

Preparation of Natural Scaffold from Sciatic Nerve and Viability Evaluation of Seeded Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

Abnosi MH, Ph.D^{1*}, Mahdieh Najafabadi M, Ph.D¹, Soleimani Mehranjani M, Ph.D¹,
Momeni HR, Ph.D¹, Safarabadi F, M.Sc²

1- Biology Department, Faculty of Sciences, Arak University, Arak 38156-8-8349, Iran

2- M.Sc in Developmental Biology, Biology Department, Faculty of Science, Arak University

* Email corresponding author: m-abnosi@araku.ac.ir

Received: 22 Jan. 2011

Accepted: 12 Apr. 2011

Abstract

Aim: Recently, the use of decellularized tissue as a natural scaffold has been considered in tissue engineering. The purpose of this study was to prepare a natural scaffold by decellularization of sciatic nerve and investigate the viability of seeded rat bone marrow Mesenchymal stem cells on that.

Material and Methods: In this experimental study, the rat sciatic nerve was decellularized using three detergents namely Triton X-100, Sodium dodecyl sulfate and sodium desoxy cholate, then rat bone marrow mesenchymal stem cells were seeded on the scaffold by centrifugation method in DMEM medium (Dulbecco Modified Eagle Medium) containing 15% FBS (Fetal Bovine Serum). The viability of cells was evaluated using MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide) test on days 1, 5, 10, 15 and 20. The morphology of the decellulized sciatic nerve and the cells seeded on that were studied using hematoxilin and eosin (H&E) and acridin orange. The data was analyzed using one-way ANOVA and Tukey test and the means difference was considered significant at $P < 0.05$.

Results: Histological studies showed complete removal of the cells from detergent-treated sciatic nerve. The number of viable cells on the scaffold showed a significant increase ($P < 0.05$) 20 days after seeding compared to day 1 and 5, however, the number of viable cells did not increase significantly during days 10, 15 and 20.

Conclusion: The results of this study showed that the prepared scaffold provided a suitable environment for the seeding, growth and proliferation of rat bone marrow mesenchymal stem cells.

Keywords: Decellularized matrix, Scaffold, Mesenchymal Stem Cell, Sciatic Nerve

ساخت داربست طبیعی از عصب سیاتیک و ارزیابی توانایی زیستی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان موش صحرایی کاشته شده بر روی آن

محمد حسین آبنوسی^۱ Ph.D.*، مجید مهدیه نجف آبادی^۱ Ph.D.، ملک سلیمانی مهرنجانی^۱ Ph.D.،
حمید رضامومنی^۱ Ph.D.، فخرالسادات صفرآبادی^۲ M.Sc.

۱- دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، کد پستی ۳۸۱۵۶-۸-۸۳۴۹

۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد زیست شناسی تکوینی، دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: m-abnosi@araku.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱/۲۳

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۱/۲

چکیده

هدف: اخیراً استفاده از بافت بدون سلول به عنوان داربست طبیعی در مهندسی بافت مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. هدف تهیه داربست طبیعی از عصب سیاتیک بدون سلول و ارزیابی توانایی زیستی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان موش صحرایی کاشته شده بر روی آن بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی سلول‌های عصب سیاتیک با استفاده از تریتون X-100، سدیم دودسیل سولفات و سدیم دزوکسی کولات حذف و داربست طبیعی تهیه شد. سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان در محیط کشت (DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) حاوی ۱۵٪ FBS (Fetal Bovine Serum) با روش سانتریفیوژ بر روی داربست کاشته شد. توانایی زیستی سلول‌ها در ۱، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ روز پس از کاشت با آزمون MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide) ارزیابی گردید. مورفولوژی داربست و سلول‌های مزانشیم کاشته شده بر روی آن توسط رنگ آمیزی های هماتوکسیلین-ائوزین و آکریدین اورنج بررسی شد. داده‌ها با روش آنالیز واریانس یک طرفه و تست Tukey در سطح $P < 0.05$ بررسی شد.

نتایج: مطالعات بافت‌شناسی حذف کامل سلول‌ها از عصب سیاتیک تیمار شده با دترجنت‌های فوق را نشان داد. تعداد سلول‌های زنده بر روی داربست ۲۰ روز بعد از کاشت نسبت به روزهای ۱ و ۵ افزایش معنی‌داری ($P < 0.05$) را نشان داد اما افزایش معنی‌داری بین تعداد سلول‌ها بر روی داربست طی روزهای ۱۰، ۱۵ و ۲۰ مشاهده نشد ($P > 0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که داربست طبیعی تهیه شده از عصب سیاتیک فاقد سلول دارای شرایط لازم برای کاشت، رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان می‌باشد.

واژگان کلیدی: ماتریکس فاقد سلول، داربست، سلول بنیادی مزانشیم، عصب سیاتیک

مقدمه

سلول‌های بنیادی سلول‌های غیر تخصصی هستند که قادر به خود تکثیر بوده، توانایی قابل ملاحظه‌ای در تکامل به انواع مختلف سلول‌های بدن را داشته و به عنوان منبعی برای ترمیم بافت‌های صدمه دیده بدن می‌باشند (۱ و ۲). بر اساس منشا، دو نوع سلول بنیادی جنینی و بالغ تشخیص داده شده است، سلول بنیادی مزانشیمی مغز استخوان که جز سلول‌های بنیادی بالغ هستند و می‌توانند به رده‌های مزانشیمی و غیر مزانشیمی تمایز یابند (۲). سلول‌های بنیادی مزانشیمی علاوه بر توانایی خود تکثیری بالا به سهولت از مغز استخوان به دست آمده و به سرعت در محیط کشت گسترش می‌یابند. این سلول‌ها چند ظرفیتی هستند و تحت شرایط آزمایشگاهی خاص دارای قدرت تمایز به چندین رده مختلف سلولی مانند استئوبلاست، آدیپوسیت و کندروسیت می‌باشند. اخیراً توانایی تمایز این سلول‌ها به رده‌های عصبی نظیر نورون، آستروسیت، الیگوسیت و سلول‌های شوآن در محیط *in vitro* و *in vivo* نیز گزارش شده است (۳، ۴ و ۵).

