زیست‌شناسی جانوری، سال سیزدهم، شماره سوم، بهار ۱۴۰۰، صفحات ۵۳- ۴۱

**مقاله پژوهشی**

# اثر تمایزی اگزوزوم‌های مشتق شده از مونوسیت‌ها و ماکروفاژها در داربست‌های قطره‌ای کیتوزان آلژینات

**نسرین حسینی[۱]، جواد بهارآرا[۲*]، خدیجه نژاد شاهرخ آبادی[۱]، سعیده ظفر بالانژاد[۱]**

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاداسلامی، مشهد، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

*مسئول مکاتبات: baharara@mshdiau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۰۲

## چکیده

آسیب‌های استخوانی یکی از چالش‌های علم پزشکی محسوب می‌شود که هر ساله هزینه‌ی زیادی را در دنیا برای درمان به خود اختصاص می‌دهد. اگزوزوم‌ها، نانووزیکول‌هایی هستند که پروتئین‌ها و ماده‌ی ژنتیک به سلول هدف وارد می‌کنند و به دنبال آن، تکثیر، بقای سلولی و تمایز را در سلول گیرنده القا می‌نمایند. این ویژگی‌ها، می‌تواند اگزوزوم‌ها را به عامل تمایزی مناسب تبدیل کند. هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر تمایزی اگزوزوم‌های مشتق شده از مونوسیت‌ها و ماکروفاژها در داربست‌های قطره‌ای کیتوزان آلژینات. داربست‌های کیتوزانی- آلژیناتی به روش قطره‌ای به همراه سلول‌های بنیادی چربی ساخته شد. سپس سلول‌های مونوسیتی کشت و مایع رویی جمع‌آوری شد و اگزوزوم‌ها به روش اولتراسانتریفوژ جمع شدند و توسط روش DLS و SEM شناسایی شدند. نمونه‌ها تیمار و سپس تست MTT و DAPI و برای بررسی فرآیند تمایز تست آلکالین فسفاتاز و Real-time PCR انجام شد. بررسی یافته‌های آزمون MTT نشان داد میزان بقای سلول‌های تمایزیافته با اگزوزوم‌ها در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ نسبت به کنترل تفاوت معناداری داشت. نتایج DAPI نشان‌دهنده عدم مرگ سلولی در گروهای تیماری بود و نتایج تست آلکالین فسفاتاز تفاوت معناداری با گروه کنترل نشان داد و همچنین نتایج Real-time PCR افزایش بیان ژن‌های BMP 2/6، SMAD4، ژن‌های تمایزی استئوکلسین (Osc) و استئوپونتین(Opn) نسبت به نمونه کنترل را به همراه داشت. این مطالعه، نشان داد اگزوزوم مشتق از سلول‌های مونوسیتی و ماکروفاژی، می‌توانند سبب بقا و تمایز استئوژنیک سلول‌های مزانشیمی چربی در درابست‌های کیتوزان آلژینات شوند.

**کلمات کلیدی:** اگزوزوم، سلول بنیادی چربی، تمایز سلولی، مونوسیت، داربست کیتوزان، آلژینات.

## مقدمه

اگزوزم‌ها وزیکول‌های کوچکی با منشاء درون سلولی هستند که توسط بسیاری از انواع سلول‌های مختلف به فضای خارج سلولی آزاد می‌شوند. اگزوزوم-هاوزیکول‌های با اندازه ۳۰ تا ۱۰۰ نانومتر هستند که توپولوژی شبیه غشای پلاسمایی دارند (۱۴). آنها نقش کلیدی در ارتباطات بین‌سلولی تحت شرایط فیزیولوژیکال و پاتولوژیکال ایفا می‌کنند (۱۴). اگزوزوم‌ها حاوی مقدار قابل توجهی از پروتئین‌ها، لیپیدها، RNA و RNA کوچک می‌باشند (۱۰). در دو دهه اخیر اگزوزوم‌ها به عنوان سومین مکانیزم برای

ارتباط‌های بین سلولی معرفی شده‌اند و در خون، ادرار، بزاق، مایع منی، سرم و غیره وجود دارند و توسط تعداد زیادی از سلول‌ها مانند سلول‌های دندرتیک، ماست سل‌ها، پلاکت ها، سلول های خونی، توموری و غیره به فضای خارج سلولی ترشح می‌شوند (۳۰). برای مطالعه و استفاده کاربردی ابتدا باید آنها را تخلیص کرد اگزوزوم‌ها در انواعی از پردازش‌های مهم زیستی مانند پاسخ ایمنی و التهاب، تمایز، تعمیم بافت، انعقاد خونی و رگ‌زایی نقش مهمی دارند (۱۵). آنها بسته به اینکه از چه سلول‌هایی منشا می‌گیرند، دارای ترکیبات مختلف هستند، بنابراین بیان ژن های متفاوتی را تنظیم می‌کنند (۳۰). مونوسیت‌ها عضوی از یک گروه متنوع سلولی به نام لوکوسیت‌ها می‌باشند. لوکوسیت‌ها در جریان خون و لنف با مهاجرت به مکان های آسیب دیده بافتی و یا عفونی به عنوان یک منبع در بهبود قسمت های آسیب دیده عمل می‌کنند استخوان سازی با قطبیت ماکروفاژها بهبود می‌یابد زیرا تسهیل مهاجرت و چسبندگی سلول‌های تشکیل دهنده استخوان بر روی سطح ایمپلنت را افزایش می-دهد (۱۱). مونوسیت‌ها در فرایند اتصال استئوبلاست و استئوکلاست بسیار مهم هستند، که برای بازسازی استخوان‌ها ضروری است (۱۱). سلول‌های زنده انواع مختلفی از وزیکول های خارج سلولی (EVs) به درون محیط خارج از سلول را آزاد می کنند که به طور عمده در ارتباطات داخل سلولی دخیل هستند (۱۶). در مهندسی بافت استخوان، یک داربست سه بعدی زیست فعال و زیست‌تخریب‌پذیر جهت حمایت از سلول‌های کشت شده در خلال بازسازی استخوان، همچنین هدایت سه بعدی تشکیل بافت استخوانی جدید استفاده می‌شود (۶). طی سال‌های گذشته تلاش شده است مواد طبیعی جایگزین مواد شیمیایی بشوند (۱۶). کیتوزان بیو پلیمر استخراج شده از سخت‌پوستان است (۲۴). کیتوزان، پلیمری خطی با ساختاری ساکاریدی است که از استیل زدایی پلیمر طبیعی کیتین به دست می‌آید (۲۴). به دلیل وجود گروه‌های آمینی در کیتوزان، این پلیمر دارای خصوصیات منحصر به فردی است که از آن جمله می‌توان به قابلیت زیستی، غیرسمی بودن و سازگاری با سلول‌ها و بافت‌ها اشاره نمود. به علت داشتن گروه‌های آمین در ساختار خود، باعث افزایش آبدوستی سطح داربست‌ها شده و در نتیجه باعث چسبندگی سلول‌ها به سطح داربست می شود همچنین کیتوزان نقش مهمی در چسبندگی، تمایز و مورفوژنز استئوبلاست‌ها و تشکیل استخوان دارد (۲۱). هیدروژل‌ها یکی از انواع داربست‌ها با ساختار جامد و به صورت ژل می‌باشند (۲۲). آلژینات زیست سازگار است و برای بدن بیضرر است این ماده قابلیت استفاده در بسیاری از فعالیت‌های کاربردی پزشکی به خصوص در زمینه‌های ترمیم زخم، انتقال مواد دارویی، کشت سلول در شرایط آزمایشگاهی و مهندسی بافت دارد (۱۴). آلژینات دارای ویژگی‌های جذابی مانند زیست‌سازگاری، ارزان و در دست بودن ماده اولیه و امکان اعمال تغییرات ساده برای آماده-سازی مشتقات آلژینات با خواص جدید می‌باشد. در بکارگیری سلول‌ها به منظور سلول درمانی در نظر گرفتن قابل دسترس بودن و فراوانی سلول بنیادی، استخراج آسان و کم خطر برای بیماران، توانایی تبدیل به سایر رده‌های سلولی، ایمنی برای فرد گیرنده و عدم دفع پیوند بسیار حائز اهمیت می باشد (۲). سلول‌های بنیادی مزانشیمال استخراج شده از بافت چربی قابلیت تزاید زیادی داشته و به چندین رده سلولی مثل آدیپوسیت، استئوبلاست، میوبلاست، کندروبلاست، آندوتلیال و کاردیومیست تمایز داده شده‌اند به علاوه، سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی نیاز به نگهداری طولانی مدت در بانک‌های سلول نیاز به صرف هزینه‌های بالا ندارند (۱۸).

