ORIGINAL ARTICLE

Chondrogenic Differentiation of Human Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells Using Fibrin Hydrogel Scaffold

Reza Tabatabaei Qomi[1],
Mohsen Sheykhhasan[2],
Naser Kalhor[3],
Mahdieh Ghiasi[4]

[1] MSc in Biology, Laboratory of Stem Cell, The Academic Center for Education, Culture and Research, Qom, Iran
[2] MSc in Biotechnology, Laboratory of Stem Cell, The Academic Center for Education, Culture and Research, Qom, Iran
[3] MSc in Genetics, Laboratory of Stem Cell, The Academic Center for Education, Culture and Research, Qom, Iran
[4] MSc in Cellular and Molecular Biology, Laboratory of Stem Cell, The Academic Center for Education, Culture and Research, Qom, Iran

(Received September 20, 2014 ; Accepted may 5, 2015)

Abstract

Background and purpose: Mesenchymal stem cells (MSCs) are the most widely used cell sources for cartilage tissue engineering. In the present study, human stem cells were used as a cell source. Scaffolds play an important role in tissue engineering, therefore, this study aimed at evaluating the ability of fibrin scaffolds in chondrogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSCs).

Materials and methods: In this study, after preparing fibrin scaffold, isolating mesenchymal stem cells from adipose tissue, and confirming their isolation the cells were cultured into fibrin scaffolds. Seven days after cell culture, their potential of survival and growth were evaluated using MTT assay. Finally, 14 days after the end of the chondrogenic differentiation, gene expression analysis and chondrocyte morphology formation was performed by Real time PCR and histology analysis, respectively.

Results: The mesenchymal stem cell viability, proliferation and expression of 4 specific chondrogenic genes significantly increased in a fibrin scaffold compared with those of the control group. Moreover, the formation of chondrocyte cells on fibrin scaffold was confirmed.

Conclusion: Fibrin scaffold was found suitable for condrogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells.

Keywords: Tissue engineering, mesenchymal stem cells, fibrin

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(123): 21-31 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۲۳ فروردین سال ۱۳۹۴ (۳۱-۲۱)

تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسانی به سلول های غضروفی با استفاده از داربست هیدروژل فیبرینی

رضا طباطبایی قمی[۱]
محسن شیخ حسن[۲]
ناصر کلهر[۳]
مهدیه قیاثی[۴]

چکیده

سابقه و هدف: یکی از پرکاربردترین منابع سلولی در مهندسی بافت غضروف، سلول‌های بنیادی مزانشیمی(MSCs) می‌باشند. در مطالعه حاضر، سلول‌های بنیادی انسان به عنوان منبع سلولی مورد استفاده قرار گرفت. از آن‌جایی که داربست نقش مهمی در مهندسی بافت ایفا می‌کند، هدف از این مطالعه ارزیابی توانایی داربست فیبرینی در تمایز غضروف از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی (ADMSCs) است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، پس از آماده سازی داربست فیبرینی و جداسازی سلول های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی، و تایید جداسازی این سلول‌ها، این سلول‌ها بر روی داربست فیبرینی کشت شدند. هفت روز پس از کشت سلولی، ارزیابی توانایی زنده‌ماندن و رشد سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT بررسی شد. در نهایت، ۱۴ روز پس از پایان تمایز غضروف، تجزیه و تحلیل بیان ژن‌ها و تشکیل مرفولوژی غضروفی به ترتیب توسط Real-time PCR و آنالیز هیستولوژی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: توانایی بقا و تکثیر سلول‌ها و هم‌چنین بیان تمامی ژن های کندروژنیک در داربست فیبرینی در مقایسه با گروه شاهد به طور قابل توجهی افزایش یافته است. علاوه بر این، تشکیل سلول های غضروفی بر روی داربست فیبرینی نیز تایید شد.

استنتاج: فیبرین داربست مناسبی برای تمایز غضروف از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی است.

