مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۷، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۵، ۱۷۹-۱۹۰

بررسی رشد و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون به استئوبلاست بر روی داربست‌های کامپوزیتی پلی کاپرولاکتون (pcl)

شادی قاضیجهانی .M.Sc [۱]، هاشم یعقوبی .Ph.D [۱*]، اسداله اسدی .Ph.D [۲]

۱- گروه زیست شناسی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران
۲- دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، اردبیل، ایران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: yaghoubi_h@iauardabil.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۳/۲۳

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه بررسی زیست سازگاری و تمایز سلول بنیادی مزانشیمی بند ناف انسانی به استئوبلاست بر روی داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون تهیه شده با روش الکتروریسندگی بوده که تحت اصلاح سطحی با پلاسمای اکسیژن قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: پس از جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بند ناف انسانی آنالیز فلوسایتومتری صورت گرفت. زیست سازگاری داربست به‌وسیله سنجش MTT مورد بررسی قرار گرفت. مورفولوژی و نحوهٔ اتصال سلول ها بر سطح داربست به‌وسیلهٔ تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین زیست تخریب پذیری داربست با استفاده از روش کاهش وزن محاسبه شد. در نهایت برای بررسی تمایز سلول‌ها در سطح داربست، از محیط تمایز استئوژنی استفاده شد و تمایز با رنگ آمیزی آلیزارین قرمز و RT-PCR بررسی گردید..

نتایج: نتایج نشان داد که سلول‌ها نه تنها توانایی اتصال و تکثیر مناسب‌تری را روی نانوداربست داشتند، بلکه به لحاظ ریخت‌شناسی نیز از شرایط طبیعی برخوردار بودند. داربست پلی‌کاپرولاکتون از زیست سازگاری بالایی برخوردار است و زیست تخریب پذیری آن تا روز پانزدهم با سرعت بیشتری در مقایسه با ۱۵ روز بعدی انجام گرفت. همچنین نتایج رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز و RT-PCR میزان بالای تمایز سلول بر روی داربست پلی‌کاپرولاکتون را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست آمده از این تحقیق پیشنهاد می‌کند که داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون، پتانسیل استفاده به‌عنوان یک بیومتریال زیست سازگار را در کاربردهای مهندسی بافت و تمایز استخوان دارا می‌باشند.

واژگان کلیدی: تمایز سلولی، پلی‌کاپرولاکتون، سلول‌های بنیادی، مهندسی بافت، بند ناف.

مقدمه

مهندسی بافت یکی از شاخه‌های جدید علم بیومواد است که با ایجاد ارتباط بین علوم مهندسی و بیولوژی، باعث ترمیم یک بافت آسیب دیده و یا باز گرداندن عملکرد یک بافت به آن می‌شود (۱). در این رویکرد، نخست یک داربست متخلخل و زیست تخریب پذیر ساخته می‌شود و سپس سلول‌های بافت مورد نظر روی آن کشت داده می‌شود. با کنترل شرایط فیزیولوژیکی در خارج از بدن، بافت اولیه بر روی داربست تشکیل شده و پس از کاشت در داخل بدن، با تشکیل بافت جدید، داربست تخریب می‌شود (۲و۳). از میان سلول‌های بنیادی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل از بند ناف برای برنامه‌های سلول درمانی در مقایسه با سایر سلول‌ها بیشتر مورد توجه محققین قرار گرفته‌اند. دلیل توجه به این سلول‌ها داشتن فعالیت خود نوزایی و تمایز به انواع سلول‌های عملکردی می‌باشد (۴). از جمله پلیمرهایی که برای ساخت داربست مورد استفاده قرار می‌گیرند می‌توان به پلیمرهای طبیعی (کلاژن، کایتوزان، هیالورونان، نشاسته و غیره) یا مصنوعی Poly (Lactic-co-Glycoltic) Acid (PLGA)، poly capro lacton (PCL)، poly lactic acid (PLA) , پلی‌اوتواسترها، پلی‌کربونات‌ها، هیدروژل‌ها و غیره) اشاره کرد (۵). تکنیک‌های متعددی به‌منظور ساخت داربست‌ها ایجاد شده است. از جمله این تکنیک‌ها می‌توان به قالب‌گیری حلال و فروشویی ذره‌ها، خشک کردن انجمادی، تکنیک جدایی فازی، اتصال رشته‌ای، گاز کف‌زا، قالب‌گیری ذوبی، اکتروریسی و تکنولوژی تولید بدون قالب Solid Freeform Fabrication (SFF) اشاره نمود. با توجه به روش‌های مختلفی که در تهیه داربست‌ها در مطالعات پیشین انجام شده است، می‌توان گفت تکنیک الکتروریسی به‌دلیل فراهم آوری محیط ی سه بعدی و مشابه (ECM Extracellular matrix) در تهیه داربست بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد. پلی‌کاپرولاکتون (PCL) پلیمری زیست سازگار و متعلق به خانواده‌ی پلی‌استرهای آلیفاتیک می‌باشد که تاکنون در آزمایش‌های متعددی به‌عنوان داربست در مهندسی بافت بکار گرفته شده است (۶و۷).

پلی کاپرولاکتون یک پلیمر نیمه بلوری آب‌گریز (هیدروفوب) با فرمول مولکولی $(C_6H_{10}O_2)_n$ می‌باشد. همچنین خصوصیات مکانیکی فوق‌العاده (انعطاف‌پذیری مکانیکی)، زیست‌سازگاری خوب، آنتی ژنیسیته پایین، فرآیندپذیری ساده و آسان، نقطه ذوب پایین (T_m=60 °C) و غیرسمی بودن محصول حاصل از تخریب آن، را داراست. این پلیمر به‌علت داشتن ساختار انعطاف‌پذیر در بهبود الاستیسیته لاستیک‌ها و زیست‌سازگاری و نرخ زیست تخریب‌پذیری پایین در پزشکی، کاربرد دارد. سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) پلی‌کاپرولاکتون (PCL) را به‌عنوان پلی‌استر زیست‌تخریب‌پذیر تایید کرده است (**۸**).

اصلاح سطح با استفاده از پلاسما یکی از روش‌های نوین در جهت بهبود ویژگی‌های سطحی داربست می‌باشد. پلاسمایک گاز بسیار داغ است یونیده است، گازی چنان داغ که برخوردهای شدید گرمایی همه یا بیشتر اتم‌های آن‌را به یون‌های مثبت و الکترون‌ها تفکیک می‌کند. دانشمندان پلاسما را حالت چهارم ماده می‌نامند. در واقع با افزایش انرژی جنبشی در حالت گازی ماده پلاسما شکل می‌گیرد (۹). با وجود این که پیوند استخوان اتوژن هم‌چنان به‌عنوان استاندارد طلایی ترمیم برخی ضایعات استخوانی محسوب می‌شود، معایب آن مانند محدود بودن، دردناک بودن جراحی، ریسک عفونت، خونریزی، آسیب به اعصاب و از دست دادن فانکشن، موجب شده تا محققان به‌دنبال روشی برای جایگزینی آن باشند (۱۰).