**مواد و روش‌ها**

برای انجام این مطالعه، کیتوزان (با درجه‌ی د- استیلاسیون ۸۵ درصد)، و آلژینات از کمپانی سیگمای آمریکا خریداری شد. برای تهیه‌ی داربست کیتوزان آژینات، گرد کیوزان در اسید استیک ۰/۲ مولار حل شد تا محلول کیتوزان ۱/۵ درصد (نسبت وزن بر حجم) با ph= 4/4 به دست آمد. محلول آلژینات با درصد وزنی ٤ درصد با استفاده از پودر آلژینات و محیط کشت DMEM در زیر هود و شرایط استریل با هم مخلوط و به آرامی هم زده شد. بعد از آن توسط دستگاه هات پلیت مگنت به مدت ۲ ساعت مخلوط شد تا محلولی یکنواخت بدست آمد. سپس محلول مورد نظر به مدت ٢٤ ساعت در دمای آزمایشگاه باقی خواهد ماند تا حباب‌های ایجاد شده در آن از بین برود و سپس محلول کیتوزان به نسبت ۱ به ۳ اضافه شد (٢٦).

**تهیه سلول‌های بنیادی چربی و سلول‌های خونی:** سلول‌های بنیادی چربی و سلول‌های خونی (مونوسیت و ماکروفاژ) از مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری تهیه شد. سلول‌های بنیادی با مارکرهای CD90 و CD105 شناسایی و سلول‌های خونی با مارکرهای CD14 و CD45 بررسی شد.

**جداسازی و خالص‌سازی اگزوزوم:** پس ازجمع آوری محلول روی محیط کشت سلول‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰سانتریفوژ شد تا سلول‌های مرده و قطعات بزرگ غشایی حذف شوند. سپس به منظور رسوب دادن اگزوزوم‌ها به مدت ٦٠ دقیقه با دور ۲۰۰۰۰۰ اولتراسانتریفوژ شد. بعد از آن رسوب اگزوزومی در PBS حل شده و به منظور حذف آلودگی‌های پروتئینی، سوسپانسیون اگزوزومی به طور مجدد با دور ۲۰۰۰۰۰ در مدت ٦٠ دقیقه اولتراسانتریفوژ می‌گردد. در نهایت رسوب اگزوزومی در PBS حل شده و در دمای ۲۰- نگهداری می‌شود (٦).

**شناسایی اگزوزوم توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM):** به منظور بررسی شکل و اندازه، اگزوزوم های تخلیص شده توسط گلوتارآلدهید ۲/۵ درصد تثبیت و با PBS شستشوداده شد. سپس نمونه توسط اتانول آبگیری شده و روی سطح شیشه ای خشک با لایه ی نازکی از لایه نازکی از طلا پوشانده شد و توسط میکروسکوپ بررسی شد (۱۹).

**بررسی اگزوزوم های جداسازی شده توسط سنجش (DLS):** پراکندگی نور دینامیکی (DLS) روشی فیزیکی است که برای تعیین توزیع ذرات موجود در محلول‌ها و سوسپانسیون استفاده می‌شود. این روش غیرمخرب و سریع برای تعیین اندازه ذرات در محدوده چند نانومتر تا میکرون به کار می‌رود. اندازه اگزوزوم‌ها توسط بررسی DLS انجام شد (۱۹).

**آماده‌سازی داربست‌ها:** سلول‌های بنیادی چربی به همراه هیدروژل مخلوط شد که به ازای هر میلی‌لیتر کیتوزان آلژینات ۳/۵ × $10^6$ سلول در نظر گرفته شد. هیدروژل کیتوزان آلژینات به همراه سلول های قرار گرفته در آن به سرنگ cc۱۰ استریل انتقال یافته و از میان سوزن ۲۱ درجه بیان شدند سپس فرآیند ژل شدن در پلیت‌های حاوی ۵ میکرومولار محلول کلرید کلسیم ۲ درصد انجام شد و بعد به پلیت حاوی محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد (پنی‌سلین/ استرپتومایسین ) انتقال داده شد (٢٤).

**طراحی گروه‌های آزمایش:** گروه اول: ۲۰ داربست-های هیدروژلی سه بعدی قطره‌ای به همراه سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی. گروه دوم: ۲۰ داربست‌های هیدروژلی سه بعدی قطره‌ای به همراه سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی و تیمار با غلظت ۵۰

میکروگرم بر میلی‌لیتر اگزوزوم که در روزهای ۱، ۷، ۱۴ و ۲۱ نسبت به کنترل سنجیده شدند. غلظت در این پژوهش با روش آزمون و خطا بدست آمد.

