



بررسی زیست‌سازگاری سلول‌های استرومایی مغز استخوان در هم‌کنشی با داربست کیتوسان - پلی‌اتیلن اکساید

زهرة یوزباشی^۱، غلامرضا کاکا^{۲*}، ویدا حجتی^۱، عبدالحسین شیروی^۱

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

۲- گروه آناتومی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: gh_kaka@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۴/۵/۶

تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۲۰

چکیده

مطالعات متعددی در زمینه دستیابی به داربستی زیست تخریب‌پذیر به همراه سلول‌های بنیادی انجام شده است. هدف از این تحقیق ارائه داربست زیست تخریب‌پذیر کیتوسان (Cs) - پلی‌اتیلن اکساید (PEO) با بررسی توانایی رشد، تکثیر، عدم تمایز و مرگ سلولی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (BMSCs) بر روی آن بوده است. ابتدا ساخت داربست Cs/PEO به نسبت ۳ به ۱ انجام شد. این داربست یا اسکافولد در پلیت ۲۴ خانه‌ای پوشش داده شده با ژلاتین ۱٪ قرار گرفته و استریل شد. سلول‌های BMSCs از مغز استخوان ران موش‌های صحرایی بالغ استخراج و پس از سه مرحله پاساژ در خانه‌های خالی پلیت به عنوان گروه شاهد، در خانه‌های ژلاتینی به عنوان گروه ژلاتین و همچنین بر روی داربست به عنوان گروه تجربی کشت داده شد. میزان تکثیر، عدم تمایز و سلول‌های در حال مرگ در طی روزهای دوم، چهارم و ششم در پلیت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که مورفولوژی سلول‌ها بر روی داربست حفظ شده و مشابه گروه شاهد بود. میزان تکثیر سلول‌ها روی داربست در روزهای متوالی افزایش یافته و مشابه گروه شاهد بود. یافته‌ها نشان داد درصد تمایز سلول‌های BMSCs و درصد میزان مرگ سلولی نیز در سلول‌های کشت شده روی داربست در پایان روز ششم مشابه گروه شاهد بود. نتیجه‌گیری نهایی نشان داد تکثیر، عدم تمایز و عدم مرگ سلول‌های BMSCs روی داربست Cs/PEO زیست تخریب‌پذیر منجر به ارائه مدلی از داربست گردید، که می‌تواند در مهندسی بافت مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: کیتوسان، پلی‌اتیلن اکساید، داربست، سلول‌های استرومایی مغز استخوان

مقدمه

خصوص کشت سلولی با استفاده از مواد زیست تخریب‌پذیر، یکی از امیدبخش‌ترین تکنیک‌ها در حال حاضر می‌باشد [۷]. کیتوسان برای اولین بار در سال ۱۸۵۹ توسط پروفیسور Rouget کشف شد [۸] و به دلیل ویژگی‌هایی چون زیست تخریب‌پذیری، غیرآنتی‌ژنیک و زیست‌سازگاری [۱۲]، کاربرد وسیعی در زمینه‌های پزشکی مثل پوشش زخم [۶]، معالجه زخم [۱]، سیستم‌های انتقال دارو [۲] و مهندسی بافت دارد [۱۵، ۱۶]

از جدیدترین روش‌های درمان نقص یا آسیب به ویژه زخم و آسیب‌های پوستی، استفاده از لایه‌های بسیار نازک تهیه شده از پلیمر کیتوسان می‌باشد. آزمایشات و تجربیات مختلف، نشان داده است که در این روش سرعت ترمیم جراحات، نسبت به سایر روش‌های مرسوم، بیشتر بوده و خود کیتوسان به لحاظ زیست‌سازگاری، زیست تخریب‌پذیری و عدم تحریک پاسخ‌های دفاعی بدن نقش موثری در ترمیم و بهبودی دارد [۵]. دستاوردهای بیولوژیکی در