ترمیم ضایعات در سیستم عصبی محیطی یک چالش بزرگ در پزشکی به حساب می‌آید. امروزه از گرافت عصبی اتولوگ برای حل این مشکل استفاده می‌شود که داربستی را برای ترمیم آکسون نیز فراهم می‌نماید. به هر حال اتوگرافت‌ها به مقدار محدود در دسترس است. روش دیگر استفاده از داربست‌های طبیعی و یا مصنوعی است مثلاً بکارگیری لوله‌های توخالی تهیه شده از مواد مصنوعی و یا مواد طبیعی نظیر کلاژن که محیط مناسبی را برای ترمیم آکسون در فواصل کوتاه فراهم می‌آورد، هر چند این موارد نیز ترمیم عصب را در فواصل طولانی موجب نمی‌شوند (۶ و ۷). لذا امروزه توجه محققان بر استفاده از آلوگرافت‌ها متمرکز شده است (۸). اما مشکل استفاده از این گرافت‌ها رد پیوند توسط سیستم ایمنی بدن است.

بکارگیری داربست‌های تهیه شده از عصب آلژنیک بدون سلول برای کاهش و یا حذف پاسخ ایمنی توسط چندین محقق گزارش شده است (۹ و ۱۰). این فرایند پاسخ ایمنی را کاهش می‌دهد زیرا اجزاء سلول که منبع اصلی آنتی ژنی در بافت پیوند شده است در این روش حذف می‌شوند. این بافت‌های بیولوژیک فاقد سلول به عنوان مواد زیستی طبیعی برای ترمیم بافت قابل استفاده است (۹). این مواد مرکب از پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی بوده که در موجودات مختلف حفظ شده و می‌تواند داربستی مناسب برای اتصال، مهاجرت و تکثیر سلول فراهم آورد

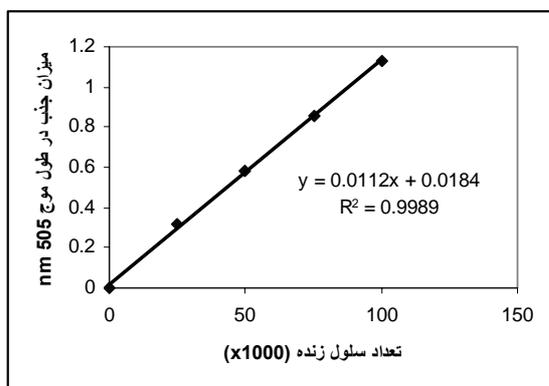
(۹). کشت مجدد سلول از خود فرد پیوند گیرنده بر روی این داربست، مشکلات مربوط به رد پیوند را مرتفع می‌سازد. از این رو هدف از انجام این تحقیق تهیه داربست طبیعی از عصب سیاتیک بدون سلول و سپس کاشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی بر روی آن و ارزیابی قدرت زیستی و تکثیر این سلول‌ها بود. در ادامه سلول‌های کاشته شده با ۲- مرکاپتواتانول به عنوان ماده تمایز دهنده به سلول‌های شبه نورون تیمار و مورفولوژی آنها در دو محیط کشت دو بعدی و سه بعدی (داربست) بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی: در این مطالعه پژوهشی استخوان ران و ساق پای موش صحرایی (رت) پس از بی‌هوشی با دی اتیل اتر توسط جراحی جدا و تحت شرایط استریل مغز استخوان توسط ۳ میلی لیتر محیط کشت تغییر یافته ایگل (DMEM) حاوی ۱۵ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و پنی‌سیلین-استرپتومایسین در لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتری فلش اوت شد. لوله فالکون در دور ۲۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و رسوب سلولی حاصل را با یک میلی لیتر محیط کشت هموزن و به فلاسک ۲۵ میلی‌لیتری منتقل گردید. بعد از ۲۴ ساعت، سلول‌های چسبیده به فلاسک با بافر فسفات مثبت (حاوی Ca^{+2} و Mg^{+2}) شسته و به آن محیط کشت تازه اضافه شد. به سلول‌های چسبیده ۱۰-۱۴ روز فرصت برای تکثیر داده و در طی این مدت هر سه روز محیط کشت تعویض شد. بعد از پر شدن کف فلاسک کشت سلول‌ها با ترپسین-اتیلن دی آمین تتراسیتیک اسید (Trypsin-EDTA) جدا و نیمی از آن در یک فلاسک دیگر کشت داده شد و این کار تا پاساژ سوم تکرار گردید.

تمایز سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان رت به استئوبلاست: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت بعد از پاساژ سوم را در پلیت شش خانه کشت و بعد از چسبیدن به کف ظرف با محیط کشت DMEM + FBS حاوی ترکیبات تمایزی استئورژنیک (بتا-گلیسرول فسفات، دگزامتازون و آسکوربیک اسید) به مدت ۲۱ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن قرار گرفتند. بعد از این مدت سلول‌ها توسط رنگ آلازاین رد (برای استئوبلاست) رنگ آمیزی شدند.