باتوجه به بررسی‌های صورت گرفته مشاهده شد که بیشتر تحقیقات، تنها بر روی اثر زیست‌سازگاری و یا روش ساخت داربست انجام گرفته است و تاکنون مطالعات محدودی در رابطه با بررسی توان رشد و تمایز سلول‌های بنیادی مختلف بر روی نانوداربست زیست تخریب‌پذیر پلی کاپرولاکتون انجام گرفته است که نمی‌توان نتایج آن‌ها را به‌طور قطعی به تمایز سلول‌های بنیادی بند ناف انسانی بر روی نانو داربست پلی کاپرو لاکتون نسبت داد و از طرف دیگر تکنیک تهیه داربست در تمام تحقیقات انجام گرفته یکسان نبوده است. لذا این تحقیق با هدف بررسی رشد وتمایز سلول‌های بنیادی ژله وارتون به استئوبلاست و به‌منظور ارتقای هرچند ناچیز در سطح دانش کشور در این زمینه و همچنین کمک به ارائه راه‌کار موثر و کاربردی در این زمینه بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه در این تحقیق، از نوع بنیادی (basic research) می‌باشد و ابزارهایی که جهت گردآوری اطلاعات در این تحقیق استفاده شده است عبارتند از: دستگاه فلوسایتومتری، PCR، الکتروفورز، طیف سنجی مادون قرمز (FTIR)، میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)، دستگاه اسپکتروفوتومتری، میکروسکوپ نوری معکوس می‌باشد. تجزیه و تحلیل آماری توسط نرم افزار EXCELL و ایمیج چی (ImageJ) انجام شده است و تمام آزمایش‌های کشت سلولی به‌صورت حداقل سه تکرار انجام شده است.

کشت و جداسازی اولیه سلول‌های استرومای بند ناف انسان: بدین منظور بند ناف نوزاد سالمی که به‌روش سزارین متولد شده بود، با کسب رضایت از مادر در شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل شد و پس از شستشو با الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه، تا پایان کشت در داخل بافر نرمال سالین نگه‌داری شد. پاساژ دادن کشت اولیه و تولید رده سلولی:پس از رسیدن تراکم سلول به ۸۰ درصد درون فلاسک، جهت جلوگیری از توقف رشد سلول‌ها (به‌دلیل کمبود مواد غذایی، فضا و افزایش متابولیت‌های سمی) سلول‌ها توسط محلول Trypsin- EDTA از کف فلاسک جدا و رده سلولی ایجاد شده به دو یا چند فلاسک، انتقال و مجددا کشت داده شدند.

محاسبه تراکم سلولی با استفاده از رنگ آمیزی تریپان‌بلو: بدین منظور مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با حجم برابری از تریپان‌بلو ترکیب و توسط لام هموسایتومتر مورد بررسی قرار داده شد.

تایید استخراج سلول‌های بنیادی: آنالیز فلوسایتومتری بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف، برای نشان دادن بیان مارکرهای CD 105، CD 90 و CD 45 انجام گرفت.

ساخت داربست: برای تهیه داربست مورد استفاده در این مطالعه PCL در غلظت ۱۳ درصد در حلال حاوی اسید فرمیک و اسید استیک به‌صورت محلول تهیه شد. محلول حاصله به‌وسیله‌ی سرنگ ۵ میلی‌لیتری با سر سرنگی دارای قطر ۰/۴ میلی‌متر با سرعت تزریق ml/h ۰/۱ با فاصله ۱۵۰ میلی‌متر از ورقه‌ی آلومینیوم تزریق شد.

تعیین خصوصیات داربست: به‌منظور بررسی خصوصیات شیمی سطح داربست تهیه شده، از طیف سنجی مادون قرمز (FTIR) استفاده شد نمونه داربست در گستره‌ی عدد موج cm - 1 ۴۰۰۰-۴۰۰ با وضوح 1- 4cm اندازه‌گیری شد. همچنین ویژگی‌های مورفولوژی سطح و تراکم نانوفیبرها توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) مورد بررسی قرار گرفت.

اصلاح سطحی پلاسمایی: برای بهبود ویژگی آبدوستی سطح داربست از اصلاح سطحی داربست با پلاسمای گاز اکسیژن به‌مدت ۵ دقیقه با فشار ۰/۴ میلی‌بار و قدرت ۱۰ درصد، بر روی داربست PCL استفاده گردید.

کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی بندناف بر روی داربست PCL: ابتدا داربست‌ها به ابعاد ۱×۱ سانتی‌متر مربع بریده شده و به‌مدت ۲۴ ساعت در اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور شدند. پس از خشک شدن داربست‌ها در دمای اتاق، دو طرف آن‌ها هر کدام به‌مدت یک ساعت با قرار گرفتن تحت اشعه UV استریل شد. سپس داربست‌ها درون چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه قرار داده و به‌دنبال آن با PBS استریل شستشو داده شدند. سلول‌ها با تراکم $۲×۱۰^{۵}$ در هر میلی‌لیتر با روش چکاندن و به‌مقدار ۲۰ میکرولیتر بر روی هر دو نوع داربست قرار داده شدند.

بررسی زیست سازگاری داربست PCL: در ابتدا باید مشخص شود که داربست تهیه شده دارای مشخصه زیست سازگاری برای استفاده در مهندسی بافت باشد بدین‌منظور داربست PCL توسط UV و الکل ۷۰ درصد استریل شد، پس از خشک کردن داربست در شرایط استریل، مقدار ۲×۱۰۵ از سوسپانسیون سلولی به‌روش چکاندن بر روی سطح داربست قرار گرفت. پس از اطمینان از نفوذ سلول‌ها به درون منافذ داربست، تست MTT در روزهای متفاوت کشت انجام شد.

ارزیابی رفتار زیست تخریب‌پذیری: بدین منظور، داربست‌های پلی کاپرولاکتون در بافر Phosphate buffered saline (PBS) قرار داده شدند. هر نمونه به‌مدت ۳۰ روز در محلول PBS قرار گرفت. هر ۵ روز یک‌بار، نمونه‌ها از محلول خارج شده و پس از این که در خلا، کاملا خشک شدند، کاهش وزن آن‌ها اندازه‌گیری شد.

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف به استئوبلاست بر روی داربست PCL:جهت بررسی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بندناف به استئوبلاست از سلول‌های پاساژ سوم استفاده شد. ابتدا سلول‌ها بر روی داربست‌ها و در پلیت ۲۴

خانه‌ای کشت داده شدند، روز بعد محیط کشت چاهک‌های حاوی داربست خارج شده و پس از شستشوی داربست-سلول با بافر PBS، محیط تمایزی استئوبلاستی اضافه شد. مدت تیمار ۲۱ روز بود و تعویض محیط هر دو روز یک‌بار انجام شد.

بررسی تمایز استئوبلاستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بندناف

۱-رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز

برای این منظور ۲۱ روز پس از کشت سلول‌ها در محیط تمایز، محیط کشت رویی سلول‌ها برداشته شد و سلول‌ها با PBS شستشو داده شدند، سپس سلول‌ها با فرمالدهید ۴ درصد و به‌مدت ۲۰ دقیقه تثبیت و مجددا با PBS شستشو داده شدند. در نهایت رنگ آلیزارین قرمز یک درصد اضافه شده و به‌مدت ۸ دقیقه انکوبه شدند.