**آزمون MTT جهت تعیین میزان بقای و تکثیر سلولی:** آزمون MTT یکی از روش‌های تعیین تعداد سلول‌های زنده می‌باشد که بر اساس فعالیت متابولیکی سلول‌ها استوار است. سلول‌ها پس از کشت بر روی داربست در روزهای ۱، ۷، ۱۴، ۲۱ جدا شدند و بر اساس پروتکل موجود جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازگیری شدند (۲۷).

**رنگ‌آمیزی هسته‌ای DAPI:** DAPI یک رنگ فلورسنت است که با قدرت به نواحی غنی از آدنین- تیمین در DNA متصل می‌شود. با این رنگ می‌توان سلول‌ها را از نظر مورفولوژی بررسی کرد. به منظور بررسی اثر اگزوزوم‌ها بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی بر اساس پروتکل موجود سلول‌ها رنگ‌آمیزی و سپس توسط میکروسکوپ فلوروسنت بررسی و عکس‌برداری شدند (۳۱).

**سنجش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز:** ابتدا داربست‌ها با محلول PBS دو بار شستشو داده شد. بعد به مدت ۳۰ ثانیه فیکساتیو اضافه شده و به مدت ۴۵ ثانیه با آب دیونیزه شستشو و سپس آب دیونیزه خارج گردید. در ادامه محلول نمک دیازونیوم به مدت ۳۰ دقیقه اضافه و پس با آب دیونیزه به مدت ۲ دقیقه شستشو داده شد. بعد از خارج کردن آب، به مدت ۱۰ دقیقه هماتوکسیلین اضافه و سپس جذب نمونه‌ها توسط اسپکتوفوتومتر سنجیده شد (۱۲).

**روش ارزیابی مولکولی در سطح بیان ژن:** ابتدا استخراج RNA سپس سنتز cDNA از سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی مغز استخوان در هفته سوم از داربست جدا و طبق پروتکل شرکت سازنده کیاژن، امریکا انجام گرفت. پرایمرهای اختصاصی ژن‌های BMP2/6 و Smad4 و همچنین از مارکرهای استئوکلسین (Osc) و استئوپونتین (Opn) که دو شاخص از سلول‌های استئوبلاست تمایز یافته هستند طراحی و با روش Real Time -PCR مورد سنجش قرارگرفت و از ژن GAPDH به عنوان House keeping استفاده شد (۵). ۱۶۰ عدد داربست ساخته شد. به ۸ گروه ۲۰ تایی تقسیم و در روزهای ۱، ۷، ۱۴ و ۲۱ از نظر رشد و تمایز سلول‌های بنیادی توسط روش‌های فوق ارزیابی شد. هر آزمایش سه بار تکرار شد و میانگین نتایج مقایسه شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری t-Test و تست تعقیبی مناسب که در سطح ($p$ <۰/۰۵) تجزیه تحلیل شدند.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در آنالیز Real Time –PCR

| Oligo Name | Sequence (5′ → 3′) | Amplicon, bp |
|---|---|---|
| GAPDH F | TGACTTCAACAGCGACACC | 19 |
| GAPDG R | TTGCTGTAGCCAAATTCGTT | 20 |
| BMP6 F | GAAACATAACCGTGAAGCTC | 20 |
| BMP6 R | TACTGAACCAGCTGATCCTT | 20 |
| BMP2 F | GCACATGAAGTATAATGGTC | 20 |
| BMP2 R | AAATTATGTACAAACCCGAT | 20 |
| SMAD4 F | GCCTGTTCACAATGAGCTTG | 20 |
| SMAD4 R | CCTTGCTCTCTCAATGGCTT | 20 |
| OSC F | TGCAGCCTTTGTGTCCAAGC | 20 |
| OSC R | ATGTGGTCAGCCAACTCGTC | 20 |
| OPN F | GTAGACCCCAAAAGTAAGGA | 20 |
| OPN R | TTGACCTCAGAAGATGCACT | 20 |

## نتایج

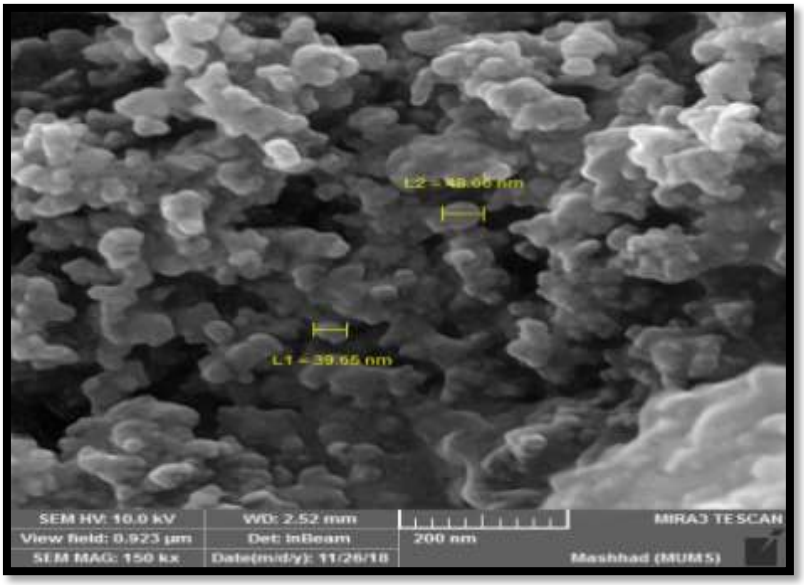
**شناسایی اگزوزوم توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM):** اگزوزوم‌ها نانو وزیکول‌های گرد به قطر ۳۰ تا ۱۰۰ نانومتر هستند. برای تائید ریخت شناسی و اندازه آنها نمونه جدا شده با میکروسکوپ الکترونی نگاره مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در شکل زیر نشان داده شده است وزیکول‌های کوچک با مورفولوژی بیضی شکل در میکروگراف‌ها بدست آمده از میکروسکوپ الکترونی قابل رویت است. دامنه اندازه گیری وزیکول‌ها براساس کوچکترین و بزرگترین وزیکول دیده شده در میکروگراف‌های متعدد بین ۳۲ تا ۸۷ نانومتر تعیین گردید. با این حال اکثریت وزیکول‌ها اندازه کوچکتر از ۸۰ نانومتر داشتند.

**بررسی اندازه اگزوزوم‌ها با دستگاه DLS:** اندازه اگزوزوم‌ها با استفاده از دستگاه DLS مورد بررسی قرار گرفت. اندازه تمام نانوذرات جداسازی شده بین ۳۲ تا ۸۷ نانومتر بود که با اندازه اگزوزوم‌ها کاملاً مطابقت داشت و حاکی از صحت جداسازی اگزوزوم‌ها می-باشد.