واژه های کلیدی: مهندسی بافت، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، فیبرین

مقدمه

بدن انسان علی‌رغم استحکام و توانایی بسیار بالا در ترمیم نواحی آسیب دیده خود، بسیار آسیب پذیر است. با این که معمولاً بیش‌تر آسیب‌ها در سنین جوانی توسط خود بدن قابل ترمیم می‌باشند، اما برخی اندام‌های بدن ظرفیت خود ترمیمی محدودی دارند. بافت غضروفی فاقد عروق خونی و اعصاب است. بنابراین، غضروف توانایی محدودی در ترمیم آسیب‌ها دارد. بازسازی آسیب‌ها و نقایص غضروفی به علت ظرفیت ترمیمی کم

مولف مسئول: مهدیه قیاثی– قم: خیابان بنیاد، میدان ایثار، خیابان شبنم، مرکز فوق تخصصی درمان ناباروری جهاد دانشگاهی قم، آزمایشگاه سلول های بنیادی
E-mail: M.ghiasi@acecr.ac.ir

۱. کارشناس ارشد زیست شناسی، آزمایشگاه سلول های بنیادی، جهاد دانشگاهی استان قم، قم، ایران
۲. کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، آزمایشگاه سلول های بنیادی، جهاد دانشگاهی استان قم، قم، ایران
۳. کارشناس ارشد ژنتیک، آزمایشگاه سلول های بنیادی، جهاد دانشگاهی استان قم، قم، ایران
۴. کارشناس ارشد سلولی مولکولی، آزمایشگاه سلول های بنیادی، جهاد دانشگاهی استان قم، قم، ایران

تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۶/۲۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۷/۵ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۲/۱۵

غضروف‌های مفصلی، به‌شدت دشوار و سخت مطرح شده است(۲،۱). این ظرفیت خود تعمیری محدود غضروف، محققان را به توسعه فن‌آوری‌های جدید و بیومتریال مناسب برای بهبود یکپارچگی بافت مجبور کرده است. در سال های اخیر، موفقیت های خوبی با استفاده از روش مهندسی بافت و طب احیاء در بازسازی غضروف به دست آمده است. امروزه مهندسی بافت به عنوان یک روش جدید در درمان بافت آسیب دیده یا از کار افتاده از قبیل غضروف، استخوان و پوست ظهور پیدا کرده است(۴،۳). در طول مهندسی بافت، ظرفیت بهبود بیمار افزایش یافته و در نتیجه آن بافت آسیب دیده تعمیر و عملکردهای طبیعی آن بازگردانده می‌شود(۵). یک منبع سلولی مناسب، یک نیاز مطلق برای یک برنامه موفق مهندسی بافت است. به عبارتی، انتخاب نوع سلول تعیین‌کننده استراتژی‌های مهندسی بافت غضروف است. منابع سلولی که به‌طور گسترده برای مهندسی بافت غضروف مورد استفاده قرار گرفته‌اند، کندروسیت‌ها و سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) می‌باشند(۶). موانعی برای درمان با سلول‌های بر پایه سلول‌های غضروفی وجود دارد. از آنجایی‌که دسترسی به سلول‌های تمایز یافته اتولوگوس مانند کندروسیت‌ها محدود است و وضعیت عملکردی آن‌ها برای بازسازی مناسب نیست، استفاده از سلول‌های بنیادی مناسب‌تر به نظر می‌رسد(۲). به علاوه، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مزیت‌هایی بیش از کندروسیت‌ها دارند. به عبارتی، آن‌ها می‌توانند به صورت اتولوگ از یک پروسه حداقل تهاجمی به دست آیند و برای ایجاد ساختارهای پیچیده مانند رابط غضروف- استخوان مورد استفاده قرار گیرند. با این وجود، این فرایند نیازمند به محصول سلول‌های مشتق از خود، ممکن است آغازکننده صدمه و تحلیل مفصل باشد. سلول های بنیادی مزانشیمی سلول‌هایی چند توان هستند که در مغز استخوان، عضله، پوست و بافت چربی یافت می‌شوند و توانایی تمایز به انواع سلول‌های استخوانی، غضروفی، چربی و عصبی را دارند(۸،۷،۶،۲). در این میان، کاربرد سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی زیرجلدی به دلیل دستیابی آسان‌تر و بدون آزار و اذیت بیمار، بسیار عملی‌تر و آسان‌تر از نمونه‌برداری از مغز استخوان و دیگر بافت‌ها است. به‌علاوه، سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی نیاز به نگهداری طولانی مدت در بانک‌های سلول همراه با صرف هزینه‌های بالا ندارند. لذا در تحقیق حاضر، سلول‌های بنیادی از بافت چربی زیر جلدی ناحیه شکم با عمل لیپوساکشن جدا و کشت داده شدند و برای القای کندروژنز مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور افزایش کارایی و بهبود عملکرد کشت سلول و بافت‌های مهندسی شده نیاز به ایجاد داربست‌های مناسب و کارا می‌باشد. داربست به عنوان یک حامی فیزیکی نقش مهمی در مهندسی بافت از طریق تامین سوبسترای سه بعدی برای رشد سلول و بازسازی بافت بازی می کند(۲). داربست‌های سلولی دارای خصوصیاتی هستند که از جمله آن‌ها می‌توان به عدم سمیت، قابلیت سازگاری زیستی، قابلیت تجزیه پذیری زیستی، عدم ایمنی‌زایی، تهیه آسان، خصوصیات فیزیکی و مکانیکی مناسب، و پایداری مطلوب اشاره نمود. داربست ایده ال باید خصوصیات مکانیکی مانند بافت، ارائه یکپارچگی ایمنی و حمایت چسبندگی سلول، مهاجرت و تمایز داشته باشد. هم‌چنین داربست مهندسی بافت نباید پاسخ ایمنی و یا پاسخ به بدن بیگانه در بیمار ایجاد کند. داربست می‌تواند از مواد طبیعی، مصنوعی و یا ترکیبی از این دو (داربست هیبریدی) ساخته شود(۹،۵). مواد طبیعی فعالیت‌های فیزیولوژیکی از قبیل چسبندگی سلول، زیست سازگاری و زیست تخریبی مناسبی دارند(۵). فیبرین یکی از مواد طبیعی است که پتانسیل بالا برای استفاده در مهندسی بافت دارد. فیبرین می‌تواند از خون خود بیمار جداسازی و به عنوان یک داربست اتولوگ بدون خطر بالقوه از یک فعل و انفعال بدن بیگانه یا عفونت مورد استفاده قرار گیرد(۱۱،۱۰،۵). علاوه بر این، فیبرین نقش مهمی در رگزایی دارد که این ویژگی به نفع مهندسی بافت است، زیرا یکی از مشکلات عمده در