۲- RT-PCR

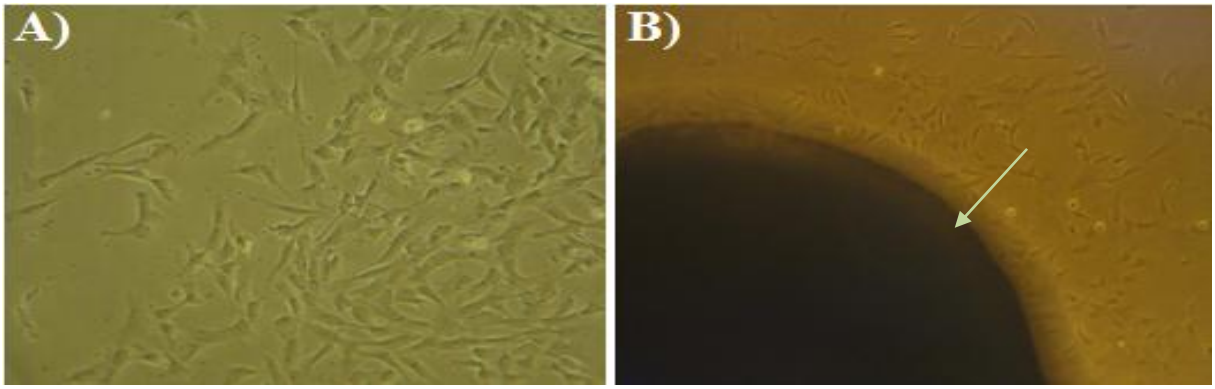
استخراج RNA و سنتز cDNA: برای استخراج RNA از کیت Rima Zol، (طیف آریا فرایند) استفاده شد. با توجه به پروتکل کیت لیز سلول‌ها انجام شد برای تهیه cDNA بر اساس پروتکل شرکت سیناژن۱۰ میکرولیتر از محلول RNA را در ۶۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه انکوبه و سپس مخلوطی شامل ۳ میکرولیتر بافر (3X PCR)، ۰/۲ میکرولیتر پرایمراولیگودی تی، ۲۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۱۰ میلی‌مولار dNTP و ۰/۵ میکرولیتر از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس به آن اضافه شد. محلول حاصله را ۱۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده و سپس به‌مدت یک ساعت در ۴۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و سپس برای توقف واکنش، نمونه را در ۷۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت.

RT-PCR: این تست برای بررسی بیان mRNAی آلکالین فسفاتاز و استئوکلسین در سلول‌های استئوبلاستی تمایز داده شده صورت گرفت. در این آزمایش cDNA تهیه شده از RNA استخراج شده از سلول‌های استئوبلاستی به‌عنوان نمونه تست و cDNA تهیه شده از RNA استخراج شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌عنوان شاهد مورد آزمایش قرار گرفتند.

نتایج

استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی

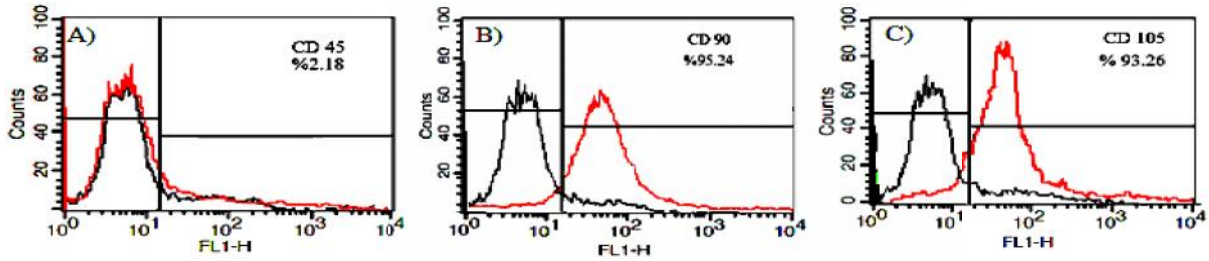
دو هفته پس از قرار دادن قطعات ژله وارتون در محیط کشت، سلول‌ها به‌تدریج از کناره‌های این قطعات شروع به جوانه زنی و رشد نمودند. یک هفته بعد از جوانه زنی و رشد سلول‌ها کف پلیت‌ها پوشیده از سلول شد. (شکل ۱).



شکل۱: سلول‌های بنیادی حاصل از بندناف انسانی A) رده سلولی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بندناف انسانی، B) جوانه زنی سلول‌ها از بافت ژله وارتون سلول‌های بندناف انسانی با بزرگنمایی ۱۰ x

تایید استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی از ماتریکس بند ناف

نتایج حاصل از فلوسایتومتری نشان دهنده بیان نشان‌گرهای مزانشیمی ماتریکس بندناف بود. نتایج نشان داد شاخص‌های بنیادینگی CD 90 و CD 105 به‌ترتیب دارای بیان ۹۵ درصد و ۹۳ درصد بودند درحالی‌که شاخص غیربنیادینگی CD 45 دارای بیان کمتر از ۳ درصد بود (شکل ۲).

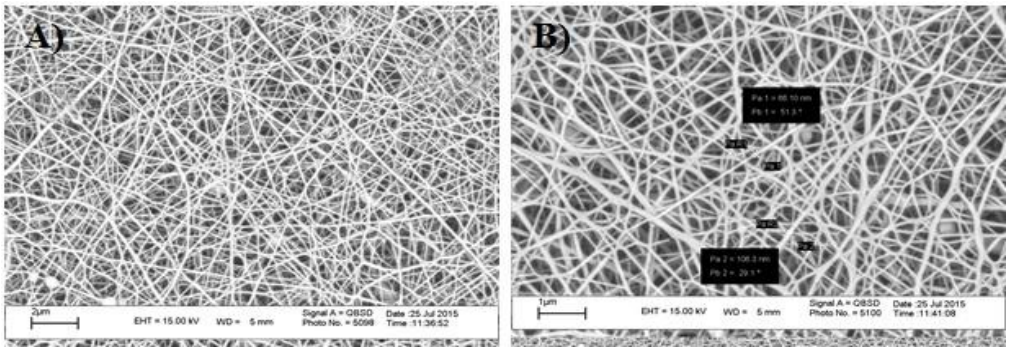


شکل ۲: بیان نشان‌گرهای سلول بنیادی مزانشیمی ماتریکس بندناف A) بیان CD 45، B)بیان CD 90، C)بیان CD 105.

بررسی خصوصیات نانوالیاف الکتروریسی شده پلی-کاپرولاکتون (PCL)

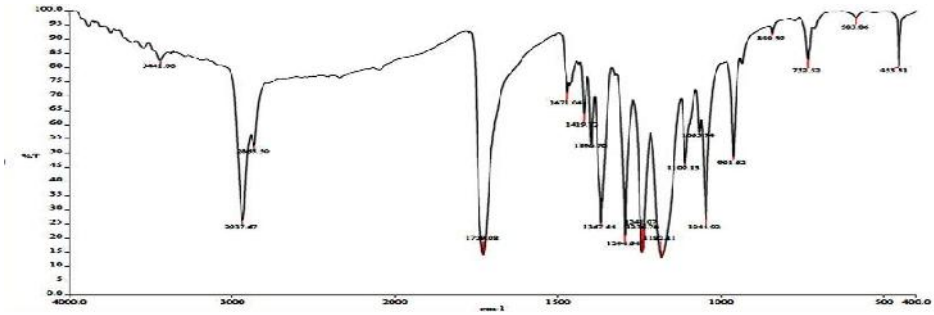
تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) و توزیع قطری نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون در شکل ۳ نشان داده شده است.