(MTT) استفاده شد (۱۳). در این روش آنزیم سوکسینات دهیدروژناز در میتوکندی سلول‌های زنده توانایی احیای رنگ زرد دی متیل تiazول دی فنیل تترازولیوم را به بلورهای ارغوانی و نامحلول فورمازان دارد. پس از کاشت سلول بر روی داربست، داربست‌ها به مدت ۲۰ روز در محیط DMEM در داخل چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه در انکوباتور CO₂ با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و در فواصل زمانی مختلف (۱، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ روز) آزمون رنگ سنجی MTT بر روی داربست‌ها انجام گردید. بدین طریق که محلول MTT (۱۰ میکرولیتر از محلول ۱ میکروگرم/میلی لیتر) به داخل چاهک اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در انکوباتور CO₂ دار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس درون هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکسید (DMSO) ریخته شد و هر ۳ قطعه عصب سیاتیک رنگ آمیزی شده در یک خانه از پلیت برای مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. بعد از ۳۰ دقیقه نمونه‌ها به طور کامل از DMSO خارج و میزان جذب هر چاهک به وسیله دستگاه Eliza Reader در طول موج ۵۰۵ نانومتر اندازه گیری شد. تعداد سلول‌های زنده در داربست با استفاده از منحنی استاندارد تعیین شد (۱۴). برای تهیه منحنی استاندارد ابتدا تعداد ۰، ۱۰۳ × ۲۵، ۱۰۳ × ۵۰، ۱۰۳ × ۷۵، ۱۰۴ × ۱۰ سلول به ازای هر خانه پلیت ۹۶ خانه به مدت ۲۴ ساعت جهت چسبیدن سلول‌ها به کف خانه‌ها در شرایط استاندارد در انکوباتور کشت شد. بعد از ۲۴ ساعت، مراحل سنجش تترازولیوم مشابه روش فوق انجام شد و منحنی استاندارد با توجه به تعداد سلول‌ها و میزان جذب هر خانه ترسیم شد (نمودار ۱).



نمودار ۱) منحنی استاندارد سنجش MTT

حذف سلول از عصب سیاتیک: حذف سلول از عصب سیاتیک توسط روش Sondell و همکاران (۱۱) انجام شد. به طور خلاصه قطعات عصب سیاتیک پس از جداسازی از پای موش صحرایی به مدت ۷۲ ساعت در محلول I (۷/۳ گرم EDTA ۰/۵ گرم سدیم آزید، ۸۰۰ میلی لیتر گلیسرول، ۲۰۰ میلی لیتر کلرور سدیم ۰/۹ درصد) قرار داده شد. سپس نمونه‌ها به محلول II (۲۵ گرم سدیم دزوکسی کولات، ۰/۲۶ گرم سدیم آزید و ۶۰۰ میلی لیتر آب مقطر) برای زمان ۷۲ ساعت منتقل شدند و مجدداً به محلول I برای ۴۸ ساعت بازگردانده شدند. در مراحل بعدی نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت به محلول III (۱۰ گرم سدیم دو دسیل سولفات (SDS)، ۰/۵۲ گرم سدیم آزید و ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر) وارد و پس از آن به محلول IV (۱۵ میلی لیتر تریتون X100، ۰/۲۵ گرم سدیم آزید و ۴۸۵ میلی لیتر آب مقطر) انتقال داده شدند و بعد از ۴۸ ساعت مجدداً به محلول III بازگردانده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در این محلول قرار گرفتند.

مطالعه داربست: به منظور اطمینان از حذف سلول‌ها در عصب سیاتیک ابتدا قالب‌های پارافینی از داربست تهیه و به وسیله میکروتوم برش‌های ۷ میکرونی تهیه شد. سپس برای مشاهده سیتوپلاسم و هسته سلول‌ها از روش‌های رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین استفاده شد. همچنین مورفولوژی سیتوپلاسم سلول‌های تمایز یافته به شبه نرون با استفاده از رنگ فلورسنس اکریدین اورانژ (۱۰ میکرولیتر از محلول ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) توسط میکروسکوپ فلورسنس (Olympus IX70) بررسی گردید.

کاشت (Seeding) سلول‌های بنیادی مزانشیم بر روی

داربست: برای کاشت سلول در داربست، پس از جداسازی سلول‌های رشد یافته در کف فلاسک کشت توسط تریپسین، تعداد ۲۵۰۰۰ سلول زنده با ۴ روش مختلف (۱۲) در داربست کاشته شد که عبارتند از تزریق سلول به داربست با الف) سرنگ انسولین، ب) پیپت پاستور ج) سمپلر د) سانتریفوژ داربست همراه با سوسپانسیون سلولی در دور ۲۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه.

بررسی رشد و تکثیر سلول‌ها بر روی داربست توسط

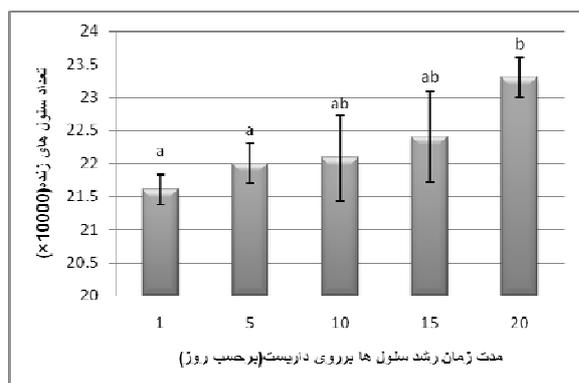
آزمون MTT: برای بررسی رشد و تکثیر (قدرت زیستی) سلول‌های کاشته شده بر روی داربست از آزمون ۳- (۴ و ۵-دی متیل تiazول-۲-ایل)-۲ و ۵-دی فنیل تترازولیوم برومید

بررسی کاشت و نفوذ سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان موش صحرایی بر روی داربست

نتایج حاصل از بررسی میکروسکوپی مقاطع بافتی تهیه شده از داربست، پس از کاشت سلولها با ۴ روش مختلف نشان داد که استقرار و نفوذ سلولها بر روی داربست در روش سانتریفیوژ نسبت به سایر روشها بیشتر و مناسبتر بود (شکل ۴).

بررسی نمودار رشد و تکثیر سلول‌های مزانشیم کشت شده بر روی داربست

از مقایسه میانگین تعداد سلول‌های زنده بر روی داربست در طی روزهای ۱، ۵، ۱۰ و ۱۵ تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($P > 0.05$). در حالی که میانگین تعداد سلولها در ۲۰ روز بعد از کشت با روزهای ۱ و ۵ دارای تفاوت معنی دار بود ($P < 0.05$) (نمودار ۲).