پلی‌اتیلن اکساید (PEO) یک پلیمر سنتزی زیست سازگار بوده که باعث کاهش ویسکوزیته کیتوسان می‌شود. [۳] و پلیمری از اتیلن اکساید است که در محدوده وزن مولکولی 20000 g/mol بیشترین کاربرد را داراست [۹]. سلول‌های ایده‌آل برای پیوند باید خصوصیتی نظیر دستیابی آسان، قدرت تکثیر سریع در محیط کشت، قدرت حیات طولانی، عدم رد پیوند در میزبان را داشته باشند که سلول-های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (BMSCs) تمامی این صفات را دارا می‌باشد. این سلول‌ها قادر به تولید انواعی از فاکتورهای تروفیک و سایتوکاین‌ها بوده و در سلول درمانی و مهندسی بافت بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱۴]. هدف از مطالعه حاضر ارائه داربستی زیست تخریب‌پذیر از کیتوسان - پلی‌اتیلن اکساید (Cs/PEO) است که سلول-های BMSCs بر روی آن بیشترین تکثیر سلولی و کمترین مرگ و میر سلولی را داشته و در مواجهه با آن بدون تمایز باقی بمانند که بتوان از آن جهت اهداف پزشکی استفاده نمود.

مواد و روش کار

پلیمر کیتوسان با وزن ملکولی پایین به عنوان پلیمر اصلی و پایه به میزان ۲۵٪ گرم و پلیمر PEO، به میزان ۰/۰۸۳ گرم به عنوان پلیمر کمکی از شرکت سیگما در ۱۰۰ سی‌سی آب دوبار تقطیر با کمک حلال استیک اسید ۰/۵ مولار برای تهیه غشا استفاده گردید. پودر ژلاتین، تریپسین ۲۵٪، درصد، اتیلن دی‌تترا آمین ۰/۰۴٪ (EDTA 0.04%)، معرف‌ها و رنگ-ها از شرکت مرک آلمان کتامین و زایلازین از شرکت آلفاسن هلند تهیه شد. محیط کشت α -MEM از شرکت جیبیکو انگلستان و تریتون X-100 از شرکت فلوکا خریداری شد. موش‌های صحرایی جهت استخراج BMSCs از آزمایشگاه حیوانات مرکز تحقیقات علوم اعصاب پژوهشگاه بقیه ا... (عج) تهیه شدند.

استخراج سلول‌های BMSCs: با رعایت اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی، سلول‌های BMSCs از استخوان-های ران موش صحرایی بالغ نژاد ویستار باسن ۶-۸ هفته استخراج گردید. بدین ترتیب که پس از بیهوش کردن حیوان مخلوط ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کتامین و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم زایلازین [۱۳]. توسط محلول بتادین جراحی و الکل ۷۰ درصد اندام خلفی و پشت حیوان به طور کامل ضد عفونی گردید. سپس استخوان‌ها از وسط دو نیم شد و سپس با استفاده از یک سرنگ ۵ میلی‌لیتر حاوی یک میلی‌لیتر محیط کشت α -MEM مغز استخوان از داخل کانال استخوان آسپیره شد. محتوی داخل سرنگ در زیر هود در پلیت ۶ سانتی حاوی محیط و FBS ۱۰ درصد ریخته و سپس در انکوباتور CO_2 (MMM انگلیس) قرار گرفت. پس از گذشت ۲۴ ساعت محیط کشت سلولی با محیط تازه تعویض شد. سلول‌های استرومایی چسبیده به کف فلاسک باقی‌مانده و سلول‌های خونی شناور حذف شدند. هنگامی که تراکم سلول‌های چسبیده به کف فلاسک به ۷۰ تا ۸۰ درصد رسید سلول‌ها توسط ۲۵٪، درصد Trypsin و ۰/۰۴ درصد EDTA پاساژ داده شدند. این عمل تا سه پاساژ ادامه یافت، در این شرایط سلول‌ها از مورفولوژی یکسانی برخوردار شدند.