همچنین به‌طور واضح ملاحظه می‌شود که نانوالیاف بدون عیوب ساختاری (بید) با قطر متوسط ۹۲، ۹۹ و ۱۰۲ نانومتر تولید شده است.



شکل۳: تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) و توزیع قطری نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون (PCL).

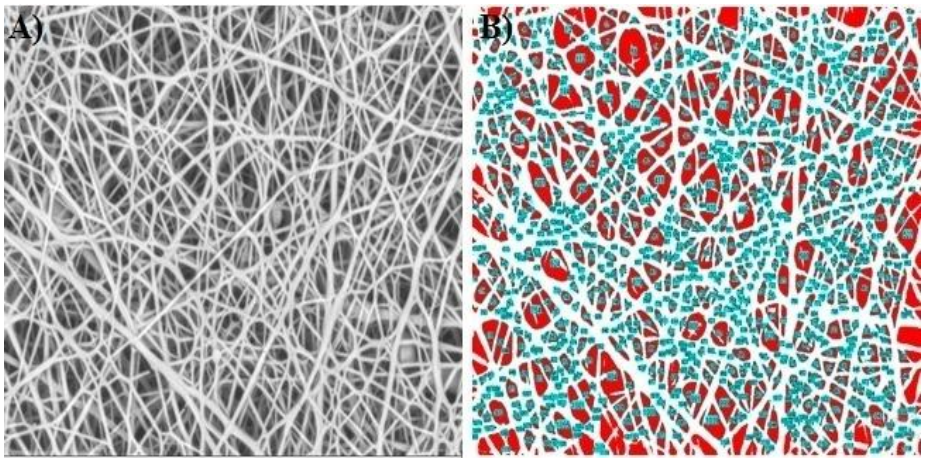
نتایج طیف سنجی مادون قرمز (FTIR) نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون (PCL) در شکل ۴ نشان داده شده است. پیک ظاهر شده شامل cm-1 ۲۹۳۷ (کشش متقارن CH2)، cm-1 ۲۸۶۵(کشش نامتقارن CH2)، cm-1 ۱۷۲۹ (کشش کربونیل)، cm-1 ۱۲۹۴ (کشش باندهای C–O وC–C)، cm-1 ۱۲۴۱ (کشش متقارن C-O-C) است.



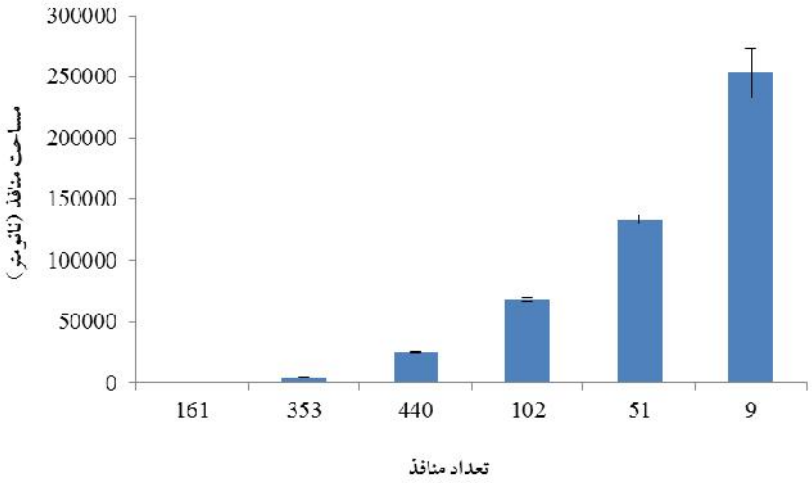
شکل ۴: طیف طیف سنجی مادون قرمز (FTIR) نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون (PCL).

توزیع اندازه منافذ داربست PCL

شکل‌های ۵ و ۶ به‌ترتیب تصاویر SEM، گرافیکی SEM و نمودار ستونی چگونگی توزیع منافذ در سطح داربست PCL را نشان می‌دهد که نتایج خلاصه شده آن در جدول ۱ آورده شده است.



شکل ۵: تصویر گرافیکی چگونگی توزیع منافذ در سطح داربست PCL، A)تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره از داربست PCL، B) تصویر گرافیکی توزیع منافذ پس از تعیین تعداد و مساحت منافذ توسط نرم افزار ImageJ



شکل ۶: نمودار ستونی تعداد و توزیع مساحت منافذ در سطح داربست PCL

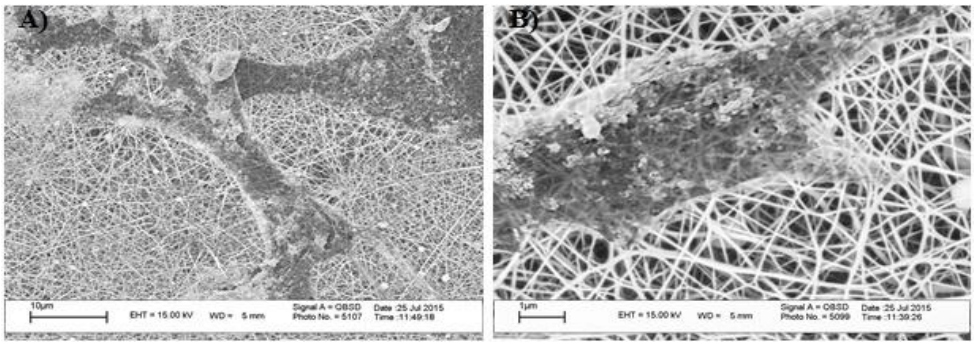
نتایج حاصل از تجریه و تحلیل نرم افزار ایمیج چی نشان داد به‌طور متوسط ۳۹ درصد سطح داربست PCL حاصل از الکتروریسی را منافذ تشکیل می‌دهد. همچنین این نتایج نشان داد که میانگین مساحت این منافذ ۲۵۵۵۹ نانومتر مربع می‌باشد (جدول ۱).

جدول ۱ : تعداد، مساحت و درصد منافذ موجود در سطح داربست

تعداد منافذ	مساحت اندازه‌گیری شده	مجموع مساحت کل منافذ	میانگین مساحت منافذ	درصد منافذ
۱۱۱۶	۷۲۴۳۱۰۶۴ nm^2	۲۸۵۲۴۵۲۳ nm^2	۲۵۵۵۹ nm^2	٪۳۹

کشت سلول بر روی داربست

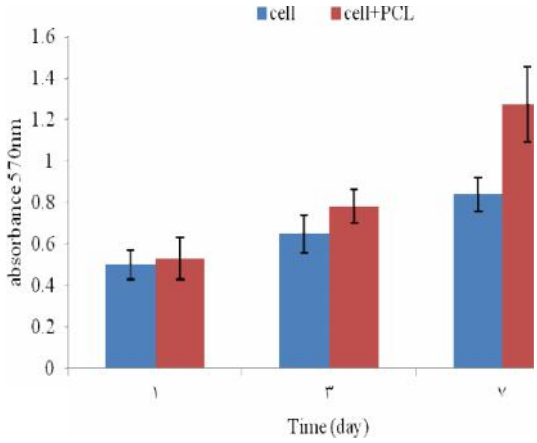
مورفولوژی و نحوه‌ی اتصال سلول‌ها بر روی سطح داربست‌ها به‌وسیله‌ی تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی مورد مطالعه قرار گرفت. تصاویر نشان دهنده‌ی اتصال موفق سلول‌ها بر روی داربست است (شکل ۷).