نمودار ۲) ارزیابی تعداد سلول‌های زنده کاشت شده بر روی داربست (با استفاده از عمل سانتریفیوژ، کشت ۳ بعدی) طی روزهای ۱، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ روز به کمک روش *MTT* افزایش معنی دار در میانگین تعداد سلول‌های زنده در ۲۰ روز پس از کاشت نسبت به روزهای اول و پنجم مشاهده شد ($P < 0.05$). مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار می‌باشد. میانگین‌های با کد حرف‌های متفاوت دارای تفاوت معنی دار می‌باشد (*one-way ANOVA, Tukey test, P < 0.05*).

بررسی تمایز مورفولوژیکی سلول‌های بنیادی مزانشیم به سلول‌های شبه نورون بر روی داربست

رنگ آمیزی با آکریدین اورنج تشکیل استتاله‌های عصبی را در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان تمایز یافته به سلول شبه نورون در کشت دو بعدی و بر روی داربست نشان داد (شکل ۵).

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیم کشت داده شده بر روی داربست به سلول‌های شبه نورون: برای تمایز سلولها به شبه نورون از دو مرحله پیش القاء و القاء استفاده شد. در مرحله پیش القاء از ماده تمایزی مرکاپتوانول با غلظت یک میلی مولار در محیط DMEM و سرم FBS ۱۵ درصد استفاده و پس از گذشت ۲۴ ساعت مرحله القاء با شستشوی محیط توسط بافر PBS⁻ و اضافه کردن محیط القایی شامل مرکاپتوانول با غلظت ده میلی مولار در محیط DMEM بدون سرم انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های حاصل با روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و استفاده از آزمون TUKEY مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و تفاوت میانگینها در سطح $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

ویژگی بافتی داربست تهیه شده

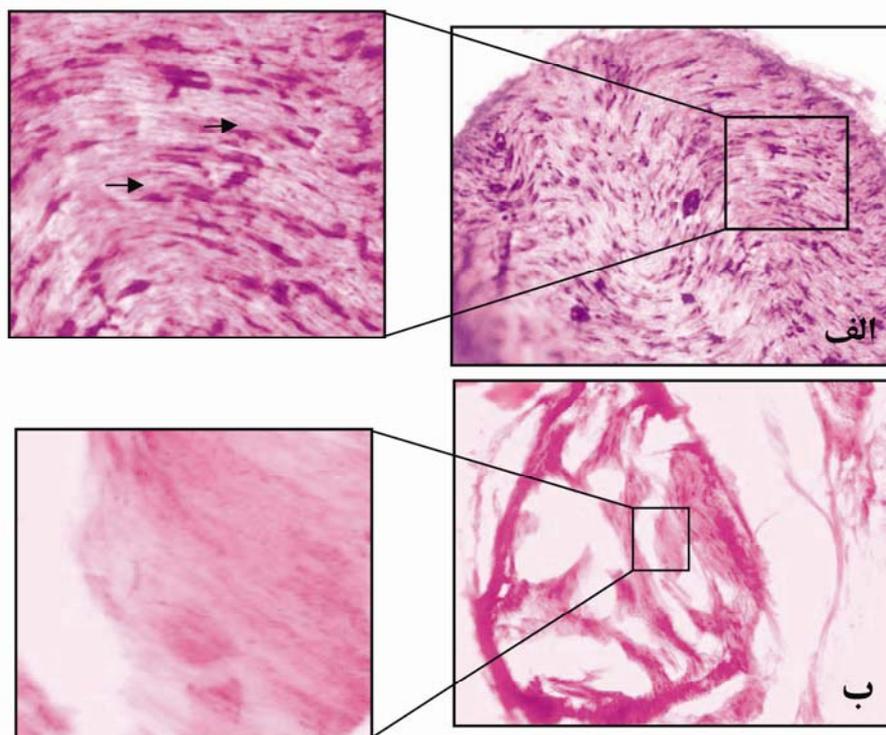
بررسی برش‌های تهیه شده از داربست فاقد سلول و رنگ آمیزی آنها با هماتوکسیلین-اُوزین نشان داد که داربست تهیه شده در مقایسه با عصب سیاتیک کنترل به طور کامل فاقد سلول و دارای ساختار طبیعی بود (شکل ۱).

خالص سازی سلول‌های بنیادی مزانشیم جدا شده از مغز استخوان موش صحرایی

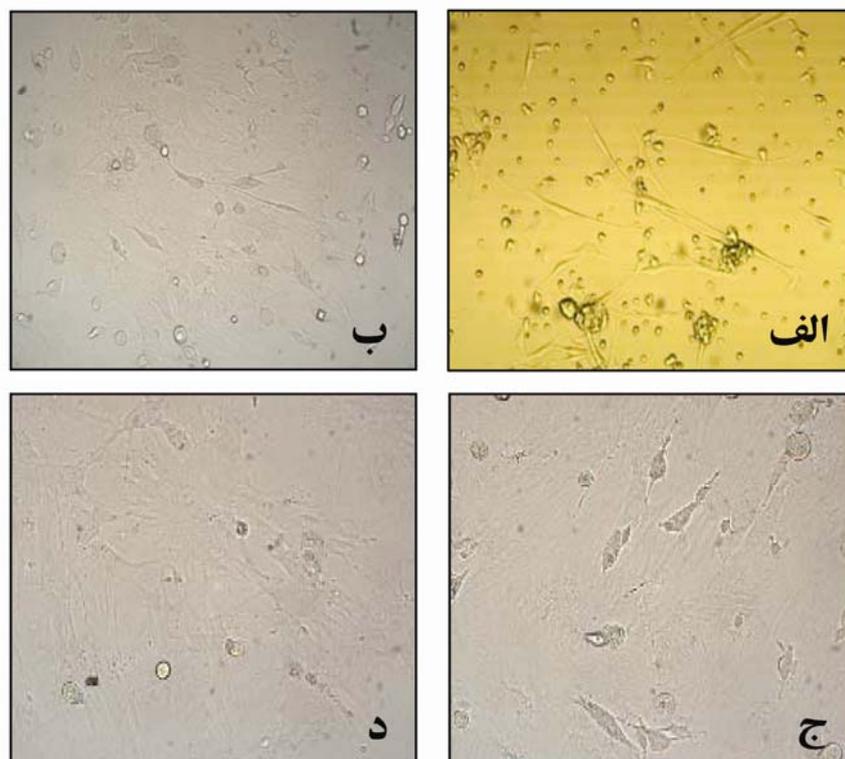
بر اساس مشاهدات میکروسکوپی، سلول‌های مزانشیم مغز استخوان موش صحرایی، ۲۴ ساعت پس از استخراج به کف فلاسک چسبیدند. این سلولها دوکی شکل و دارای زوائد سلولی کمی بودند و به تدریج و در طی ۱۴ روز تراکم یافته و کف ظرف را پر کردند (شکل ۲).