بافت‌های مهندسی شده، خون محدود است. در بهبود زخم فیبرین طبیعی یک محیط مناسب برای رگزایی و در نتیجه بهبود جریان خون فراهم می‌کند(۱۲،۱۳). هم‌چنین فیبرین دارای خواص چسبندگی، زیست سازگاری و زیست تخریب‌پذیری خوبی است(۹،۱۰). باتوجه به دلایل ذکر شده، دراین مطالعه از فیبرین به عنوان داربست سلولی استفاده شد. همچنین در مطالعات قبلی نشان داده شده بود که فیبرین می‌تواند یک محیط مناسب را به عنوان یک داربست برای فرآیندهای رشد، تکثیر و تمایز منابع سلولی مختلف فراهم سازد(۱۴). با این حال، حدود تغییر این فرآیندها در آزمایشات مختلف با هم تفاوت دارد. با توجه به این که در مطالعات قبلی انجام شده، از شرایط مختلف و فاکتورهای رشد متفاوتی جهت تمایز سلول‌های بنیادی با منشا مختلف بر روی داربست فیبرینی به بافت غضروفی استفاده شده است(۱۴)، مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از چربی بر روی داربست فیبرینی در حضور TGF-β3 در شرایط طبیعی کشت تمایزی و نیز بررسی اثرات این داربست هیدروژلی بر روی تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از چربی در حضور فاکتور TGF-β3 انجام پذیرفت.