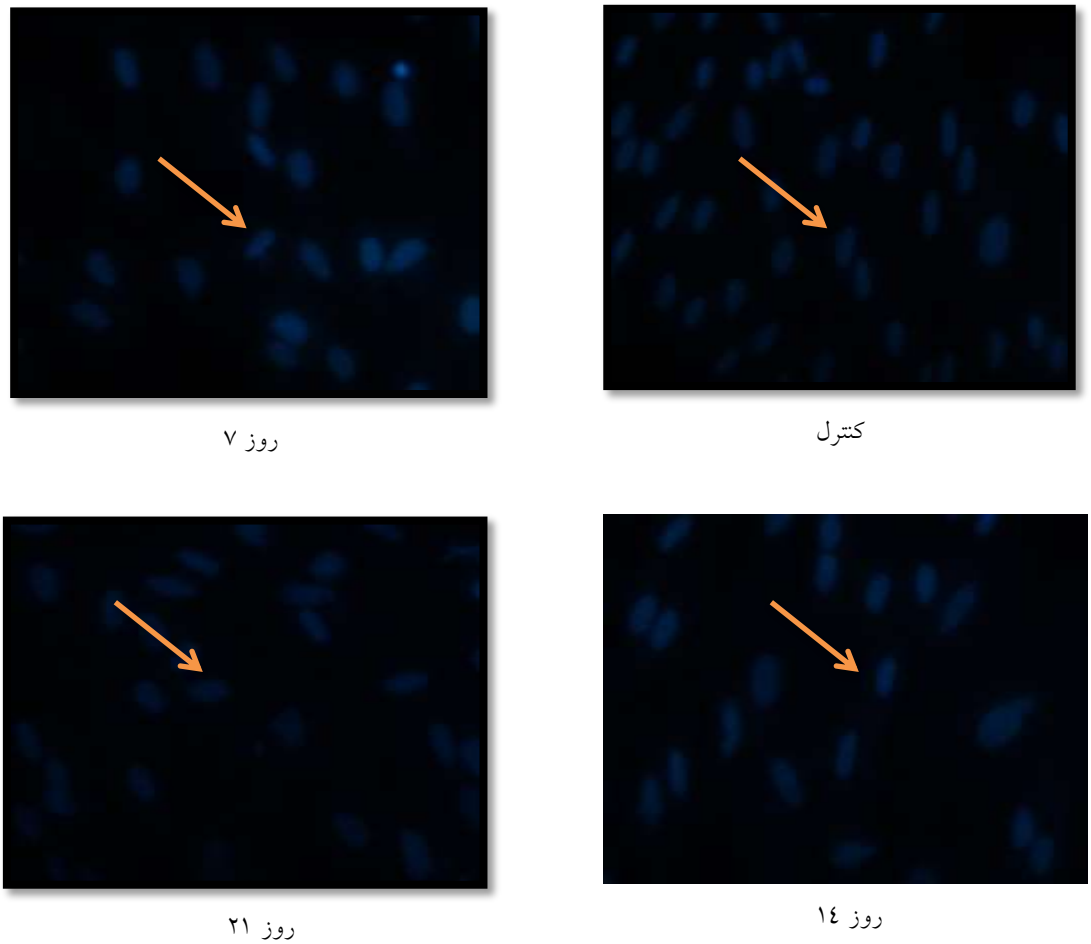
**آزمون MTT جهت تعیین میزان بقای وتکثیر سلولی در داربستهای کیتوزان- آلژینات:** به منظور بررسی رشد، تکثیر و بقای سلول‌های بنیادی چربی در داربت‌های کیتوزان آلژینات تیمار شده با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اگزوزوم تست MTT در روزهای ۱، ۷، ۱۴ و ۲۱ صورت گرفت نتایج نشان داد در روزهای ۱و ۷ تفاوت معنا داری بین گروه کنترل و تیمار وجود ندارد اما در روزهای ۷ و ۲۱ داری تفاوت معناداری نسبت به گروه کنترل هستند ( $p <$ ۰/۰۰۱).

**رنگ‌آمیزی DAPI:** نتایج رنگ‌آمیزی DAPI در شکل ۲ نشان داد نمونه های تیمار شده با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اگزوزم در مقایسه با نمونه کنترل در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ هیچگونه تغییرات هسته‌ای که نشانه آپوپتوز باشد را نشان نمی‌دهند. نتایج بررسی فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز نشان داد داربست‌های تیمار شده با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به نمونه کنترل با افزایش زمان افزایش بیان داده داشته نتایج در نمودار ٤ دیده می‌شود.

**بیان ژن توسط Real-Time PCR:** سطح بیان ژن‌های BMP 2/6 و SAMAD 4 و ژن‌های تمایزی استئوپئتین و استوکلسین در پاسخ به تیمار با اگزوزوم ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در روز ۲۱ توسط Real-Time PCR اندازه گیری شد. نتایج ما نشان داد که در سلول های بنیادی چربی پس از تیمار با اگزوزوم ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ژن‌های BMP 2/6 و SAMAD 4 افزایش بیان داشتند و همچنین ژن‌های تمایزی استئوکلسین (Osc) و استئوپونتین (Opn) نسبت به نمونه کنترل افزایش بیان داشتند. از ژن GAPDH به عنوان Housekeeping استفاده شد.




شکل ۱- میکروسکوپ الکترونی نگاره از اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های مونوسیتی و ماکروفاژی