کشت سلول: ابتدا غشا با نسبت ۳ به ۱ کیتوسان - پلی اتیلن اکساید توسط ژلاتین ۱٪ به کف پلیت ۲۴ خانه‌ای چسبانده شد، و سپس توسط الکل ۷۰٪ و همچنین قرار گرفتن به مدت یک ساعت در فاصله نیم متری از اشعه UV استریل شدند. از سلول‌های BMSCs پاساژ سوم مرحله قبل سوسپانسیون سلولی تهیه و پس از بررسی تعداد در واحد حجم و زنده و مرده بودن آنها توسط تریپان بلو، تعداد 5×10^5 سلول به هر کدام از پلیت‌های کشت سلولی اضافه شد و سپس در انکوباتور CO_2 ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. گروه شاهد خانه‌هایی از پلیت



دو ساعت در دمای محیط در معرض آنتی‌بادی ثانویه ضد موشی (۱:۲۰۰) کونژوگه به FITC قرار گرفت. سپس شستشو با PBS انجام شد. نمونه‌ها توسط میکروسکوپ فلورسانس اینورت (leica آلمان) مورد بررسی قرار گرفت. جهت شمارش سلول‌ها از اتیدیوم بروماید ۰/۰۱ درصد به مدت یک دقیقه استفاده و شستشو توسط PBS انجام شد. نحوه شمارش بدین ترتیب بود که از هر ۱۰۰ سلول شمارش شده در مناطق مختلف تعداد سلول‌ها ایمونوپوزیتیو مشخص هر گروه پیت شد. این کار روی سه خانه از پلیت ۲۴ خانه‌ای انجام و در مجموع آزمایش سه بار تکرار شد.

جهت ارزیابی خلوص و اثبات عدم تمایز سلول‌های BMSCs پس از بدست آوردن سلول‌ها و کشت دادن آنها، چهار پاساژ سلولی بر روی این سلول‌ها انجام شد و پس از آن، سلول‌ها از جهت درجه خلوص مورد ارزیابی قرار گرفتند. این ارزیابی بوسیله آنتی‌بادی علیه فیبرونکتین و CD44 استفاده گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: تمام مقادیر پس از سه دفعه تکرار بر حسب $Mean \pm SEM$ ارایه شده است. اطلاعات بدست آمده توسط روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون Tukey مورد مقایسه قرار گرفته و سطح معنی‌داری در حد $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

رشد و تکثیر سلول بر روی غشا: میزان رشد و تکثیر سلول‌ها در هر دو گروه شاهد و ژلاتین، در روز دوم (تصاویر A و D شکل ۱) حدود ۴۵٪ و در روز چهارم (تصاویر B و E شکل ۱) ۸۷٪ و در روز ششم (تصاویر C و F شکل ۱) ۸۷٪ کاملاً پیر شده بود و تفاوت مشخصی از لحاظ میزان رشد و تکثیر در بین دو گروه ملاحظه نشد ولی از لحاظ شکل سلولی، در محیط حاوی ژلاتین ۱٪ سلول‌ها کاملاً پهن و بزرگتر به نظر می‌رسیدند. درصد تلاقی و میزان