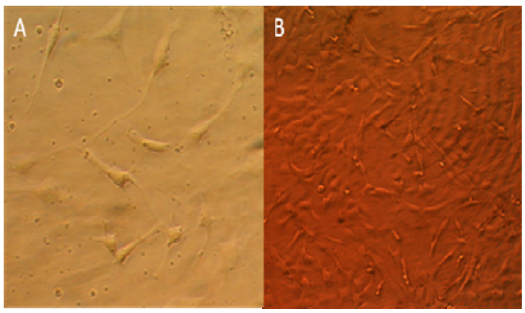
مواد و روش ها

مواد مورد نیاز

در این مطالعه، محیط DMEM[1] جهت کشت سلولی از شرکت سیگما و سرم جنین گوساله[2] و آنتی‌بیوتیک پنی سیلین/استرپتومایسین از شرکت Gibco خریداری شد. هم‌چنین آنتی‌بادی‌های Anti-CD90/Thy1 antibody و Anti-CD105 antibody جهت انجام فلوسایتومتری از شرکت Abcam خریداری شدند.

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسانی

در این مطالعه، به منظور جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بافت چربی با اخذ اجازه کتبی از بیماران با استفاده از عمل جراحی (لیپوساکشن) و تحت شرایط استریل به آزمایشگاه انتقال یافت. بافت چربی به صورت مکانیکی به قطعات کوچک تبدیل و با PBS (Sigma) شست و شو داده شد. برای تجزیه بافت، به ازای هر یک گرم بافت چربی ۱/۵ میلی‌گرم آنزیم کلاژنازI (Sigma) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ تا ۶۰ دقیقه به کار گرفته شد. سپس سوسپانسیون تحت سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۸۰۰ دور در دقیقه قرار گرفته و در نهایت رسوب سلولی در محیط کشت DMEM حاوی آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/ استرپتومایسین و FBS ۱۰ درصد به فلاسک مخصوص کشت سلول منتقل و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد حاوی ۵ درصد CO_2 و رطوبت ۹۵ درصد قرار داده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت، سلول‌های شناور با تعویض محیط از فلاسک حذف شدند. محیط کشت سلول‌ها هر ۳ روز یک‌بار تعویض گردید. سلول‌ها پس از ترپسینه شدن به مرحله پاساژ دو انتقال یافتند و جهت استفاده آماده گردیدند (تصویر شماره ۱).



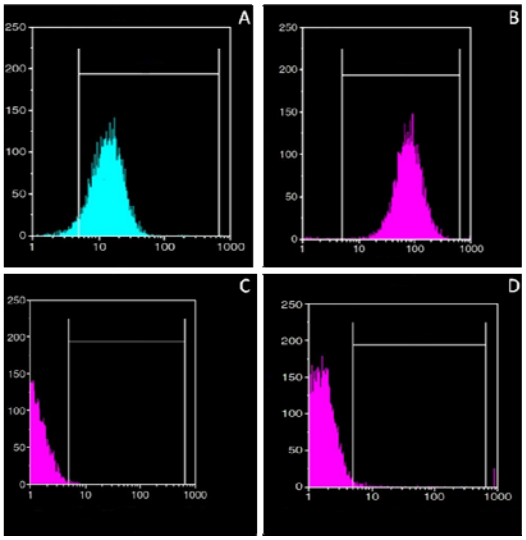
تصویر شماره ۱: سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی در پاساژهای اول (A) و دوم (B)

فلوسایتومتری

در این مطالعه، ابتدا سلول های تکثیر شده تا مرحله پاساژ ۳ توسط Trypsin/EDTA مورد هضم قرار گرفتند. سپس سلول‌های ترپسینه شده به وسیله PBS شست‌وشو

1. Dulbecco's Modified Eagles Medium
2. FBS

داده شدند. متعاقباً وجود تعدادی از مارکرهای سطحی معرفی شده به عنوان مارکرهای سطحی ویژه سلول‌های بنیادی مزانشیمی (CD90 و CD105) در سلول‌های جداسازی شده به وسیله فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت (تصویر شماره ۲).