شکل ۷: تصویر SEM اتصال سلول‌های بنیادی بر روی داربست PCL

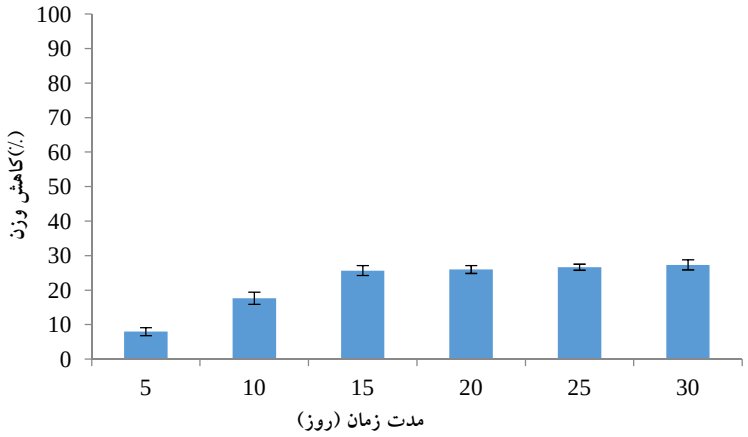
زیست سازگاری داربست PCL

نتایج مقایسه میانگین حاصل از بررسی زیست سازگاری داربست PCL نشان داد در تمامی تیمارها سلول‌های کشت شده بر روی داربست PCL در مقایسه با گروه کنترل رشد بیشتری داشته‌اند. که با توجه به این نتایج می‌توان چنین بیان داشت سلول‌ها رشد یافته بر روی داربست PCL در مقایسه با گروه کنترل از شرایط رشدی بهتری برخوردار بوده‌اند (شکل۸)



شکل ۸: نمودار زیست سازگاری داربست PCL در تیمار ۱، ۳ و ۷ روزه

ارزیابی رفتار زیست تخریب‌پذیری: نتایج حاصل از تست کاهش وزن نشان داد روند کاهش وزن داربست تا روز ۱۵ با شدت زیادی صورت گرفت اما پس از روز ۱۵ این روند با سرعت بسیار پایینی صورت گرفت (شکل ۹).

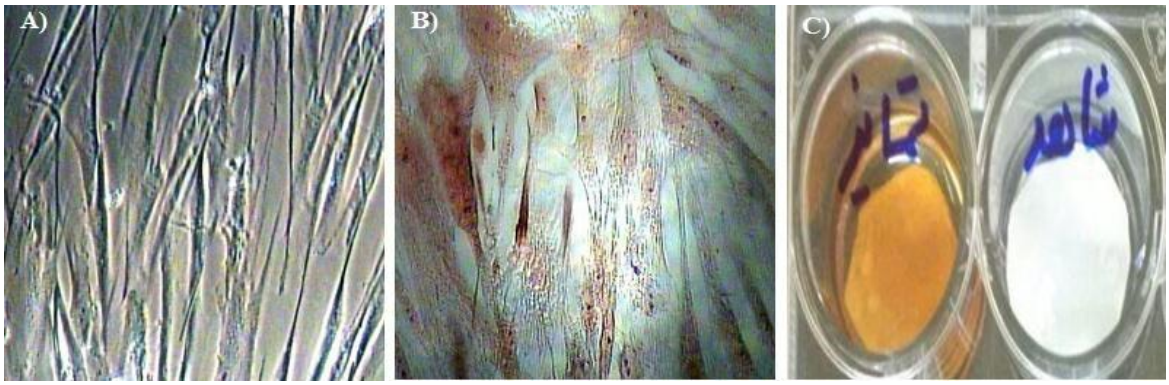


شکل ۹: نمودار ستونی کاهش وزن داربست

بررسی تمایز استئوبلاستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بندناف

رنگ آمیزی آلیزارین قرمز

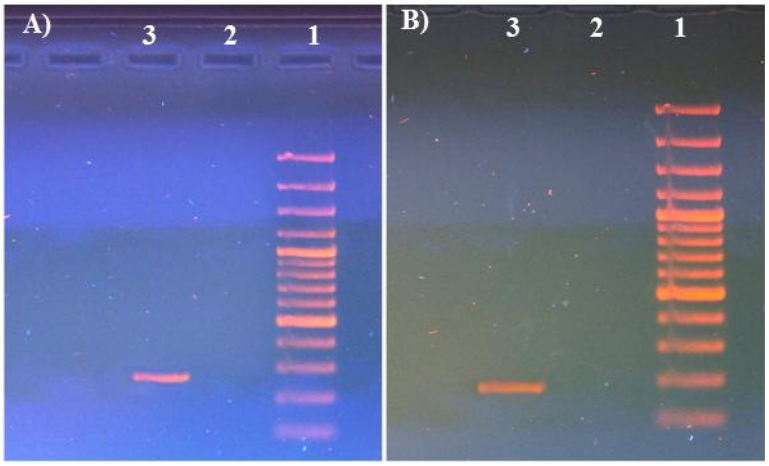
مشاهده رسوب توده‌های کلسیمی، تاییدی بر تمایز استئوبلاستی سلول‌های بنیادی حاصل از بندناف بود. در رنگ‌آمیزی سلول‌های بنیاد شاهد که فاقد محیط تمایزی بودند، سلول‌ها هیچ رنگی به‌خود نگرفتند (شکل ۱۰).



شکل ۱۰: تمایز سلول‌های بنیادی حاصل از بندناف به سلول‌های استئوبلاستی A)سلول‌های بنیادی شاهد (بدون محیط تمایز) پس از رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز B) سلول‌های بنیادی حاصل از بندناف رنگ آمیزی شده با آلیزارین قرمز، ۲۰ روز پس از قرار گرفتن در معرض محیط تمایز C) رنگ‌آمیزی سلول‌های شاهد و تمایز یافته کشت شده بر روی داربست PCL

نتایج RT-PCR

برای تایید تمایز سلول‌های استئوبلاستی علاوه بر رنگ آمیزی آلیزارین رد، از مارکرهای ترانس کریپتوم نیز استفاده شد. نتایج حاصل از RT-PCR هر دو مارکر در زیر آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد این شاخص‌ها در سلول‌های استوبلاستی بیان شده اما در سلول‌های بنیادی حاصل از بندناف بیان نگردید که تاییدکننده تمایز سلول‌های استئوبلاستی می‌باشد (شکل ۱۱).