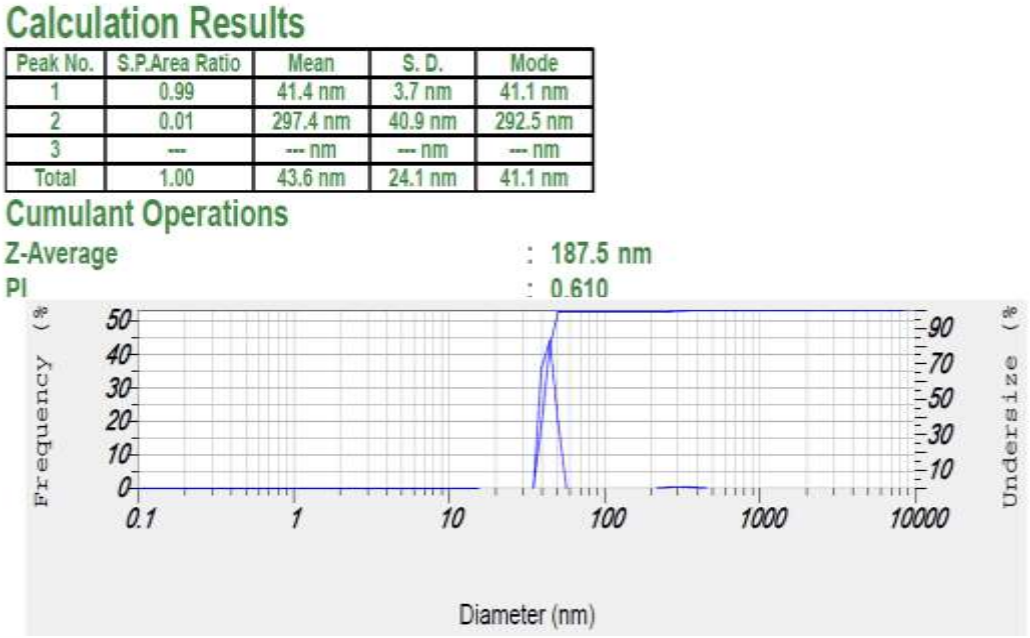
کنترل

روز ۷

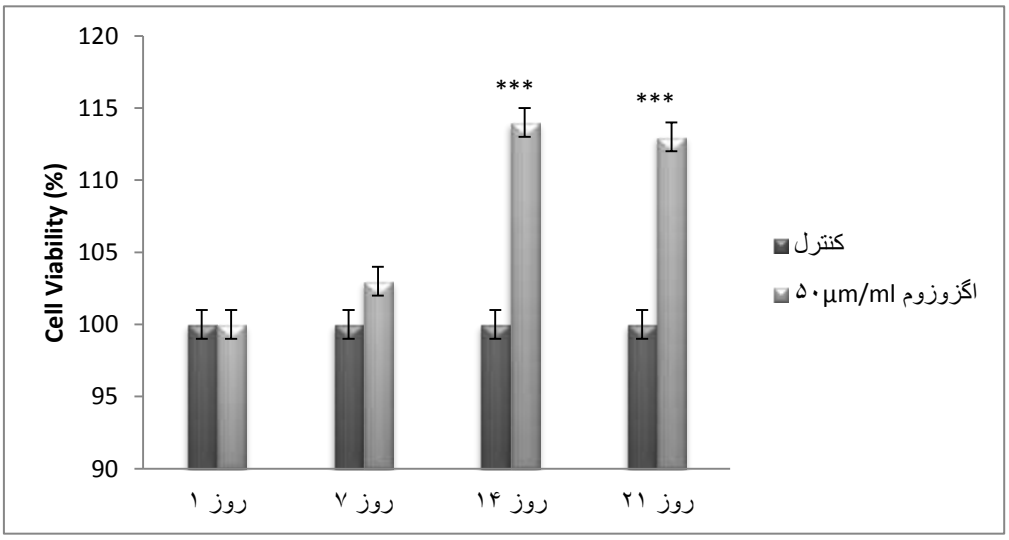
روز ۱٤

روز ۲۱

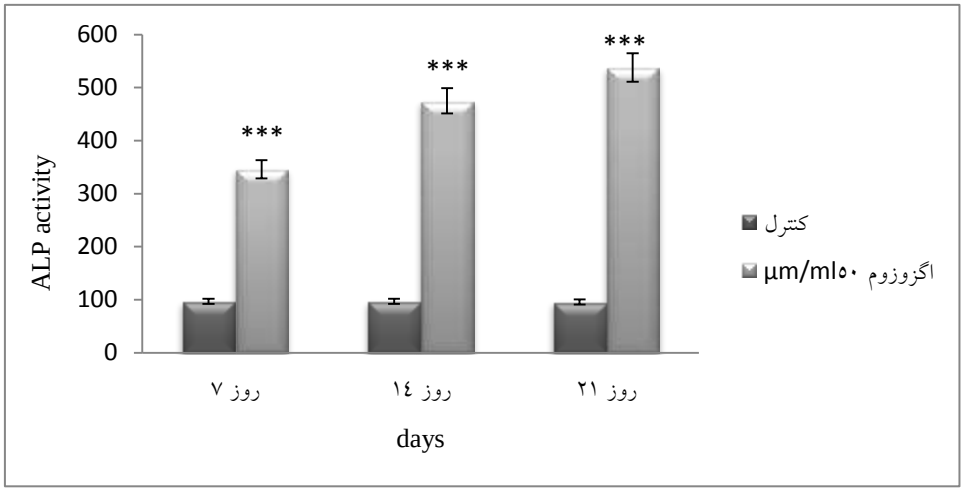
شکل ۲: رنگ آمیزی DAPI نشان دهنده عدم تغییر در هسته سلول‌های بنیادی چربی در مقایسه با کنترل پس از تیمار با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اگزوزوم در روزهای ۷، ۱٤ و ۲۱ می باشد. فلش نارنجی رنگ هسته‌ها را نشان می‌دهد.



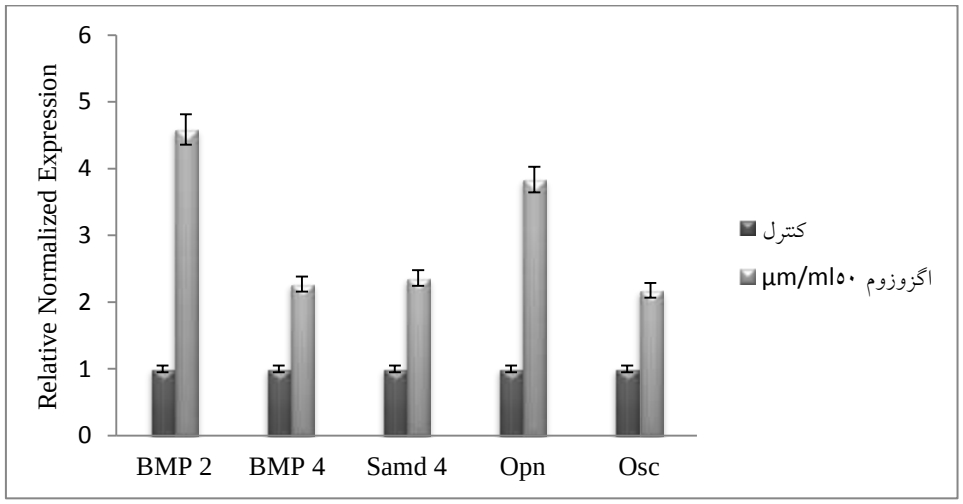

نمودار ۱- بررسی اندازه اگزوزوم ها با دستگاه DLS قطر همه ذات بین ۳۰ تا ۱۰۰ نانومتر بود و پیک ذرات در ۴۳.۵ نانومتر مشاهده می‌شود.




نمودار ۲- بررسی زیستایی سلول های بنیادی چربی در داربست های کیتوزان آلژینات پس تیمار با غلظت ۵۰ µg/ml اگزوزوم نسبت به گروه کنترل در روزهای ۱،۷، ۱۴ و ۲۱. داده ها به صورت sd ± نمایش داده داده شده است . مقدار p ($p< 0/001$) *** اختلاف معنا داری با گروه کنترل نشان داد.