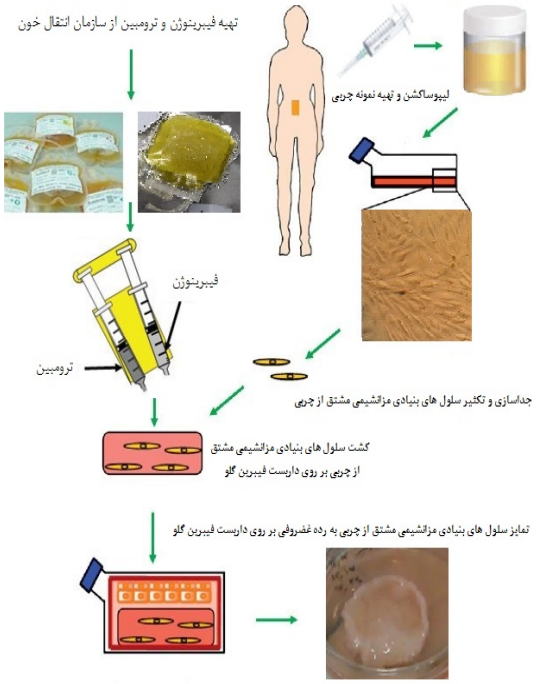


تصویر شماره ۲: آنالیز فلوسایتومتری سلول های جداسازی شده از بافت چربی جهت تایید وجود سلول های بنیادی مزانشیمی

در اینجا نمودار نشان می‌دهد که سلول‌ها، آنتی‌ژن‌های CD90 (A) و CD105 (B) را بیان کرده‌اند. نمودارهای C و D به عنوان کنترل در نظر گرفته شده‌اند.

آماده سازی فیبرینوژن و ترومبین

محلول پلاسمای تازه منجمد FFP و فیبرینوژن از سازمان انتقال خون قم تهیه شد. FFP در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ذوب گردید. سپس ۱۵ میلی‌لیتر از آن با ۱۰ میلی‌لیتر از کلسیم گلوکانات به نسبت ۵ به ۳ مخلوط شد(۱۵). محلول حاصل به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با ۲۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی به عنوان ترومبین جمع‌آوری گردید. فیبرینوژن و ترومبین حاصله برای استفاده جهت کشت سلول آماده شد. به همین‌منظور، ابتدا سلول‌های بنیادی مشتق از چربی با غلظت ۱×۱۰^{۶} سلول در هر سی‌سی در داخل ترومبین به صورت محلول درآمده و سپس فیبرینوژن به آن ها اضافه گردید. در نهایت داربست در محیط کندروژنیک حاوی DMEM-high glucose به همراه ۵۰ میکروگرم/ میلی لیتر آسکوربات ۲- فسفات، ۱ درصد انسولین- ترانسفرین- سلنیوم، ۱۰۰ نانو مولار دگزامتازون، ۵۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی، ۵ میکروگرم/ میلی‌لیتر لینولئیک اسید، ۱درصد پنی‌سیلین- استرپتومایسین و ۱۰ نانو گرم/ میلی لیتر فاکتور رشد TGF-β3 در داخل انکوباتور (دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، ۵ درصد Co_2 و ۹۵ درصد رطوبت) به مدت ۱۴ روز قرار گرفت (تصویر شماره ۳).



تصویر شماره ۳: مراحل کلی تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی به رده غضروفی با استفاده از داربست فیبرین گلو

تعیین توانایی بقای سلول ها

در ابتدا، سلول های بنیادی بالغ انسانی بر روی داربست‌ها در محیط کندروژنیک کشت داده شدند و سپس به مدت ۷ روز (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد Co_2 و ۹۵ درصد رطوبت) انکوبه شدند.

توانایی زنده مانی و تکثیر سلول‌ها به وسیله MTT [۳-(۴ و ۵- دی متیل) تیازول-۲-یل-۲ و ۵- دی متیل تترازولیوم بروماید، ۵ میلی‌گرم/ میلی لیتر] تعیین شد. ترکیب MTT پس از حذف محیط کندروژنیک به هر چاهک اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. سپس ۴۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکسید[1] به‌محلول‌حاصل اضافه‌گردید. درنهایت میزان جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه ELISA plate reader (Hiperion MPR4) اندازه‌گیری شد. سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی بدون داربست در ارزیابی MTT به عنوان گروه شاهد به‌کار برده شدند. این ارزیابی در سه تکرار صورت پذیرفت.