شکل۱۱: A) نتیجه RT-PCR مارکر آلکالین فسفاتاز، چاهک اول لدر bp ۱۰۰، چاهک دوم RT-PCR از RNA به‌دست آمده از سلول‌های بندناف انسانی بدون اعمال تیمار تمایز، چاهک سوم RT-PCR از RNA به‌دست آمده از سلول‌های تمایز یافته به سلول‌های استخوان؛ B) نتیجه RT-PCR مارکر استئوکلسین، چاهک اول لدر bp ۱۰۰، چاهک دوم RT-PCR از RNA به‌دست آمده از سلول‌های بندناف انسانی بدون اعمال تیمار تمایز، چاهک سوم RT-PCR از RNA به‌دست آمده از سلول‌های تمایز یافته به سلول‌های استخوان

بحث

مهم‌ترین گام در مهندسی بافت، انتخاب بیومواد مناسب برای ساخت داربست است. داربست مطلوب الگویی برای بازسازی بافت است و نقش کلیدی در شکل‌گیری ساختار نهایی بافت مهندسی شده و عملکرد نهایی آن بر عهده دارد. بیومواد مورد استفاده در داربست باید از چسبندگی، رشد و تکثیر سلولی هم در شرایط in vivo و هم در in vitro حمایت به‌عمل آورند. آن‌ها باید چندین ویژگی ضروری نظیر زیست سازگاری، زیست تخریب‌پذیری و فعالیت زیستی را داشته باشند (۱۰).

استخوان یک بافت پیوندی می‌باشد که به‌همراه غضروف اسکلت بدن را تشکیل می‌دهد. این بافت از سلول‌های استئوبلاستی و ماتریکس استخوانی تشکیل شده است. بر خلاف سایر بافت‌های پیوندی ماتریکس استخوانی دارای این توانایی منحصر به‌فرد است که می‌تواند کلسیفیه شود. برای ترمیم ضایعات و نقایص استخوانی می‌توان از امکانات مهندسی بافت بهره برد. در این ارتباط، می‌توان از پیوند بافت استخوان اتولوگ استفاده کرد یا با طراحی داربست مناسب و گذاشتن سلول‌های دارای پتانسیل تولید استخوان بر روی آن‌ها و پیوند در محل ضایعه، آن را ترمیم نمود. با توجه به محدودیت بافت استخوانی اتولوگ و لزوم عمل جراحی و ایجاد ضایعه در ناحیه دیگری برای تهیه این بافت، استفاده از داربست‌های سلولی برای ترمیم ضایعات استخوانی مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته است (۱۱). مهندسی بافت بر توسعه جانشین‌های زیستی برای ترمیم، نگه‌داری و بهبود بافت و عملکرد عضو تمرکز یافته است. رفتار سلولی در نتیجه‌ی پاسخ ترکیبی از پیام رسانی متعددی بوده که در اثر برهم‌کنش سلول‌های مجاور با یکدیگر، با مولکول‌های محلول و با ماتریکس خارج سلولی اتفاق می‌افتد. داربست در مهندسی بافت در واقع باید تقلیدی از ماتریکس خارج سلولی طبیعی موجود در بدن باشد. یکی از ویژگی‌های شاخص و مهم در ماتریکس خارج سلولی فراهم آوری شرایطی مناسب جهت تبادل و تعامل سلول‌ها با یکدیگر و با محیط اطرافشان می‌باشد که ویژگی‌های آبدوستی نانوتوپوگرافی مناسب می‌تواند در تحقیق این راستا مفید واقع شود. وجود ویژگی نانوتوپوگرافی تاثیر به‌سزایی در القای مسیرهای دخیل در پیام رسانی در شکل‌گیری فنوتیپ و سرنوشت سلول دارد (۱۲).

جهت تامین نانوتوپوگرافی برای تسهیل و تعدیل تبادلات سلول با محیط اطراف مناسب است که داربست‌ها در مقیاس نانو تهیه شوند که تولید این داربست‌ها در سال‌های اخیر مورد توجه محققین قرار گرفته است. از روش‌های متفاوتی جهت تهیه نانوالیاف استفاده می‌شود که پرکاربردترین این روش‌ها شامل روش الکتروریسندگی، خود سامانی و جدایی فازی است (۱۳). در مهندسی بافت از مواد طبیعی و مصنوعی متفاوتی برای تولید داربست استفاده می‌شود. پلیمرهای مصنوعی ویژگی‌های برتری از لحاظ مکانیکی نسبت به پلیمرهای طبیعی دارند و به آسانی دارای قابلیت پردازش می‌باشند (۱۴). در این مطالعه پلیمر

پلی‌کاپرولاکتون به عنوان ماده سازنده داربست برای تولید نانوالیاف به‌روش الکتروریسندگی انتخاب شد.

پلی کاپرولاکتون یک پلیمر نیمه بلوری آب‌گریز (هیدروفوب) با فرمول مولکولی $(C_6H_{10}O_2)_n$ می‌باشد. همچنین خصوصیات مکانیکی فوق‌العاده (انعطاف‌پذیری مکانیکی)، زیست‌سازگاری خوب، آنتی ژنیسیته پایین، فرآیندپذیری ساده و آسان، نقطه ذوب پایین (T_m=60 °C) و غیرسمی بودن محصول حاصل از تخریب آن، را داراست. این پلیمر به‌علت داشتن ساختار انعطاف‌پذیر در بهبود الاستیسیته لاستیک‌ها و زیست‌سازگاری و نرخ زیست تخریب‌پذیری پایین در پزشکی، کاربرد دارد. سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) پلی‌کاپرولاکتون (PCL) را به‌عنوان پلی‌استر زیست‌تخریب‌پذیر تایید کرده است (۸).

از میان نانوالیاف الکتروریسی شده زیست‌سازگار، نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون می‌تواند خصوصیاتی را که مورد علاقه برای کاربردهای پزشکی است، فراهم کند. همچنین در تحقیقات گذشته نشان داده شده است که نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون قادر است گستره وسیعی از انواع سلول‌ها را حمایت کند که از این جمله می‌توان به نتایج پارک و همکاران (۱۵) اشاره کرد. آن‌ها از داربست‌های PEG/PCL با درصد متفاوت PEG (پلی اتیلن گلیکون) به PCL جهت تمایز سلول‌های غضروفی استفاده کردند. نتایج حاصل از تحقیق آن‌ها نشان داد داربست‌های دارای نسبت بالای PEG دارای تعاملات مناسب‌تری با سلول‌های غضروف می‌باشند. در حالی‌که داربست‌های با نسبت کم PEG تمایز غضروفی پایین‌تری را نشان دادند. همچنین نتایج RT-PCR برای سلول‌های غضروفی حاصل نشان داد که نسبت ۱۴ PEG به ۶ PCL دارای بیان ژن بالایی در ژن COMP (cartilage oligomeric matrix protein) می‌باشد.