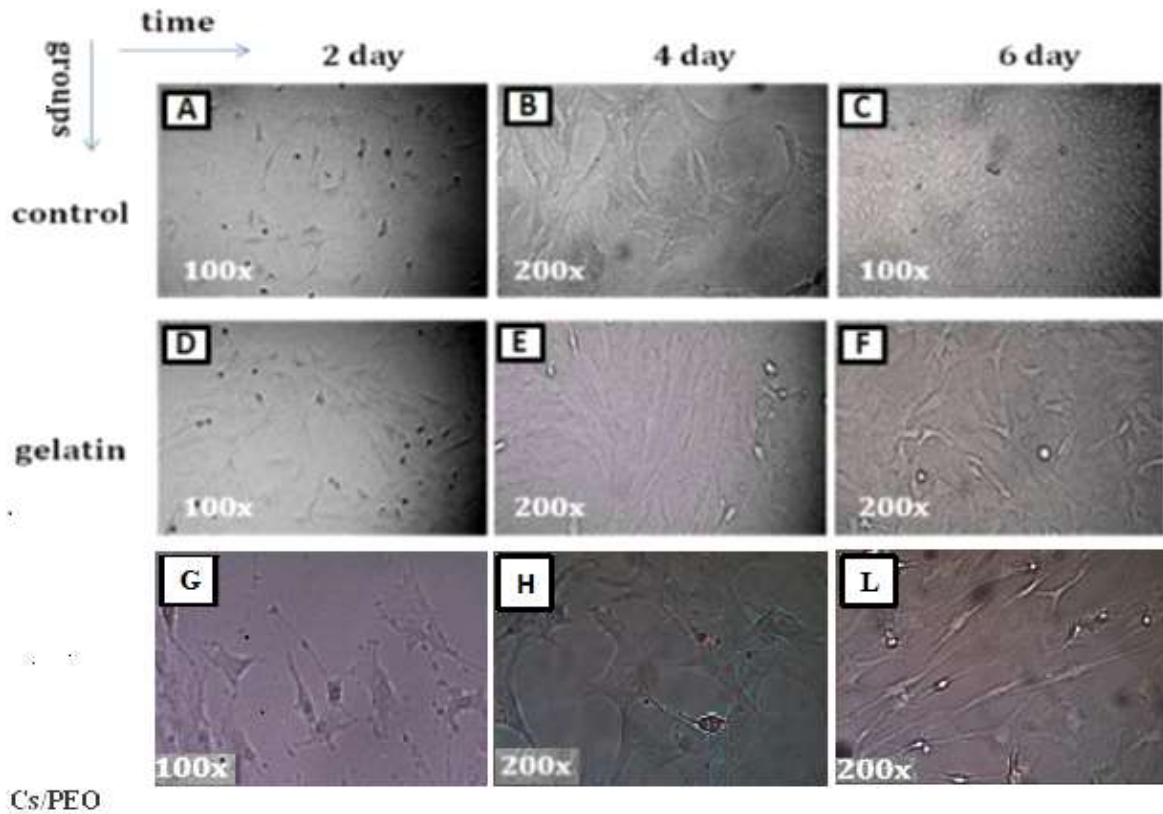
بدون ژلاتین و غشا است و گروه ژلاتین خانه‌هایی از پلیت که فقط ژلاتین شده‌اند و گروه تجربی که غشا روی خانه‌های ژلاتین قرار گرفت می‌باشد. برای بررسی میزان رشد و تکثیر سلول‌های زنده، هر کدام از خانه‌های مورد نظر در روزهای دوم، چهارم و ششم با میکروسکوپ اینورت (leica آلمان) مشاهده و توسط دوربین دیجیتال متصل به میکروسکوپ (INFINITY کانادا) با بزرگنمایی‌های مختلف عکس گرفته شد. جهت شمارش سلول‌ها، ۵ میدان میکروسکوپی با لنز شیئی ۱۰X به صورت تصادفی انتخاب، و تعداد سلول‌ها در هر میدان شمارش و میانگین آن گرفته شد و این کار تا سه بار تکرار، و هر دفعه در چهار خانه تکرار شد.

بررسی سلول‌های در حال مرگ: در پایان روز ششم جهت تعیین مرگ سلولی از ماده فلورسنت آکریدین اورنج (۲mg/ml) استفاده و سلول‌های با هسته نارنجی و سیتوپلاسم قرمز به عنوان سلول‌های در حال مرگ و سلول‌های با هسته و سیتوپلاسم سبز به عنوان سلول‌های زنده در نظر گرفته شد و جهت شمارش، تعداد ۱۰۰ سلول در حداقل ۳ میدان میکروسکوپی با لنز شیئی ۱۰X به صورت تصادفی شمارش شد که از این تعداد سلول‌های در حال مرگ مشخص و در نهایت میانگین درصد سلول‌های در حال مرگ بدست آمد.