بررسی مزانشیمی بودن سلول‌های استخراج شده

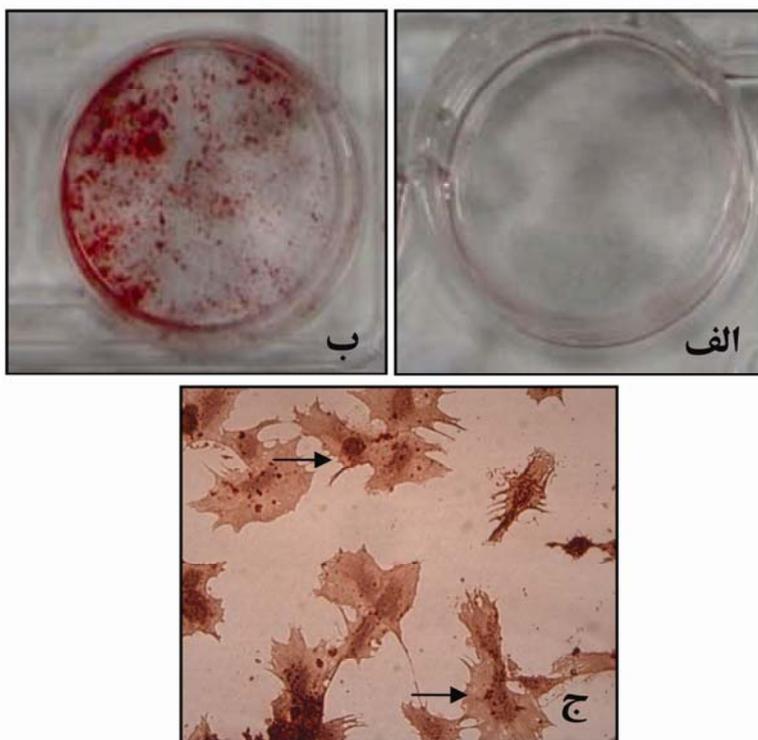
برای اثبات قابلیت مزانشیمی سلول‌های خالص شده علاوه بر قابلیت چسبندگی به ظروف پلاستیکی کشت، این سلولها به سلول‌های استخوانی تمایز داده شدند. سلول‌های بنیادی مزانشیم استخراج شده در حضور محیط تمایزی استئوژنیک تولید ماتریکس استخوانی کردند که پس از رنگ آمیزی با آلیزارین رد به رنگ قرمز در آمد (شکل ۳).



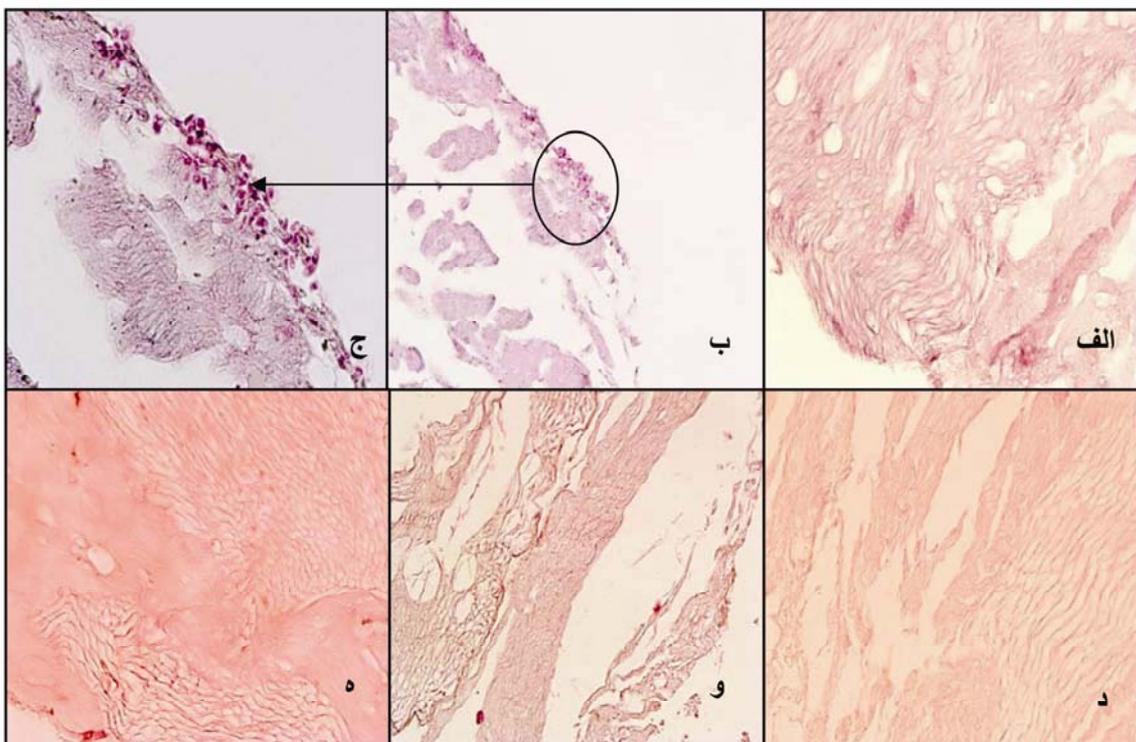
شکل ۱) رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انئوزین برش عرضی تهیه شده از عصب سیاتیک (الف) شاهد و (ب) فاقد سلول ($\times 40$). فلش ها حضور هسته در سلول های عصب سیاتیک شاهد را نشان می دهد.