نمودار ۳- فعالیت آلکالین فسفاتاز سلول‌های بنیادی چربی کشت داده شده در داربست های قطره ایی آلژینات- کیتوزان در روزهای مختلف نشان می‌دهد نمونه‌ها تیمار شده در روزهای ۷ ، ۱٤ و ۲۱ دارای تفاوت معنا داری نسبت به نمونه کنترل هستند. $p < ۰/۰۰۱$ *** اختلاف معنا داری با گروه کنترل نشان داد.




نمودار ٤- الگوی بیان ژن‌های BMP 2/6 و SAMAD 4 و ژن های تمایزی استئوکلسین(Osc) و استئوپونتین(Opn) در سلول-های بنیادی چربی در داربست آلژینات – کیتوزان پس از تیمار با اگزوزوم ۵۰ µg/ml در روز ۲۱ .

**بحث**

مهندسی بافت یکی از علوم جدید است که در سال-های اخیر در درمان ضایعات بافتی و اندامی و حتی جایگزینی کامل یک اندام، بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۲۳). امروزه تحقیقات در زمینه مهندسی بافت در سطح وسیعی رو به گسترش است به طوری که مهندسی بافت توانایی بالقوه برای ساخت عضو و بافت را دارد اهداف مهندسی بافت فراهم‌سازی اندام-های کارآمد یا جایگزین قسمتی از بافت برای بیمارانی با ضعف یا از کارافتادگی اندام و یا بیماری-های حاد است که این امر با استفاده از روش‌های درمانی متنوع اندام مصنوعی- زیستی تحقق می‌یابد (۳۳). اخیرا دانشمندان دریافته‌اند که کشت سه بعدی سلول‌ها تغییرات شگفت‌انگیزی را در ساختار و عملکرد آن به وجود می‌آورد (۱). این داربست‌های سه بعدی همچنین باعث ایجاد فتوتیپ‌های سلولی مشابه فتوتیپ‌های درون بدن می‌شود و شکل‌زایی

بافت را نیز افزایش می‌دهند. تلاش‌های مهندسان بافت در جهت ایجاد ساختارهای با تقلید از ویژگی-های بافت‌های بدن می‌شود (۳۲).

آلژینات یک بیوپلیمر طبیعی است که به طور عمده از جلبک قهوه‌ای و به میزان کمتر از باکتری‌ها استخراج می‌شود مطالعات نشان داده که آلژینات سبب افزایش و رشد و تکثیر سلول‌های استوبلاستی و کندروستی کشت داده شده بر روی این داربست می‌شود. از دیگر داربست های پرکاربرد و بیوپلمیری در مهندسی بافت کیتوزان است.کیتوزان پلیمر گلیکوزآمین و N- استیل کلوگز آمین است که دپلاریزاسیون و داستیلاسیون کیتون بدست می‌آید (۱). کیتوزان از لحاظ زیست-تخریب‌پذیری بسیار مناسب است و ساختاری شبیه گلیکوزآمینوگلیکان‌ها دارد (۲۵).

Yunfan و همکارانش در سال ۲۰۲۰ از داربست های کیتوزان به همراه اسید اتیلن دی آمین ترا استیک (EDTA) برای ایجاد گروه‌های کربوکسیل بیشتر و به دنبال آن پیوند فیزیکی کلسیم برای افزایش قدرت هیدروژل برای لود سلول‌های کندروسیت استفاده کردند. نتایج آن ها نشان داد داربست های کیتوزان به همراه اسید اتیلن دی آمین ترا استیک (EDTA) محل مناسبی برای رشد و تکثیر سلول‌های غضروفی می-باشد (۲۹).

Ghosh و همکارانش در سال ۲۰۱۹ از ترکیب آلژینات به همراه Fmocff برای ساخت داربست‌های هیدروژلی برای ترمیم و تکثیر سلول های استخوانی استفاده کردند. آنها پیشنهاد می دهند هیدروژل ترکیبی چسبندگی، تکثیر و تمایز استخوانی را تسهیل می‌کند و در بازسازی استخوان موثر است (۸). همچنین Maji و همکارانش در سال ۲۰۱۶ نشان دادند که داربست-های کیتوزانی دارای خواص عالی آب‌دوستی، زیست-تخریب‌پذیری، غیرسیتوتوکسیک، حمایت سلول‌های بنیادی و کمک به تکثیر تمایز آنها می‌کند. همچنین نشان دادند که این داربست‌های کامپوزیتی نامزدهای بلقوه‌ای برای بازسازی بافت استخوان هستند. همچنین نتایج ما در راستا با نتایج قبلی نشان می‌دهد استفاده توام آلژینات و کیتوزان می‌تواند بستر مناسبی برای رشد و تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی چربی به سمت استئوژنیک باشد (۱۴).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌های بنیادی چندتوانی هستند که قادر به خودنوزایی و تمایز به انواع سلول‌های عملکردی می‌باشند. جداسازی آسان، ظرفیت مهاجرت بالا، میزان تکثیر به نسبت زیاد و توانایی آنها جهت جلوگیری از پاسخ‌های آلوژنیک پس از رد پیوند، آنها را به عنوان کاندیداهای جذابی در طب ترمیمی معرفی نموده است (۱۷).

Ciuffi و همکارانش در سال ۲۰۱۷ نشان دادند سلول های بنیادی مشتق شده از بافت چربی (ASC) همراه با آدیوسیت‌ها، سلول‌های اندوتلیال عروقی و سلول های عضلانی صاف، در بافت چربی قرار دارند. ASCs مانند سلول‌های بنیادی مغز استخوان انسان (BMSCs) می‌توانند به چندین رده (سلول‌های چربی، فیبروبلاست، کندروسیت‌ها، استئوبلاست‌ها، سلول-های عصبی، سلول‌های اندوتلیال و میوسیت‌ها) تقسیم شوند. آنها همچنین نشان دادند که این سلول‌ها در کشت‌های بلند مدت دارای ایمنی و از لحاظ ژنتیکی پایدار هستند. با این وجود، بر خلاف BMSCs، ASCs را می‌توان به راحتی در مقادیر زیادی با حداقل روش‌های تهاجمی برداشت کرد. این ویژگی‌ها نشان می‌دهد که این سلول‌ها ممکن است یک ابزار مفید در مهندسی بافت و پزشکی احیا کننده باشند (۳).

صالحی نیک و همکارانش در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که بافت‌های چربی در مهندسی بافت استخوان از اهمیت زیادی برخوردارند زیرا به مقدار زیاد به عنوان مواد زائد در دسترس هستند. پماد چربی باکال (BFP) یک بافت ویژه بافت چربی است که به راحتی

برداشت می‌شود و حاوی یک منبع خون محسوب می‌شود و برداشت آن موجب عوارض کمتری برای بیماران می‌شود. ما در این پژوهش از سلول‌های بنیادی چربی با توجه به ویژگی‌های ذکر شده به منظور تمایز به سمت استئوبلاست‌ها استفاده کردیم (۲۰).