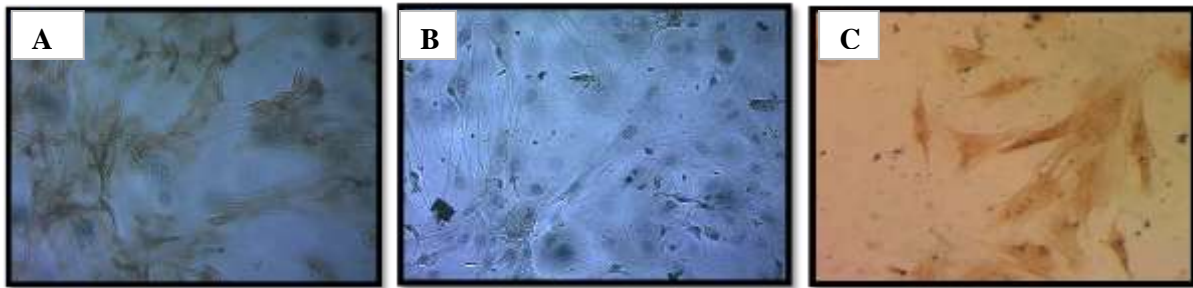
ایمونوسیتوشیمی: سلول‌ها در پایان روز ۶ جهت ثبوت به مدت ۳۰ دقیقه در معرض فرمالین ۱۰٪ قرار گرفته، سپس سلول‌ها با PBS سه مرتبه ۵ دقیقه شسته شدند. نمونه‌ها در معرض مخلوط سرم بز ۱۰٪ و Triton X-100 ۰/۳ درصد به مدت یک ساعت قرار داده شد. پس از رقیق نمودن ۱:۱۰۰ آنتی‌بادی‌های اولیه ضد موشی Fibronectin و CD44 جهت تعیین بنیادی و استرومایی بودن سلول‌ها، مدت یک شب در درجه حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سلول‌ها پس از انجام شستشو با PBS مانند قبل مدت

مجاورت غشا نشان داد که در روز ششم تمام سطح پلیت پر و سلول‌ها کاملاً به هم چسبیده و در هم فرو رفته‌اند. بررسی مرگ سلولی: اکثریت سلول‌ها پس از شش روز زنده بودند و درصد کمی از سلول‌ها دچار مرگ سلولی شدند که هیچ اختلاف معنی‌داری نیز در این خصوص بین گروه‌ها وجود نداشت (جدول ۱). ایمونوسیتوشیمی: پس از شمارش سلولی حدود ۹۰٪ سلول‌های بدست آمده به آنتی‌بادی علیه فیرونکتین و CD44 واکنش مثبت نشان دادند که نشان‌دهنده درجه خلوص بالای سلول‌های استرومایی بود (شکل ۲ و جدول ۲).

تکثیر سلول‌ها در روی داربست در روز دوم (تصویر G شکل ۱) حدود ۲۰٪ و در روز چهارم (تصویر H شکل ۱) ۴۸٪ و در روز ششم (L شکل ۱) بیش از ۸۹٪ از پلیت پر شده بودند (شکل ۱). اختلاف معنی‌داری نیز در این خصوص بین گروه‌ها وجود نداشت. تفاوت مشخصی از لحاظ میزان رشد در بین دو گروه شاهد و ژلاتین ملاحظه نشد ولی از لحاظ شکل و حالت سلولی، در محیط حاوی ژلاتین ۱٪ سلول‌ها کاملاً کشیده و چسبنده‌تر به نظر می‌رسند. میزان پراکندگی در تمام سطوح یکسان و سلول‌ها دوکی شکل و کشیده بودند. همچنین میزان رشد سلول‌ها در



شکل ۱- تصویر سلول‌های زنده با میکروسکوپ اینورت در سه گروه شاهد، ژلاتین، غشا Cs/PEO در روزهای دوم، چهارم و ششم پس از کشت سلول را نشان می‌دهد.



