تأثير ارتفاع نسبة الجلوكوز والريسفيراترول على التمايز الغضروفي للخلايا الجذعية وارتون الهلامية البشرية

علي يحيى أحمد الألمعي
المشرف : د/ سمر أحمد عبدالل سلطان

المستخلص

حظيت خلايا وارتون الهلامية الجذعية البشرية المعزولة من الحبل السري في السنوات الأخيرة بمزيد من الإهتمام في مجال الطب التجديدي خاصة في تجديد الغضاريف. إن إرتفاع السكر في الدم يؤثر على تكاثر الخلايا الجذعية وتمايزها. الريسفيراترول هو مركب البوليفينول مع خاصية مضادة للإلتهابات قوية. وعلى ما جرى ذكرة ، ففي هذه الدراسة ، نهدف إلى دراسة تأثير الريسفيراترول وسكر الجلوكوز المرتفع كل على حده أو مجتمعين على تمايز الخلايا الغضروفية، تكاثرها أو إنتاج السايتوكاينز. جذعية الخلايا أُختبرت بواسطة التدفق الخلوي. تم تعريض الخلايا إلى وسط مصنع لحثها على التمايز مع إضافة السكر المرتفع والريسفيراترول من ١٤—٢١ يوم. أثناء التمايز الغضروفي، تم تقييم الخصائص البيولوجية مثل التشكل المجهري للخلايا وإنتشارها (دبليو إس تي—١) في اليوم ٤، ١٤ و ٢١. تم عمل صبغة التولودين الزرقاء لإختبار وجود مادة بروتيوجلايكانز ومادة جلايكوساميوجلايكانز أثناء التمايز الغضروفي. في اليوم ١٤ تم عزل ال (آر إن أيه) بإستخدام (آر إنيزي كيت) وعكس النسخ إلى (سي دي إن أيه) بإستخدام نظام النسخ العكسي (آي أم برو). تم عمل ال (ريل تايم بي سي آر) للأحماض الأمينية المحددة وهي (كولاجن ١) (كولاجن ٢) (كولاجن إكس) و(إس أو إكس-٩). في اليوم ١٤ تم عزل السائل المصاحب للخلايا لإختبار السايتوكاينز بطريقة الملتيبليكس المناعية (آي إل ١ ألفا) (آي إل ٦) (آي إل ٨) (جي- سي أس أف) و (جي أم – سي أس أف). السكر العالي عمل على تحفيز الخلايا المتمايزة الغضروفية كما هو موضح في إختبار الإنتشار في اليوم ١٤ واليوم ٢١. علاج الريسفيراترول مع الجلوكوز العالي أو بدونه خفض نمو الخلايا المتمايزة في اليوم الرابع ولكنه حفز النمو في اليوم الرابع عشر واليوم الواحد والعشرون مقارنة بالعينة القياسية. (كولاجن ١) (كولاجن ٢) (كولاجن إكس) (إم آر إن آيه) إرتفعت في حال أن (إس أو إكس-٩) أنخفضت في كل مراحل العلاج مقارنة بالعينات القياسية مع الملاحظ أن التعبير الجيني وصل لأعلى مراحلة في وجود الريسفيراترول مع الجلوكوز العالي. إفراز (آي إل ١ ألفا) (آي إل ٦) (آي إل ٨) كان قليلاً في وجود السكر العالي وفي عدم وجوده. مستويات (جي- سي أس أف) و (جي أم – سي أس أف) كانت عالية في وجود الريسفيراترول مع الجلوكوز العالي. ولكن الجلوكوز العالي خفض (جي أم – سي أس أف). في الختام ، في ظل ظروف الجلوكوز المرتفعة ، يعزز الريسفيراترول التمايز الغضروفي كما هو موضح من خلال ترسب البروتوجليكان الملحوظ وزيادة تعبير الكولاجين قد يكون جزئيًا من خلال لوائح السيتوكينات.

The effect of high glucose level and resveratrol on chondrogenic differentiation of human Wharton's Jelly stem cells

Ali Yahya A. Alalmie

Supervisor: Dr. Samar Ahmad Sultan

Abstract

Human Wharton's Jelly Stem Cells (hWJSCs) isolated from umbilical cords has received more attention in the field of regenerative medicine including cartilage regeneration. Hyperglycemia affects stem cells proliferation and differentiation. Resveratrol (RSV) is a polyphenol compound with powerful anti-inflammatory property. This study investigated the effects of RSV, high glucose (HG) or both on chondrogenic differentiation, proliferation, and cytokine productions. The stemness of hWJSCs were characterized using flowcytometry. The cells were exposed to commercial differentiation medium with chondrogenic supplement and treated with HG, RSV or both for 14-21 days. During chondrogenesis, biological characteristics such as cell morphology and proliferation (WST-1 assay) were evaluated at day 4, 14 and 21. Toluidine blue staining was performed to detect the proteoglycans and glycosaminoglycans (GAG) deposition. On day 14, total RNA was isolated using RNeasy Mini Kit, and reverse transcribed to cDNA using ImProm-II™ Reverse Transcription System. RT-PCR was performed for the hyaline cartilage markers namely, COLI, COLII, COLX and SOX-9. Inflammation related cytokines namely IL-1A, IL-6, IL-8, G-CSF, and GM-CSF were detected in supernatant of differentiated cells collected at day 14 by using Multiplex Immunoassay. The proliferation test showed that HG treatment enhanced the growth of induced cells as observed on day 14 and 21. RSV treatment with or without HG decreased the growth of differentiated cell on day 4 while they enhanced their growth on days 14 and 21 relative to control. Compared with HG group, co-treatment of RSV with HG decreased the induced cells proliferation on days 14 and 21. The COLI, COLII, and COLX increased, while SOX-9 decreased in all treated groups compared to control, but the highest fold of collagen expression was observed in RSV plus HG group. IL-1A, IL-6, and IL-8 secretions were low in RSV with or without HG groups. The levels of G-CSF and GM-CSF were high in RSV plus HG group, while HG treatment reduced GM-CSF. In conclusion, under HG conditions, RSV promote chondrogenic differentiation as indicated by

marked proteoglycan deposition and increased collagen expression may partially through cytokine regulations.