به منظور بهبود و سرعت بخشیدن به فرآیند تمایز از فاکتورهای متعددی از جمله فاکتورهای رشد فیبروبلاستی، هورمون‌ها، داروها و غیره استفاده می-شود (۲۰). اگزوزوم‌ها نانووزیکولی محصور در غشا با لایه ی فسفولیپیدی می‌باشد و ترکیبی مشابه سلول والد خود شامل انواعی از پروتئین ها مانند پروتئین-های شوک حرارتی (Hsp70 و Hsp۹۰)، ترانسپورترهای غشایی و اتصالی (Annexin و GTPases) و تترااسپانین‌ها CD63، CD9 و CD81، CD82 هستند (٤). علاوه بر پروتئین‌ها، اگزوزوم‌ها شامل لیپیدهای درگیر در انتقال سلول، mRNA های ترجمه شونده و همچنین RNAهای کوچک می‌شوند. در میان RNAهای کوچک miRNAها با نسبت بیشتری در اگزوزوم‌ها وجود دارند (٤). درمان با اگزوزوم سبب بهبود پیامدهای درمانی می‌شود (٤).

Liu و همکارانش در سال ۲۰۱۷ نشان دادند اگزوزوم‌ها، نانوذراتی از غشای هسته‌ای اندوسیتیک هستند که مولکول‌های زیست فعال و میانجی را حمل و انتقال می‌دهند و ارتباط بین سلولی بین سلول‌ها و بافت‌ها برقرار می‌کنند همچنین نشان دادند که اگزوزوم‌ها در فرآیندهای بیولوژیک، از جمله متابولیسم، مسیرهای انرژی، متابولیسم پروتئین، رشد و نگهداری سلول و حمل و نقل دخیل بودند. پروتئین های که در این فرآیندها نقش دارند، PHGDH، LGALS3BP، SEMG1، ACTB، GAPDH شناسایی شدند. این مطالعه ارائه یک توصیف جامع‌تر از اگزوزوم هسته پروتئوم و همچنین می‌تواند یک منبع برای بیشتر غربالگری بیومارکرها و مطالعات پروتئومیک مقایسه‌ای، از جمله موارد مرتبط با ناباروری مرد و سرطان پروستات باشد (۱۳).

Xie و همکارانش در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که اگزوزوم‌های مشتق از استخوان دارای چندین نقش هستند از جمله فعال کردن استئوبلاست‌ها و غیرفعال کردن استئوکلاست‌ها و همچنین سبب بیان ژن‌های Wnt5a و RUNX2 که در استخوان‌سازی نقش بسزایی دارند می‌شود (۲۸).

Guihard و همکارانش در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که جذب استخوان توسط استئوکلاست‌ها و تشکیل استخوان توسط استئوبلاست ها به طور فزاینده‌ای از عوامل مرتبط با فرآیند استخوان‌سازی هستند. ماکروفاژها به عنوان یکی دیگر از سلول‌های حیاتی سلولی که باعث تشکیل استخوان می‌شود. همچنین آنها نشان دادند که سلول‌های مونوسیتی و ماکروفاژی سبب فعال شدن مسیرهای استئوژنزی می‌شود (۹).

Sun و همکارانش در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که مونوسیت های جمع آوری شده از خون محیطی می-تواند سبب افزایش بیان مارکرهای SDF-1a، TGF-b1، VEGFa در سلول‌های مزانشیمی لود شده در داربست سیلیکون و کلاژن می‌شود این یافته‌ها نشان داد که سلول‌های مونوسیت توانایی افزایش ارتقا این سلول‌ها را به سلول‌های استخوانی دارند (۲۱).

Ekstrom و همکارانش در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که اگزوزم‌های استخراج شده از مونوسیت‌ها و ماکروفاژها سبب افزایش بیان فاکتورهای تمایزی RUNX2 و BPM2 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان می‌شود و سبب تحریک این سلول ها به سمت استخوان‌سازی می‌شوند (۷). نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر که هم راستا با نتایج گذشته است نشان می‌دهد که اگزوزوم‌های مشتق شده از مونوسیت‌ها و ماکروفاژها سبب رشد و تکثیر

سلول‌های بنیادی چربی در داربست‌های کیتوزان آلژینات می‌شوند همچنین با گذشت زمان سبب تمایز این سلول‌ها به سمت بافت استئوژنیک می‌شوند که نتایج تست تمایزی آلکالین فسفاتاز نشان داد که با گذشت زمان میزان این آنزیم افزایش پیدا می‌کند و در روز ۲۱ به حداکثر میزان می‌رسد. همچنین نتایج تست Real-Time PCR در روز ۲۱ نشان داد ژن‌های BMP2/6، SMAD4 و استئوکلسین و استئوپونتین افزایش پیدا می‌کنند که این نشان‌دهنده فعال شدن مسیر استئوژنیک می‌باشد. با افزایش فعالیت BMP2 ها گیرنده BPM2 فعال و سبب فعال شدن آبشار سیگنالینگی می‌شود که در مسیر آن SMAD4 به عنوان رابط قرار دارد و با افزایش فعالیت SAMAD4 سبب فعال شدن SAMAD1/5/8 می‌شود که به موجب آن ژن‌های استئوژنیک مثل استئوپئتین و استوکلسین فعال می‌شوند و BMP6 هم کمک کننده این مسیر پیام‌رسانی است.

## نتیجه‌گیری

افزایش ژن‌های تمایزی استئوکلسین (Osc) و استئوپونتین (Opn) در نمونه‌های تیمار شده ثابت کرد که اگزوزوم‌های مشتق شده از مونوسیت‌ها و ماکروفاژها می توانند سبب تمایز سلول‌های بنیادی چربی در داربست‌های کیتوزان آلژینات شوند.

## تشکر و قدردانی

از همکاران مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

## منابع

1. Ahmed G.M., Abouauf E.A., Abubakr N., Dörfer C.E., El-sayed K.F. 2020. Review Article Tissue Engineering Approaches for Enamel , Dentin , and Pulp Regeneration : An Update. *stem cell International*, 2020(2): 1-15.

2. Bendtsen S.T. 2017. Alginate Hydrogels for Bone Tissue Regeneration. *Uconn*, 4(7): 1-149.

3. Ciuffi S., Zonefrati R., Brandi ML. 2017, Adipose stem cells for bone tissue repair. *Clinical Cases of Mineral Bone Metabolism*, 14(4): 217.

4. De C., Gomez T., Goreham R.V., Serra JJB., Nann T., Kussmann M. 2018, Exosomics A Review of Biophysics ,Biology and Biochemistry of Exosomes With a Focus on Human Breast Milk. *Front Genetics*, 9(5): 1-11.