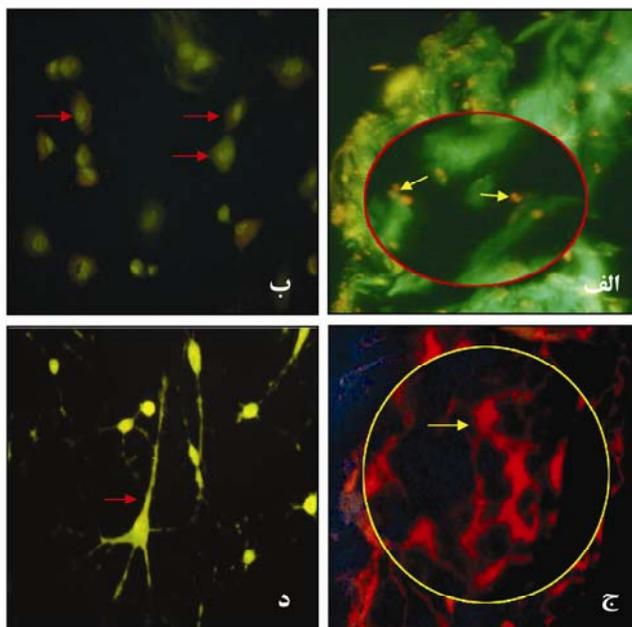
شکل ۲) مراحل استخراج، رشد و تکثیر سلول های بنیادی مزانشیم مستخرج از مغز استخوان موش صحرایی طی پاساژهای مختلف. الف) کشت اولیه (۲ روز پس از استخراج)، ب) سلول های مزانشیم بعد از اولین پاساژ، ج) دومین پاساژ، د) سومین پاساژ.



شکل ۳) تشکیل ماتریکس استخوانی: الف) نمای ماکروسکوپی از عدم تشکیل ماتریکس استخوانی در سلول‌های کنترل (عدم حضور مواد تمایزی استئوژنیک و رنگ آمیزی شده با الیزارین رد)، ب) نمای ماکروسکوپی از تشکیل ماتریکس استخوانی (رنگ قرمز) در سلول‌های تحت شرایط تمایزی و رنگ آمیزی شده با الیزارین رد. ج) نمای میکروسکوپی ماتریکس استخوانی شده و رنگ آمیزی با الیزارین رد.



شکل ۴) مقایسه ۴ روش کاشت سلول بر روی داربست تهیه شده از عصب سیاتیک موش صحرائی. الف) بافت عصب سیاتیک بدون سلول قبل از کاشت سلول بر روی آن. ب و ج) کاشت سلول به روش سانتریفیوژ. چنانچه مشاهده می‌شود استقرار و نفوذ سلولها بر روی داربست و رشد و تکثیر آنها قابل ملاحظه است. د) کاشت با پیپت پاستور. و) کاشت با سوزن انسولین ه) افزودن مستقیم سوسپانسیون سلول به داربست (برش‌های ۷ میکرونی، رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین، ۴۰x).



شکل ۵) رنگ آمیزی فلورسنت (با آکریدین اورانژ) سلول‌های بنیادی مزانشیم رشد یافته بر روی (الف) داربست عصب سیاتیک (کشت ۳ بعدی) و (ب) در کشت ۲ بعدی (فلش‌ها حضور سلول را در این دو محیط نشان می‌دهد) و سلول‌های شبه نوروں بر روی (ج) داربست عصب سیاتیک و (د) در کشت دو بعدی بعد از ۳ ساعت تیمار با ۲-مرکاپتواتانول (فلش‌ها نشان دهنده استپاله‌های سیتوپلاسمیکی سلول‌های شبه نوروں می‌باشد). (۴۰×). سلول‌ها با روش سانتریفیوژ بر روی داربست کاشته شده‌اند.

مهم در تهیه داربست‌های طبیعی مشخص شده است که تریتون X-100 یکی از دترجنت‌های غیر یونی است که اثرات نسبتاً ملایم بر روی ساختار بافت داشته و ضمن اینکه برهمکنش‌های لیپید-لیپید و لیپید-پروتئین را تخریب کرده تاثیری بر برهمکنش پروتئین-پروتئین نداشته به نحوی که پروتئین‌های داخل بافت پس از تیمار با این دترجنت شکل فعال خود را حفظ می‌کنند (۲۵). مطالعات نشان داده که کاربرد تریتون X-100، سدیم دودسیل سولفات و سدیم دزوکسی کولات در حذف سلول از بافت دارای نتایج متفاوتی است و به طور عمده به نوع بافت مورد استفاده برای تهیه داربست بستگی دارد (۲۵، ۲۶ و ۲۷).

نتایج بررسی هیستولوژیک داربست تهیه شده با روش رنگ آمیزی همتوکسیلین اتوزین نشان می‌دهد که داربست حاصله کاملاً فاقد سلول شده است و نتیجه حاصل از این مرحله با مطالعه انجام شده توسط Thomas و همکاران همراستا بود (۲۸). بر روی داربست عصب سیاتیک با ویژگی‌هایی که مطرح شد سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان موش صحرایی با ۴ روش رایج کاشته شد. مطالعات مورفولوژیک از مقاطع بافتی تهیه شده از داربست همراه با سلول‌های کاشته شده بر روی آن نشان داد که کاشت سلول‌ها با روش سانتریفیوژ دارای نتایج بهتر و مناسب‌تری از نظر استقرار، رشد و تکثیر سلول‌ها نسبت به سه روش دیگر بود. این یافته پژوهش حاضر با نتایج بدست آمده از

بحث

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، مورفولوژی داربست تهیه شده نشان داد که عصب سیاتیک کاملاً فاقد سلول شده و توانست محیط مناسبی را برای استقرار، رشد، تکثیر و تمایز مورفولوژیکی سلول‌های بنیادی مزانشیم استخراج شده از مغز استخوان موش صحرایی به سلول‌های شبه نوروں که تحت تیمار با ۲-مرکاپتواتانول به عنوان ماده تمایزی قرار گرفتند را فراهم آورد. این نشان می‌دهد که ماتریکس خارج سلولی باقیمانده در داربست عصب سیاتیک دارای اجزاء و شرایط لازم برای ایجاد برهمکنش‌های مورد نیاز بین سلول‌های کاشته شده و محیط خارج سلولی می‌باشد. این امر نقش استراتژیک ماتریکس خارج سلولی را به عنوان یک داربست بیولوژیک در مهندسی بافت نشان می‌دهد.

