endocr Rev* 2014; 35: 820-847.  
<https://doi.org/10.1210/er.2014-1007>  
 PMid:25153348
- [5] Zallone A. Direct and indirect estrogen actions on osteoblasts and osteoclasts. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1068: 173-179.  
<https://doi.org/10.1196/annals.1346.019>  
 PMid:16831916
- [6] Callewaert F, Boonen S, Vanderschueren D. Sex steroids and the male skeleton: a tale of two hormones. *Trends Endocrinol Metab* 2010; 21: 89-95.  
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.09.002>  
 PMid:19837603
- [7] Rodríguez-Fuentes DE, Fernández-Garza LE, Samia-Meza JA, Barrera-Barrera SA, Caplan AI, Barrera-Saldaña HA. Mesenchymal stem cells current clinical applications: a systematic review. *Arch Med Res* 2021; 52: 93-101.  
<https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.08.006>  
 PMid:32977984
- [8] Jiang Y, Zhang P, Zhang X, Lv L, Zhou Y. Advances in mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of osteoporosis. *Cell Prolif* 2021; 54: e12956.  
<https://doi.org/10.1111/cpr.12956>  
 PMid:33210341 PMCid:PMC7791182
- [9] Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 568-584.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.11.001>  
 PMid:15010324
- [10] Jahangir AA. Washington health policy fellows. Bone-graft substitutes in orthopaedic surgery. *AAOS Now* 2008; 2: 1.
- [11] Hu C, Li L. Preconditioning influences mesenchymal stem cell properties in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med* 2018; 22: 1428-1442.  
<https://doi.org/10.1111/jcmm.13492>  
 PMid:29392844 PMCid:PMC5824372
- [12] Di Mattia M, Mauro A, Citeroni MR, Dufresne B, Peserico A, Russo V, et al. Insight into Hypoxia Stemness Control. *Cells* 2021; 10.  
<https://doi.org/10.3390/cells10082161>  
 PMid:34440930 PMCid:PMC8394199
- [13] Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 2012; 148: 399-408.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.021>  
 PMid:22304911 PMCid:PMC3437543
- [14] Nowak-Stępniewska A, Osuchowska PN, Fiedorowicz H, Trafny EA. Insight in hypoxia-mimetic agents as potential tools for mesenchymal stem cell priming in regenerative medicine. *Stem Cells Int* 2022; 2022: 8775591.  
<https://doi.org/10.1155/2022/8775591>  
 PMid:35378955 PMCid:PMC8976669
- [15] Zhang J, Feng Z, Wei J, Yu Y, Luo J, Zhou J, et al. Repair of critical-sized mandible defects in aged rat using hypoxia preconditioned BMSCs with Up-regulation of Hif-1α. *Int J Biol Sci* 2018; 14: 449-460.  
<https://doi.org/10.7150/ijbs.24158>  
 PMid:29725266 PMCid:PMC5930477
- [16] Vafaei A, Khorasani F, Seraj Z, Miladi-Gorji H, Rashidy-Pour A. Effects of forced exercise on object location memory and anxiety behaviour in morphine dependent ovariectomized rats. *Koomesh* 2020; 22. (Persian)  
<https://doi.org/10.29252/koomesh.22.4.704>
- [17] Fallahnezhad S, Amini A, Hajhossainlou B, Chien S, Dadras S, Rezaei F, et al. Combined effects of photobiomodulation and alendronate on viability of osteoporotic bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Photochem Photobiol B* 2018; 182: 77-84.  
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.03.015>  
 PMid:29627514
- [18] Khatami SS, Tavakoli F, Bagheri H, Salarinia R, Hesari A, GHasemi F. Effects of fibromodulin protein