بررسی بیان ژن‌های کندروژنیک توسط Real-time PCR

تمامی نمونه‌های RNA، ۱۴ روز پس از پایان تمایز غضروف از هر کدام از داربست‌ها به طور جداگانه تهیه شدند. داربست‌ها در داخل نیتروژن مایع تخریب شده و سپس RNA با استفاده از کیت Accuzol™ (BioNEER) و طبق دستورالعمل مربوطه استخراج گردید. نسخه‌برداری معکوس RNA به cDNA با استفاده از کیت Accupower® RTpreM1X(BioNEER) وطبق دستورالعمل مربوطه انجام پذیرفت. Real-time PCR با استفاده از SYBRGreen PCR Master Mix (Amplicon) و Rotor-Gene™ 6000 Series software version 1.7.65(Corbett Life Science) انجام گرفت. پرایمرها با استفاده از برنامه پرایمر ۳ برای هر کدام از ژن‌ها طراحی شد که بر طبق توالی زیر می‌باشد (جدول شماره ۱). ژن مورد نظر بر اساس ژن منبع گلیسرآلدهید ۳- فسفات دهیدروژناز نرمال سازی شد. سطح بیان هر کدام از ژن‌های هدف با استفاده از $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه گردید.

آنالیز هیستولوژی

جهت انجام هیستولوژی، نمونه‌ها به مدت یک شبانه روز در فرمالین فیکس شده و سپس توسط غلظت‌های مختلف اتانول دهیدراته شدند. سپس نمونه‌ها درون پارافین قرار گرفته و به قطعه‌های با ضخامت ۵ میکرومتر تبدیل شدند. نهایتا رنگ‌آمیزی نمونه‌ها به وسیله رنگ‌های هماتوکسیلین/ ائوزین انجام شد.

یافته ها

تایید جداسازی سلول‌های بنیادی مشتق از چربی

در این مطالعه، از قابلیت اتصال سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی برای جداسازی اولیه این سلول‌ها استفاده شد. با ادامه یافتن روند تکثیر سلول ها و افزایش تعداد آنها در محیط کشت، جمعیت یکنواختی از سلول‌های شبه فیبروبلاستی توسط میکروسکوپ فاز متضاد مشاهده گردید. هم‌چنین، آنالیز فلوسایتومتری نشان داد که بیش از ۸۰ درصد سلول‌های جداسازی شده، مارکرهای سطحی CD90 و CD105 را بیان نمودند (تصویر شماره ۲).

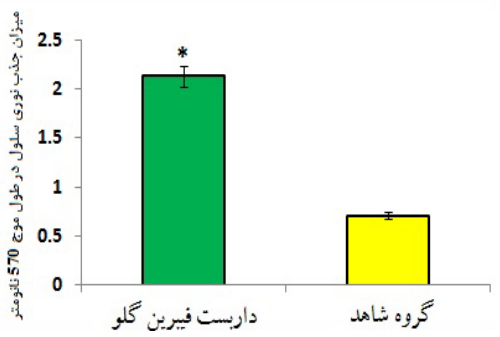
جدول شماره ۱: توالی پرایمر جهت انجام *Real-time PCR*

نام پرایمر	توالی پرایمر (5' -> 3')	طول قطعه پرایمر (جفت باز)	دمای ذوب پرایمر (درجه سانتیگراد)
پرایمر مستقیم کلاژن نوع I	TTGTACAGACATGACAAGAGGC	۱۲۸	۵۸
پرایمر معکوس کلاژن نوعI	CTCTACCTGGGTACTACCCA	۱۲۸	۵۸
پرایمر مستقیم اگریکان	CAGAGTGAAATCCACCAAGT	۱۹۸	۵۸
پرایمر معکوس اگریکان	TGTCCGTGGACAAACAGGTA	۱۹۸	۵۸
پرایمر مستقیم sox9	TACGACTACACGCACCACCA	۱۷۷	۵۸
پرایمر معکوس sox9	TTAGGATCATCTGCGCCATC	۱۷۷	۵۸
پرایمر مستقیم کلاژن نوع II	ACACAGCGCCTTGAGAAGAG	۱۵۷	۵۸
پرایمرمعکوس کلاژن نوع II	TTCTACGGTCTCCCCAGAGA	۱۵۷	۵۸

قابلیت بقا و تکثیر سلولی

قابلیت بقا و تکثیر سلولی در روز هفتم توسط تست MTT ارزیابی شد (تصویر شماره ۴). این مطالعه نشان داد که داربست فیبرینی به طور معنی داری قابلیت بقا و تکثیر سلول‌ها را در مقایسه با گروه کنترل (سلول‌های بدون داربست) افزایش داده است ($p<0/05$) (تصویر شماره ۴).