برای تهیه این داربست از سه دترجنت TritonX-100، سدیم دودسیل سولفات و سدیم دزوکسی کولات استفاده گردید که توسط سایر پژوهشگران در تهیه داربست‌های طبیعی از بافت‌هایی نظیر دریچه‌های قلب (۱۵)، رگ‌های خونی (۱۶)، پوست (۱۷)، عصب (۱۸ و ۱۹)، عضلات اسکلتی (۲۰)، تاندون (۲۱)، مثانه (۲۲ و ۲۳) و کبد (۲۴) در مهندسی بافت نیز مورد استفاده قرار گرفته است. در بررسی عملکرد این دترجنت‌های

در زمینه تمایز سریع سلول‌های بنیادی مزانشیم به سلول‌های شبه نورون در محیط کشت بیان شده است که این تغییرات مورفولوژیکی که به عنوان علائم تمایز گزارش می‌شود در واقع تغییرات سایتوتوکسیکی هستند و بوسیله محیط و روش رنگ آمیزی القاء می‌شوند (۳۰) ولی در مطالعه حاضر علائم مورفولوژیکی سلول‌های شبه نورون قبل از رنگ آمیزی نیز مشاهده شد.

نتیجه گیری

از یافته‌های مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که داربست تهیه شده از عصب سیاتیک فاقد سلول دارای شرایط لازم برای پذیرش و سپس رشد و تکثیر سلول بنیادی مزانشیم بدست آمده از مغز استخوان موش صحرایی می‌باشد. گرچه سلول‌های رشد یافته بر روی داربست می‌توانند تحت تیمار با مرکاپتواتانول همانند کشت دو بعدی به سلول‌های شبه نورون تمایز یابند ولی جهت تایید نتایج مورفولوژیک لازم است بیان مارکرهای عصبی نیز در این سلول‌ها در آینده مورد مطالعه قرار گیرد. به هر حال با توجه به اینکه داربست عصب سیاتیک یک داربست طبیعی است امید می‌رود که در آینده بتوان در کاربردهای پزشکی از آن استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

مؤلفین لازم می‌دانند از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه اراک به جهت حمایت مالی از این تحقیق کمال تشکر را بنمایند. همچنین از همکاری آقای فراهانی و خانم شجاع فر در انجام این تحقیق تشکر می‌شود.

منابع

1. Baharvand H. Stem cells: Differentiation and applications of stem cells. 1th Ed. Tehran: Khane Zistshenasi Co; 1387.
2. Karaoz E, Ayhan S, Kaymaz F, Kasap M. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. Springer. 2009.
3. Wislet-Gendebien S, Wautier F, Leprince P, Rogister B. Astrocytic and neuronal fate of mesenchymal stem cells expressing nestin. Brain Res Bulletin. 2005; 12: 31-8.
4. Lei Z, Yongda L, Jun M, Yingyu S, et. al. Culture and neural differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. Cell Biol Internat. 2007; 31:916- 917.

مطالعه دیگر محققان بر روی کاشت سلول‌های بنیادی بر روی داربست مصنوعی پلی‌ال-گلیکولیک اسید توسط روش مذکور مطابقت دارد (۱۲). با توجه به اینکه یک داربست مناسب برای استفاده در مهندسی بافت باید از رشد و تکثیر سلول‌ها بر روی خود حمایت کند لذا چنانچه داده‌های این مطالعه نشان داد این ویژگی در داربست تهیه شده وجود دارد به طوری که افزایش معنی‌داری در رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیم بدست آمده از مغز استخوان رت بر روی داربست تهیه شده از عصب سیاتیک فاقد سلول ۲۰ روز بعد از کاشت بر روی داربست مشاهده شد. این امر نشان داد که داربست عصب سیاتیک فاقد سلول دارای شرایط لازم برای مهار مرگ سلولی در سلول‌های کشت شده می‌باشد. اخیراً دانشمندان دریافته‌اند که کشت سه بعدی سلول‌ها تغییرات چشمگیری را در ساختار و عملکرد آنها به وجود می‌آورد به طوری که سرعت تکثیر و مهاجرت فیبروبلاست‌های کشت شده به صورت سه بعدی سریع‌تر از کشت دو بعدی آنهاست. علاوه بر این مطالعات نشان داده است که بیان ژن‌هایی که در رشد، تکثیر و تمایز سلول‌ها نقش دارند در کشت سه بعدی نسبت به دو بعدی افزایش قابل توجهی پیدا می‌کند (۲۹). قابل ذکر است که پیام‌های حاصل از ماتریکس خارج سلولی که به سیگنال‌های داخلی تبدیل می‌شوند در بیان این ژن‌ها نقش بسیار مهمی را به عهده دارد. این فرایند چسبندگی، مهاجرت، تقسیم سلولی و تمایز سلول را تحت تاثیر خود قرار می‌دهد (۲۹).