یکی از معایب استفاده از پلیمر PCL در مهندسی بافت آبگریز بودن و در نتیجه اتصال نامناسب سلول به سطح داربست‌های حاصل از این پلیمر می‌باشد. به‌منظور تعدیل ویژگی نامطلوب آبگریزی این پلیمر گروه های اکسیژنی بر روی سطح داربست اصلاح شده با پلاسما اضافه گردید. اصلاح داربست توسط پلاسما سبب بهبود ویژگی آبدوستی، اتصال سلولی و درنتیجه رشد و تکثیر سلول‌ها بر روی داربست پلی‌کاپرولاکتون می‌شود که در مطالعات متعددی نیز این مورد به اثبات رسیده است (۱۶). به‌عنوان مثال یلدیریم و همکاران (۱۶)، به منظور بررسی و مقایسه رفتار سلولی و تعیین بهترین مورد برای اصلاح سطحی داربست پلی‌کاپرولاکتون از پلاسمای اکسیژن و پروتئین فیبرونکتین به‌طور جداگانه بر روی داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون و داربستی که تلفیقی از پلاسما-پروتیئن بود استفاده نمودند. نتایج به‌دست آمده نشان داد که با اعمال پلاسما ویژگی آبدوستی به‌طور معنی‌داری بهبود یافته است. اتصال سلولی بر روی داربست اصلاح شده با پلاسما تقریبا دو برابر داربست اصلاح نشده بود. اما نکته قابل ذکر این است که داربست اصلاح شده با پلاسما بعد از داربست تلفیقی پلاسما-پروتئین دارای بیشترین نرخ رشد و تکثیر سلولی بودند.

بسترهایی که تحت عنوان داربست در مهندسی بافت استفاده می‌شوند باید توانایی واکنش با سلول‌ها در ابعاد سه بعدی و یا تسهیل‌گر ارتباط سه بعدی سلول‌ها با یکدیگر و محیط اطراف‌شان را داشته باشند. پس می‌توان گفت که فراهم آوری این مشخصه توسط نانوالیاف برای سلول‌ها فاکتور تعیین‌کننده برای موفقیت یا شکست داربست می‌باشد. نتایج به‌دست آمده از تست MTT و زیست سازگاری در این مطالعه به خوبی تاییدکننده‌ی این مهم می‌باشد. بعد از انتقال سلول‌ها برروی داربست چسبندگی اولین واقعه‌ای است که رخ می‌دهد البته در کنار آن تعیین زیست سازگاری داربست تهیه شده نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۱۷). بدین منظور پس از گذشت ۲۴ ساعت از انتقال سلول‌های بنیادی حاصل از بندناف انسانی بر روی داربست استریل شده با استفاده از اشعه‌ی UV زیست سازگاری و عدم سمیت داربست برای سلول‌های مورد بررسی قرار گرفت.

کاکریرمن و همکارن (۱۸) نشان داده اند که فیبروبلاست‌های کشت داده شده به‌صورت سه بعدی در مقایسه با کشت‌های دوبعدی سریع تر تکثیر می‌شوند. به‌نظر می‌رسد این تفاوت‌ها به‌علت نزدیکی فضای سلول در کشت سه بعدی (کشت بر روی داربست) نسبت به محیط موجود زنده باشد. نتایج تست زنده‌مانی در این تحقیق نشان داد سلول‌هایی که بر روی داربست رشد کرده‌اند در مقایسه با سلول‌های شاهد جذب بیشتری را نشان داده‌اند شاید دلیل این امر را بتوان به این نسبت داد که رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی بر روی داربست از سرعت بیشتری برخوردار بوده است که در این صورت با نتایج کاکریرمن مطابقت دارد (شکل ۸). همچنین در مطالعه انجام شده توسط

لی و همکاران (۱۹) فیلم PCL با استفاده از پلاسمای اتمسفری به چهار صورت Ar+O2، Ar+N2، Ar+H2 و Ar مورد اصلاح سطحی قرار گرفت. نتایج تست‌های انجام شده بیانگر کاهش زاویه تماسی در سه مورد Ar+O2، Ar+N2 و Ar البته بیشترین کاهش در پلاسمای Ar+O2 مشاهده شد. از سوی دیگر بیشترین زبری سطحی و به‌دنبال آن بالاترین نرخ اتصال سلولی و در نهایت رشد و تکثیر سلولی بر روی فیلم PCL اصلاح شده با پلاسما Ar+O2 دیده شد. که با توجه به نتایج به‌دست آمده در پروژه‌های تحقیقی انجام شده، از اصلاح پلاسما با اکسیژن برای انجام این تحقیق استفاده گردید.

در این مطالعه روند تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بندناف به سلول‌های استخوان‌ساز روی داربست مورد مطالعه قرار گرفت. یکی از تغییرات قابل بررسی در سلول‌های تمایز یافته به استئوبلاست، بررسی میزان رسوب کلسیم در سلول‌هاست. در این بررسی رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز که رسوبات کلسیمی را به رنگ قرمز در می‌آورد، تمایز استئوبلاستی سلول‌ها را در روز ۲۱ تمایز تحت محیط تمایز استئوبلاستی تایید کرد. همچنین نتایج حاصل از RT-PCR برای دو مارکر آلکالین فسفاتاز و استئوکلسین نشان دهنده بیان این ژن‌های استئوبلاستی پس از تمایز سلول‌های بنیادی بندناف انسانی به سلول‌های استئوبلاست بودند.

همان‌طور که در این تحقیق مشخص شد با استفاده از فاکتورهای تمایز می‌توان با کارایی بالا سلول‌های بنیادی مزانشیمی را به سلول‌های استئوبلاست تمایز داد. در تحقیقات گذشته مشخص شده است که پروسه تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های تمایز یافته از تقسیم سلولی خاصی پیروی می‌کند.

یکی از راه‌کارهای تشخیص تخریب داربست‌ها کاهش وزن آن‌ها می‌باشد بدین‌صورت که پلیمر پس از تجزیه به واحدهای سازنده خود از سطح داربست جدا شده و با توجه به مشخصات هیدروفوبیک خود یا درون PBS حل شده و یا در سطح آن قرار می‌گیرد از جمله فاکتورهای موثر در زیست تخریب پذیری می‌توان به نوع ماده تشکیل دهنده داربست، وزن ملکولی، روش ساخت داربست و غیره اشاره نمود. نتایج حاصل از درصد کاهش وزن در این تحقیق نشان داد (شکل ۹) کاهش وزن داربست تا روز ۱۵ با سرعت زیادی صورت گرفت اما پس از روز ۱۵ تا روز ۳۰ سرعت تخریب به‌شدت کاهش یافت. شاید دلیل این نوع تخریب پذیری را بتوان به اصلاح سطح داربست با پلاسمای اکسیژن نسبت داد به این‌صورت که احتمالا پلاسمایی اکسیژن با افزایش گروه‌های قطبی در سطح داربست سبب افزایش سطح تماس بافر PBS با داربست شده که این امر سبب افزایش سرعت زیست تخریب پذیری داربست شده باشد و پس از حذف بخش‌های قطبی داربست، سرعت تخریب داربست کاهش یافته باشد.

نتیجه‌گیری

به‌دلیل اصلاح سطحی داربست با پلاسمای اکسیژن، افزایش گروه‌های اکسیژنی ناشی از اصلاح بر روی سطح داربست الکتروریسی شده که دارای نانوتوپوگرافی، با بهبود ویژگی آبدوستی سطحی داربست این مشخصه ذاتی تعدیل و شرایط برای اتصال اولیه سلول بر سطح داربست بهبود یافته که در پی آن مهاجرت، رشد و تکثیر مناسب و بهتر سلولی بر روی داربست فراهم گردید.