5. Do A.V., Khorsand B., Geary S.M., Salem A.K. 2015. 3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications. *Advacces in Healthcare Materials*, 4(6): 1742-1762.

6. Doustgani A., Vasheghani-Farahani E., Soleimani M., Hashemi-Najafabadi S. 2011. Preparation and characterization of aligned and random nanofibrous nanocomposite scaffolds of poly (vinyl alcohol), poly (e-Caprolactone) and nanohydroxyapatite. *International Journal of Nanosciece a Nanotechnology*, 7(7): 127-132.

7. Ekström K., Omar O., Granéli C., Wang X., Vazirisani ndF., Thomsen P. 2013. Monocyte Exosomes Stimulate the Osteogenic Gene Expression of Mesenchymal Stem Cells. *PLoS One*, 8(9): 1-14.

8. Ghosh M., Halperin-sternfeld M., Grinberg I., Adler-abramovich L. 2019. Injectable Alginate-Peptide Composite Hydrogel as a Scaffold for Bone Tissue Regeneration. *Nanomaterials*, 9(3):14.

9. Guihard P., Danger Y., Brounais B., David E., Brion R., Delecrin J., Richards CD., Chevalier S., Rédini F., Heymann D., Gascan H., Blanchard F . 2012. Induction of osteogenesis in mesenchymal stem cells by activated monocytes/macrophages depends on oncostatin M signaling. *Stem*

bioprinting: Future perspectives. *Curr Res Cardiology*, 2(5): 193-196.

19. Patel G.K., Khan M.A., Zubair H., Srivastava S.K. 2019. Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield ,purity and downstream applications. *scientificreports*, 9(4):1-10.

20. Salehi-Nik N., Rezai Rad M., Kheiri L., Nazeman P., Nadjmi N., Khojasteh A. 2017. Buccal Fat Pad as a Potential Source of Stem Cells for Bone Regeneration: A Literature Review. *Stem Cells Int*ernational, 2017: 1-13. (In Persian).

21. Sun J., Jiao K., Niu L., Jiao Y., Song Q., Shen L., Tay F.R., Chen J. 2017. Intrafibrillar silicified collagen scaffold modulates monocyte to promote cell homing, angiogenesis and bone regeneration. *Biomaterials*, 113(8): 203-216.

22. Tabriz AG., Hermida MA., Leslie NR., Shu W. 2015, Three-dimensional bioprinting of complex cell laden alginate hydrogel structures. *Biofabrication*, 7: 45012.

23. Tan Y., Richards DJ., Trusk TC., Visconti RP., Yost MJ., Kindy MS., Drake CJ., Argraves WS., Markwald RR., Mei Y . 2014. 3D printing facilitated scaffold-free tissue unit fabrication. *Biofabrication*, 6(24): 1-11.

24. Tuğrul TD., Gülseren IM. 2017. bioprintable form of chitosan hydrogel for bone tissue engineering. *iposeince*, 3(2): 1-15.

25. Valido DP., Déda W., Júnior G., Andrade ME De., Rezende AA., Campos CDA., Maria A., Oliveira S., Silva B., Souza S.D. 2020. Otoliths-composed gelatin/sodium alginate scaffolds for bone regeneration. *drug Delivery translational Research*, 12: 14.

26. Wang G., Wang X., Huang L. 2017. Feasibility of chitosan-alginate (Chi-Alg) hydrogel used as scaffold for neural tissue *Cells*, 30: 762-772.

10. Hu L., Wang J., Zhou X., Xiong Z., Zhao J., Yu R., Huang F., Zhang H., Chen L. 2016. Exosomes derived from human adipose mensenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts. *Scientific Reports*, 6: 32993

11. Kapellos T.S., Bonaguro L., Gemünd I., Reusch N., Saglam A., Hinkley ER., Schultze J.L. 2019. Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. *Immunology*, 10:1-13.

12. Kumbhar S.G., Pawar S.H. 2017 Self-Functionalized, Oppositely Charged Chitosan-Alginate Scaffolds for Biomedical Applications. Biotechnology Indian Journal, 13(2): 130

13. Liu X., Yang Y., Li Y., Niu X., Zhao B., Wang Y., Bao C., Xie Z., Lin Q., Zhu L. 2017. Integration of stem cell-derived exosomes with in situ hydrogel glue as a promising tissue patch for articular cartilage regeneration. *Nanoscale*, 9(7): 4430-4438.

14. Maji K., Dasgupta S., Pramanik K., Bissoyi A. 2016. Preparation and Evaluation of Gelatin-Chitosan-Nanobioglass 3D Porous Scaffold for Bone Tissue Engineering. *International Journal of Biomaterials*, 2016: 1-14.

15. Malda J., Boere J., van de Lest C.H.A., van Weeren P.R., Wauben M.H.M. 2016. Extracellular vesicles - new tool for joint repair and regeneration. *Natural Review of Rheumatology*, 12(3):243-249.

16. Markwald RR., Mironov V. 2015. Organ printing: from bioprinter to organ biofabrication line. *Expert Opin Biological Therapy*, 10: 409-420.

17. Miana V.V., González E.A.P. 2018. Adipose tissue stem cells in regenerative medicine. *Ecancer*, 12(2): 1-17.

18. Ms JO., Hellein Bs J., Singla Hs R., Singal PK., Faha P., Singla DK., Fiacs F. 2015. Stem cells in three-dimensional

engineering: a pilot study in vitro. *Biotechnol Biotechnol Equipments*, 31(7): 766-773.

27. Wang S., Lee J.M., Yeong WY. 2015, Smart hydrogels for 3D bioprinting. *International Journal of Bioprinting*, 1(1): 3-14.

28. Xie Y., Chen Y., Zhang L., Ge W., Tang P . 2017, The roles of bone-derived exosomes and exosomal microRNAs in regulating bone remodelling. *Journal of Cell and Molecular Medicine*, 21:1033-1041.

29. Yunfan H. , Derakhshanfar S., Wen Z., Li B., Lu F., Xing X.L. 2020, *Nanomaterials*, 2020(8):1-11.

30. Zhang Y., Liu Y., Liu H., Tang WH. 2019, Exosomes : biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Bioscience*, 9: 1-18.

31. Zhao J., Yan X. 2019, Regulating Preparation Of Functional Alginate-Chitosan Three-Dimensional Scaffold For Skin Tissue Engineering. *International Journal of Nanomedicine*, 14(7): 8891-8903.

32. Zhou S., Wang Y., Zhang K., Cao N., Yang R., Huang J., Zhao W., Rahman M., Liao H., Fu Q. 2020, The Fabrication and Evaluation of a Potential Biomaterial Produced with Stem Cell Sheet Technology for Future Regenerative Medicine. *stem cell Interational*, 2020(5): 1-12.