- [41] Osathanon T, Vivatbutsiri P, Sukarawan W, Sriarj W, Pavasant P, Soampon S. Cobalt chloride supplementation induces stem-cell marker expression and inhibits osteoblastic differentiation in human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol* 2015; 60: 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.08.018> PMID:25244616
- [42] Di Mattia M, Mauro A, Delle Monache S, Pulcini F, Russo V, Berardinelli P, et al. Hypoxia-mimetic CoCl<sub>2</sub> agent enhances pro-angiogenic activities in ovine amniotic epithelial cells-derived conditioned medium. *Cells* 2022; 11. <https://doi.org/10.3390/cells11030461> PMID:35159271 PMCID:PMC8834320
- [43] Wagegg M, Gaber T, Lohanatha FL, Hahne M, Strehl C, Fangradt M, et al. Hypoxia promotes osteogenesis but suppresses adipogenesis of human mesenchymal stromal cells in a hypoxia-inducible factor-1 dependent manner. *PLoS One* 2012; 7: e46483. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046483> PMID:23029528 PMCID:PMC3459928
- [44] Oladipupo S, Hu S, Kovalski J, Yao J, Santeford A, Sohn RE, et al. VEGF is essential for hypoxia-inducible factor-mediated neovascularization but dispensable for endothelial sprouting. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 13264-13249. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101321108> PMID:21784979 PMCID:PMC3156154
- [45] Stegen S, van Gastel N, Eelen G, Ghesquière B, D'Anna F, Thienpont B, et al. HIF-1 $\alpha$  promotes glutamine-mediated redox homeostasis and glycogen-dependent bioenergetics to support postimplantation bone cell survival. *Cell Metab* 2016; 23: 265-279. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.01.002> PMID:26863487 PMCID:PMC7611069
- [46] Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res* 2010; 339: 189-195. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0832-8> PMID:19649655
- [47] Zou ML, Chen ZH, Teng YY, Liu SY, Jia Y, Zhang KW, et al. The smad dependent TGF- $\beta$  and BMP signaling pathway in bone remodeling and therapies. *Front Mol Biosci* 2021; 8: 593310. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.593310> PMID:34026818 PMCID:PMC8131681
- [48] Liao LN, Li CI, Wu FY, Yang CW, Lin CH, Liu CS, et al. Important gene-gene interaction of TNF- $\alpha$  and VDR on osteoporosis in community-dwelling elders. *PLoS One* 2019; 14: e0226973. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226973> PMID:31887189 PMCID:PMC6936796
- Cytotherapy 2014; 16: 1643-1655. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.07.009> PMID:25231892
- [33] Da Silva D, Crous A, Abrahamse H. Photobiomodulation: an effective approach to enhance proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells into osteoblasts. *Stem Cells Int* 2021; 2021: 8843179. <https://doi.org/10.1155/2021/8843179> PMID:33833810 PMCID:PMC8012132
- [34] Mo Q, Zhang W, Zhu A, Backman LJ, Chen J. Regulation of osteogenic differentiation by the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ : current conclusions and controversies. *Hum Cell* 2022; 35: 957-971. <https://doi.org/10.1007/s13577-022-00711-7> PMID:35522425
- [35] Kitaura H, Kimura K, Ishida M, Kohara H, Yoshimatsu M, Takano-Yamamoto T. Immunological reaction in TNF- $\alpha$ -mediated osteoclast formation and bone resorption in vitro and in vivo. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013: 181849. <https://doi.org/10.1155/2013/181849> PMID:23762085 PMCID:PMC3676982
- [36] Dalle Carbonare L, Innamorati G, Valenti MT. Transcription factor Runx2 and its application to bone tissue engineering. *Stem Cell Rev Rep* 2012; 8: 891-897. <https://doi.org/10.1007/s12015-011-9337-4> PMID:22139789
- [37] Garg P, Mazur MM, Buck AC, Wandtke ME, Liu J, Ebraheim NA. Prospective review of mesenchymal stem cells differentiation into osteoblasts. *Orthop Surg* 2017; 9: 13-19. <https://doi.org/10.1111/os.12304> PMID:28276640 PMCID:PMC6584428
- [38] Mohyeldin A, Garzón-Muvdi T, Quiñones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell* 2010; 7: 150-161. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.07.007> PMID:20682444
- [39] Berniakovich I, Giorgio M. Low oxygen tension maintains multipotency, whereas normoxia increases differentiation of mouse bone marrow stromal cells. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 2119-2134. <https://doi.org/10.3390/ijms14012119> PMID:23340651 PMCID:PMC3565369
- [40] Kim DS, Ko YJ, Lee MW, Park HJ, Park YJ, Kim DI, et al. Effect of low oxygen tension on the biological characteristics of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Stress Chaperones* 2016; 21: 1089-1099. <https://doi.org/10.1007/s12192-016-0733-1> PMID:27565660 PMCID:PMC5083677