تصاویر حاصل از سلول‌های کشت شده بر روی داربست‌ها نشان دهنده این است که داربست PCL تیمار شده با پلاسمای اکسیژن محیطی مناسب برای رشد درونی سلول‌ها فراهم کرده است. در واقع خواص مواد به وسیله ساختار آن‌ها تعیین می‌شود، بنابر این دلیل اینکه داربست‌ها ویژگی‌های بهتری را نشان می‌دهد، به ایجاد تغییر در ساختار آن بر می‌گردد. با توجه به تصاویر میکروسکوپ الکترونی می‌توان به این نکته پی برد، سلول‌ها دارای زوائد سیتوپلاسمی و ریخت‌شناسی طبیعی بوده که به شکل کلنی‌های سلولی درآمده‌اند. همچنین نتایج حاصل از رنگ آمیزی آلیزارین قرمز و RT-PCR نشان داد این نوع داربست از توانایی بالایی در تمایز سلول‌های بنیادی حاصل از بندناف انسانی به سلول‌های استئوبلاستی برخوردار هستند.

تشکر و قدردانی

از مسئولین محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل به‌خاطر فراهم کردن امکانات انجام این تحقیق و نیز از کلیه افرادی که در این تحقیق کمک شایانی کردند از کارشناسان آزمایشگاه سلول‌های بنیادی و دکتر حسین اکبری کمال تشکر و قدردادنی را داریم.

منابع

1. Barre‘re F, Mahmood TA, de Groot K. Blitterswijk, CA. Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions.Materials Science and Engineering. 2008; 59(5): 38–71

2. Hench JW. Biomaterials. Artificial organs and tissue engineering.Wodhed pub. 2005; 18(1): 193-200.

3. Liu C, Xia Z, Czernuszka JT. Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering.Chemical Engineering Research and Design. 2007; 85(8): 1051–1064.

4. Grompe M. Embryonic stems cells without embryos? Nature Biotechnology. 2005; 23(19):1496 1497.

5. Manuela M, Gomes E. A bone tissue engineering strategy based on starch scaffolds and bone marrow cells cultured in a flow perfusion bioreactor. University of Minho. 2004; 69(4): 25-34.

6. Hayman MW, Smith KH, Cameron NR, Przyborski SA. Growth of human stem cell-derived neurons on solid three-dimensional polymers. Biochemical Biophysic Methods. 2005; 62(24): 231-240

7. Hashemi S, Soleimani M, Zargarian S, Haddadi-Asl V, et al. In vitro differentiation of human cord blood-derived unrestricted somatic stem cells into hepatocyte-like cells on poly(epsilon-caprolactone) nanofiber scaffolds.. Cells Tissues Organs. 2009; 190(2): 135- 49.

8. Jiang CP, Huang JR, Hsieh MF. Fabrication of synthesized PCL-PEG-PCL tissue engineering scaffolds using an air pressure-aided deposition system.Rapid Prototyping Journal. 2011; 17(1): 288-297.

9. Sharifi Ferdoey F, Irani S, Zandi M, Soleimani M. Synthesis and Surface Modification of PolycaprolactoneNanofibers for Tissue Engineering. J Ardabil Univ Med Sci. 2014; 14(3):217-228.

10. Marolt D, Campos IM, Bhumiratana S, Koren A, et al. Engineering bone tissue from human embryonic stem cells.Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012; 109(2):8705-8709.

11. Cunha C, Panseri S, Antonini S. Emerging nanotechonolgy approaches in tissue engineering for peripheral nerve regeneration. Nanomedicine. 2011; 7(3): 50-9.

12. Barnes CP, Sell SA, Boland ED, Simpson DG. Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. Advanced Drug Delivery. 2007; 59(4):1413-1433.

13. Pramanik S, Pingguan-Murphy B, Azuan A. Progress of key strategies in development of electrospun scaffolds: bone tissue. Science and Technology of Advanced Materials. 2012; 110(3): 1045-1055.

14. Vance RJ, Miller DC, Thapa A, Haberstroh KM. Decreased fibroblast cell density on chemically degraded poly-lactic-co-glicolic acid, polyurethane, and poly caprolactone.Biomaterials. 2004; 78(5): 2095-2103.

15. Park JS, Woo DG, Sun BK, Chung HM, et al. In vitro and in vivo test of PEG/PCL-based hydrogel scaffold for cell delivery application. Journal of Controlled Release. 2007; 124(7): 51–59.

16. Yildirim ED, Besunder R, Papas D, Allen F, et al. Accelerated differentiation of osteoblast cells on polycaprolactone scaffolds driven by a combined effect of protein coating and plasma modification. Biofabrication.Oct. 2010; 88(2):12-24.

17. Caetano GF, Bártolo PJ, Domingosb M, Caliari C. Osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into Polycaprolactone (PCL) scaffold.ProcediaEngineering. 2015; 110(14):59 – 66.

18. Cukierman E, Pankov R, Stevens, DR, Yamada KM. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension.Science Signalling. 2010; 294(11): 1708.

19. Lee Hyun UK, Sul Jeong Y, Young jong S, Young Park S, et al. Role of reactive gas in atmospheric plasma for cell attachment and proliferation on biocompatible poly caprolactone film. Applied Surface Science. 2008; 254: 5700-05.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Summer 2016; 7(2): 179-190

Original Article

Evaluation of growth and differentiation of Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells to osteoblast on polycaprolactone composite scaffolds (PCL)

Gazijahani Sh, M.Sc.[1], Yaghoubi H, Ph.D.[1*], Asadi A, Ph.D.[2]

1-Department of Biology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran
2-Department of Biology, Faculty of Science, University of MohagheghArdabili, Ardabil, Iran
* Email corresponding author: yaghoubi_h@iauardabil.ac.ir

Received: 17 Jan. 2015 Accepted: 12 Jun. 2016

Abstract

Aim: The aim of this study was to evaluate the biocompatibility and differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells to osteoblast on prepared polycaprolactone scaffolds by electrospinning method, which is located under the surface modification by oxygen plasma.

Material and methods: After isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord, flow cytometry analysis was performed. Biocompatibility of scaffold was examined using MTT assay. Cells morphology and their adhesion characteristics on the scaffold surface were studied using Scanning Electron Microscopic (SEM) images. Also biodegradability of scaffold calculated using weight loss method. Finally, for study the differentiation of cells on the scaffold surface, osteogenic differentiation medium was used and differentiation was performed by red alizarin staining and RT-PCR.

Results: Results showed that the cells not only had more suitable connection and reproduction abilities on the scaffold, but also were morphologically in a natural condition. Polycaprolacton scaffold is enjoyment of high biocompatibility and its biodegradability up to 15th day done with more rates in comparison with 15 next days. Also red alizarin staining and RT-PCR results showed high rate cell differentiation on polycaprolactone scaffold.

Conclusion: The obtained results of this research suggested that polycaprolactone scaffolds have potential usage as biocompatible biomaterials in tissue engineering and osteogenic differentiation applications.

Keywords: Cell differentiation, polycaprolactone, stems cell, tissue engineering, umbilical cord.