در این مطالعه از ۲-مرکاپتواتانول به منظور القاء تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیم بدست آمده از مغز استخوان موش صحرایی به سلول‌های شبه نورون استفاده شد. این سلول‌های شبه نورون دارای جسم سلولی کوچک و استتاله‌های سیتوپلاسمی مشخص بود که هم در کشت دو بعدی و هم در کشت سه بعدی مشاهده و مورد بررسی قرار گرفت. استفاده از مرکاپتواتانول جهت القاء تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیم و جنینی به سلول‌های شبه نورون در کشت دو بعدی توسط سایر محققان نیز مورد استفاده قرار گرفته است (۳۰، ۳۱ و ۳۲). Woodbury و همکاران (۳۰) پیشنهاد کردند که القاء نورون با افزودن ترکیبات شیمیایی مخصوص به محیط کشت از جمله بتامرکاپتواتانول، دی متیل سولفوکسید و هیدروکسی آنیزول بوتیل قابل اجرا است به طوری که طی چند ساعت پس از القاء تقریباً ۸۰ درصد سلول‌های بنیادی مزانشیم تیمار شده به سلول‌هایی با ظاهر شبه نورون تمایز می‌یابند و مورفولوژی این سلول‌ها را نشان می‌دهند. اگرچه

5. Junjian J, Zhongwei LV, Yudong G, Jifeng L, et.al. Adult rat mesenchymal stem cells differentiation into neuronal-like phenotype and express a variety of neuro-regulatory molecules in vitro. *Neurosci Res.* 2009; 66:46-47
6. Bertleff MJ, Meek MF, Nicolai JP. A prospective clinical evaluation of biodegradable neurolac nerve guides for sensory nerve repair in the hand. *J Hand Surg [Am].* 2005;30(3):513-8.
7. Mackinnon SE, Dellon AL. Clinical nerve reconstruction with a bioabsorbable polyglycolic acid tube. *Plast Reconstr Surg.* 1990; 85:419-24.
8. Ide C, Osawa T, Tohyama K. Nerve regeneration through allogeneic nerve grafts, with special reference to the role of the Schwann cell basal lamina. *Prog Neurobiol.* 1990; 34(1):1-38.
9. Hudson TW, Zawko S, Deister C, Lundy S, et al. Optimized acellular nerve graft is immunologically tolerated and supports regeneration. *Tissue Eng.* 2004; 10(11-12):1641-51.
10. Hudson TW, Liu SY, Schmidt CE. Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing. *Tissue Eng.* 2004;10(9-10):1346-58.
11. Sondell, M, Lundborg, G, Kanje, M. Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction. *Brain Res.* 1998;795:44-54.
12. Nojehdeyan H, Moztafzadeh F, Zare N, Baharvand H. Differentiation of mouse stem cells into neural cells on PLGA microspheres scaffolds. *Iranian J Pharm Sci.* 2007;3(4):209-216.
13. Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, et.al. Tetrazolium- based assay for cellular viability; A critical examination of selected parameter affecting formazan production. *Cancer Res.* 1991; 51:2551-2560.
14. Shojafar E. The effect of sodium arsenite on viability and induction apoptosis in rat bone marrow stem cells. *Msc Thesis, Arak University;* Jul. 2009.
15. Bader A, Schilling T, Teebken OE, Brandes G, T, et al. Tissue engineering of heart valves—human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1998; 14:279-284.
16. Uchimura E, Sawa Y, Taketani S, Yamanaka Y, et al. Novel method of preparing acellular cardiovascular grafts by decellularization. *J Biomed Mater Res A.* 2003; 67:834-837.
17. Chen RN, Ho HO, Tsai YT, Sheu MT. Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications. *Biomaterials.* 2004; 25:2679-2686.
18. Hudson TW, Liu SY, Schmidt, CE. Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing. *Tissue Eng.* 2004; 10:1346-1358.
19. Kim BS, Yoo JJ, Atala A. Peripheral nerve regeneration using acellular nerve grafts. *J Biomed Mater Res A.* 2004; 68:201-209.
20. Borschel GH, Dennis RG, Kuzon WM. Contractile skeletal muscle tissue-engineered on an acellular scaffold. *Plast Reconstr Surg.* 2004; 113:595-602.
21. Cartmell JS, Dunn MG. Effect of chemical treatments on tendon cellularity and mechanical properties. *J Biomed Mater Res.* 2000; 49:134-140.
22. Freytes DO, Badylak SF, Webster TJ, Geddes LA, et al. Biaxial strength of multilaminated extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials.* 2004; (25):2353-2361.
23. Gilbert TW, Stolz DB, Biancaniello F, Simmons-Byrd A, et al. Production and characterization of ECM powder: implications for tissue engineering applications. *Biomaterials.* 2005; (26):1431-1435.
24. Lin P, Chan C, Badylak SF, Bhatia SN. Assessing porcine liver-derived biomatrix for hepatic tissue engineering. *Tissue Eng.* 2004; (10):1046-1053.
25. Hudson TW, Liu SY, Schmidt CE. Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing. *Tissue Eng.* 2004;(10):1346-1358.
26. Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F, Munsteren CJ, et.al. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2005; (27):566-571
27. Cartmell JS, Dunn MG. Effect of chemical treatments on tendon cellularity and mechanical properties. *J Biomed Mater Res.* 2000;(49):134-140.
28. Thomas W, Gilbert, Tiffany L, Sellaro, Stephen F, Badylak. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials.* 2006;(27) :3675-3683.
29. Bosch P, Pratt SL, Stice SL. Isolation characterization gene modification and nuclear reprogramming of porcine mesenchymal stem cells. *Biol Reprod.* 2006;74: 46-57.
30. Woodbury D, Schwarz EJ, Prochop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiation into neurons. *J Neurosci Res.* 2000;(61): 364-370.
31. Gabriela F, Schwindt T, Calcagnotto ME, Motta FL. Chemically-Induced RAT Mesenchymal Stem Cells Adopt Molecular Properties of Neuronal-Like Cells but Do Not Have Basic Neuronal Functional Properties. *PLoS ONE.* 2009; (4):1-12.
32. Sagara JI, Makino N. Glutathione induces neuronal differentiation in rat bone marrow stromal cells. *Neurochem Rec.* 2008;(33):16-21.