## Effect of human adipose-derived mesenchymal stem cells preconditioned with cobalt chloride for hypoxia induction on ovariectomy-induced osteoporosis

Mahmoud Gorji-Valokola (Ph.D)<sup>1,2,3</sup>, Hamideh Babaloo (Ph.D)<sup>4</sup>, Hamed Kheradmand (M.D)<sup>5</sup>, Somaye Fallahnejhad (Ph.D)<sup>\*6,7</sup>

1- Dept. of Food and Drug Administration, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

2 - Yazd Comprehensive Center for Stem Cells and Regenerative Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

3 – Dept. of Pharmacology, Brain and Spinal Injury Repair Research Center, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran

4- Biotechnology Research Center, International Campus, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

5- Dept. of Neurosurgery, Hazrat Rasoul Akram, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences

6- Nervous System Stem Cells Research Center, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

7- Dept. of Anatomical Sciences, School of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

\* Corresponding author. +098 9125647909 sfallahnejhad@gmail.com

Received: 14 Sep 2023; Accepted: 13 Feb 2024

**Introduction:** Osteoporosis (OP) is a chronic metabolic disease. Cobalt (II) chloride (CoCl<sub>2</sub>) induces favorable effects on hAD-MSCs (human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells) function. This study aimed to assess the effects of CoCl<sub>2</sub>-preconditioned hAD-MSCs injection for hypoxia induction in female rats with ovariectomy-induced OP.

**Materials and Methods:** 24 adult female rats were subjected to bilateral ovariectomy. After 3.5 months, the OP progression was evaluated using CT scanning procedures with densitometric evaluation. Then, the animals were divided into 3 groups: sham (control), normoxia, and hypoxia groups receiving PBS (Phosphate Buffered Saline), hAD-MSCs, and 100 μM CoCl<sub>2</sub>-exposed hAD-MSCs for 48 h, respectively, via the tail vein. After 2 months, to investigate the hypoxia-inducing factor-1α (HIF-1α) by western blot analysis and to assess growth factors Insulin-like Growth Factor (IGF1) and Transforming Growth Factor Beta (TGFβ) and pro-inflammatory cytokines Tumor Necrosis Factor Alpha (TNFα) and Interleukin-1beta (IL-1β) using the ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) method, sampling of right and left tibia bone tissue markers was respectively done.

**Results:** In the group receiving 100 μM CoCl<sub>2</sub>-pretreated hAD-MSCs for 48 h, compared to the groups receiving normoxia cells and PBS, an increase in the expression of HIF-1α ( $P > 0.01$  and  $P > 0.001$ ), IGF-I ( $P > 0.01$  and  $P > 0.001$ ), and TGF-β ( $P > 0.05$  and  $P > 0.01$ ), and a decrease in the expression of TNF-α and IL-1β ( $P > 0.001$  and  $P > 0.01$ ) were significantly observed in right and left tibia bone, respectively.

**Conclusion:** CoCl<sub>2</sub> led to increased efficiency and effectiveness of CoCl<sub>2</sub>-pretreated hAD-MSCs in reducing the expression of pro-inflammatory cytokines and increasing growth factors through increasing the expression of HIF-1α.

**Keywords:** Osteoporosis, Hypoxia, Cobalt chloride, Mesenchymal Stem Cells