شکل ۲- تصویر میکروسکوپی سلول‌های استرومایی، پس از انجام ایمونوسیتوشیمی با بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر آنتی بادی اولیه فیبرونکتین (شکل A)، کنترل منفی (شکل B)، CD44 (شکل C)

جدول ۱- درصد سلول‌های در حال مرگ در پایان روز ششم

گروه‌ها	میانگین درصد سلول‌های در حال مرگ در روز ششم
شاهد	$3/6 \pm 0/2$
ژلاتین	$2/2 \pm 0/5$
Cs/PEO	$2/8 \pm 0/6$

جدول ۲- درجه خلوص سلول‌های BMSCs

گروه‌های آنتی‌بادی	درصد سلول‌های BMSCs
CD44	$89/25 \pm 3/76$
Fibronectin	$92/2 \pm 4/66$

بحث

نظر می‌رسد با تلفیق این دو روش درمانی بتوان راهکار مناسبی پیدا کرد تا باعث هم‌افزایی اثر شود. در تحقیق حاضر سلول‌های BMSCs توانستند بر روی داربست Cs/PEO زیست تخریب‌پذیر رشد و تکثیر مناسبی داشته و همچنین بدون مرگ سلولی باقی بمانند و بنابراین داربستی از سلول بدست آمد. برای تعیین درصد خلوص سلول‌های استرومایی به دلیل وجود گلیکوپروتئین فیبرونکتین در سلول‌های با منشأ مزانشیمی، سلول‌های BMSCs بر علیه این گلیکوپروتئین به روش ایمونوسایتوشیمی رنگ شدند، بیان بسیار بالای این پروتئین

از جدیدترین روش‌های درمان نقص یا آسیب به ویژه زخم و آسیب‌های پوستی، استفاده از لایه‌های بسیار نازک تهیه شده از پلیمر کیتوسان می‌باشد. آزمایشات و تجربیات مختلف، نشان داده است که در این روش سرعت ترمیم جراحات، نسبت به سایر روش‌های مرسوم، بیشتر بوده و خود کیتوسان به لحاظ زیست‌سازگاری، زیست تخریب پذیری و عدم تحریک پاسخ‌های دفاعی بدن نقش موثری در ترمیم و بهبودی دارد [۵]. از طرفی برای انجام سلول درمانی از منابع سلولی متفاوتی می‌توان استفاده کرد که از آن جمله می‌توان به سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان اشاره کرد. به



منابع

- 1- Aiedehe K., Gianasii E., Orienti I., Zecchi V. (1997), Chitosan microcapsules as controlled release systems for insulin. *Journal of microencapsulation*, 14(5): 567-576.
- 2- Berger J., Reist M., Mayer J., Felt O., Gurny R. (2004), Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(1): 35-52.
- 3- Bhattarai N., Edmondson D., Veiseh O., Matsen F.A., Zhang M. (2005), Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. *Biomaterials*, 26(31): 6176-84.
- 4- Bossolasco P., Cova L., Calzarossa C., Rimoldi S.G., Borsotti C., Delilieri G.L., Silani V., Soligo D., Polli E. (2005) Jun, Neuro-glial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro. *Experimental Neurology*, 193(2): 312-25.
- 5- Hua X, Yashodhan S, Jeffrey S and Brian S. (2008), Use of a chitosan-based hemostatic dressing in laparoscopic partial nephrectomy. *Journal of Biomedical Materials*, 85(1): 267-271.
- 6- Hirano S., Itakura C., Seino H., Akiyama Y, Nonaka I., Kanbara N. (1990), Chitosan as an ingredient for domestic animal feeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(5): 1214-1217.
- 7- Khora E., Yong L. (2003), Implantable applications of chitin and chitosan. *Journal of Biomaterials*, 24(3): 2339-2349.
- 8- Khor E, Lim LY. (2003), Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, 24(13): 2339-2349.

در سلول‌ها مؤید بنیادی بودن آنها بود. این روش توسط سایر محققین نیز به کار گرفته شده است [۱۷]. در تأیید خلوص سلول‌های BMSCs از آنتی‌بادی CD44 نیز استفاده شد که نتایج مانند آنتی‌بادی فیبرونکتین درصد بالایی از سلول‌ها مثبت بودند. این نتایج بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی توسط دیگران نیز نشان داده شد [۴]. همچنین لاموری و همکارانش سلول‌های BMSCs حیوان و انسان را در دو محیط جداگانه کشت داده و با استفاده از آنتی‌بادی ضد فیبرونکتین و بیان mRNA ژن Oct-4 هویت بنیادی بودن آنها را تأیید کردند [۱۱]. در مطالعه حاضر به نظر می‌رسد در ۴۸ ساعت ابتدایی، سلول‌ها بر روی غشا نسبت به روزهای بعدی و یا نسبت به گروه‌های شاهد و ژلاتین رشد و تکثیر کندی دارند ولی با گذشت زمان در روزهای چهارم و ششم با تطبیق خود با شرایط رشدشان به سرعت افزایش یافته است که این موضوع در تحقیق منگیان و همکارانش نیز اینگونه بوده است [۱۰]. به طور کلی تصاویر میکروسکوپ اینورت از سلول‌های زنده BMSCs در مطالعه حاضر افزایش رشد و چسبیدن سلول‌های BMSCs به غشا Cs/PEO را طی روزهای متوالی تأیید، و نشان داد که شکل سلول در طول مطالعه حفظ شده است.

نتیجه‌گیری

در نهایت می‌توان گفت با توجه به اینکه سلول‌های BMSCs به راحتی می‌توانند بر روی غشا Cs/PEO رشد و تکثیر مناسب، و مرگ سلولی بسیار کمی داشتند و با توجه به اینکه سلول‌ها در این مدت دچار تمایز نشده و همچنان بنیادی بودن خودشان را حفظ کردند، بنابراین این داربستی زیست تخریب پذیر از سلول به همراه غشا در مدت زمان کوتاه بدست آمد.



mesenchymal stem cells express glial markers and stimulate nerve regeneration. *Neuroscience Letters*, 362(2): 200-203.

15- Yagi K., Michibayashi N., Kurikawa N., Nakashima Y., Mizoguchi T., Harada A. (1997), Effectiveness of fructosemodified chitosan as a scaffold for hepatocyte attachment. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 20(12): 1290-1294.

16- Zhang Y., Zhang M. (2001), Synthesis and characterization of macroporous chitosan/calcium phosphate composite scaffolds for tissue engineering. *Journal of biomedical materials research*, 55(3): 304-312.

17- Zhao L.R., Duan W.M., Reyes M., Keene C.D., Verfaillie C.M., Low W.C. (2002), Mar, Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Experimental Neurology*, 174(1): 11-20.

9. Kahovec J., Fox R.B., Hatada K. (2002), Nomenclature of regular single-strand organic polymers. *Pure and Applied Chemistry*, 74: 1921-1956.

10- Kazemnejad S., Allameh A., Soleimani M., Ahmad G., Mohammadi Y., Amirizadeh N. (2007), Development of a novel three-dimensional biocompatible nanofibrous scaffold for the expansion and hepatogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of Biotechnology*, 4(3): 201-211.

11- Lamoury F.M., Croitoru-Lamoury J., Brew B.J. (2006), Undifferentiated mouse mesenchymal stem cells spontaneously express neural and stem cell markers Oct-4 and Rex-1. *Cytotherapy*, 210(2): 228-42.

12- Ravi Kumar M.N.V. (2000), A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46(1): 1-27.

13- Seung Y. (2004), The survival and migration pattern of the Bone marrow stromal cells after intracerebral transplantation in Rats. *Journal of Korean Neurosurgery*, 36(1): 400-404.

14- Tohill M., Mantovani C., Wiberg M., Terenghi G. (2004), Rat bone marrow