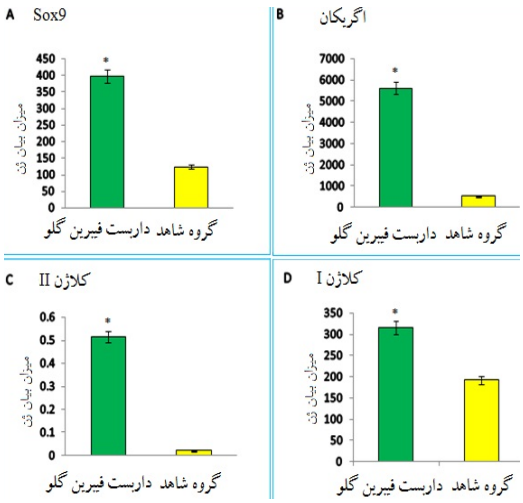
1. DMSO



تصویر شماره ۴: مقایسه بقای سلولی بین سلولهای بنیادی مزانشیمی محصور در داربست فیبرینی و گروه شاهد

تمایز غضروف

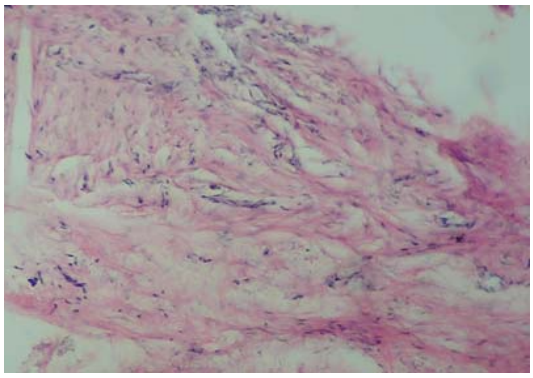
۱۴ روز پس از القای کندروژنز، بیان ژن‌های کلاژن I، کلاژن II، *Sox9* و اگریکان در حالت‌های مختلف، پس از قرارگیری سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی روی داربست فیبرینی مورد ارزیابی قرار گرفت (تصویر شماره ۵). آنالیز آماری نشان داد که یک اختلاف معنی‌داری در بیان تمامی ژن‌ها در داربست فیبرین گلو نسبت به گروه شاهد وجود دارد ($p<۰/۰۵$) (تصویر شماره ۵).



تصویر شماره ۵: بیان ژن های کلاژن I، کلاژن II، *Sox9* و اگریکان در داربست فیبرین نسبت به گروه شاهد

بررسی هیستولوژی

تجمع و حضور کندروسیت‌ها توسط رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین/ائوزین در هفته چهارم مورد بررسی قرار گرفت. بررسی هیستولوژیکی نشان داد که سلول‌های کندروسیتی بر روی داربست فیبرینی تشکیل شدند (تصویر شماره ۶).



تصویر شماره ۶: بررسی تشکیل سلول‌های غضروفی بر روی داربست فیبرینی توسط آنالیز هیستولوژیکی

بحث

از آن‌جایی که نقص غضروف، به دلیل فقدان عروق خونی و اعصاب، نمی تواند به طور خودبخودی تعمیر شود از طریق مهندسی بافت می‌توان به فرآیند ترمیم بافت غضروفی کمک نمود(۱۵). کندروسیت‌ها و سلول‌های بنیادی مزانشیمی پرکاربردترین منابع سلولی در مطالعات مهندسی بافت غضروف می‌باشند. با این حال، سلول‌های کندروسیتی به دلیل توانایی بازسازی پایین آن‌ها کم‌تر مورد توجه مهندسی بافت قرار گرفته‌اند. با توجه به این موضوع، سلول‌های بنیادی مزانشیمی بالغ دارای پتانسیل رشد و تمایز به کندروسیت‌ها هستند و هم‌چنین مطالعات قبلی بیانگر این می‌باشد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی باعث مهار پاسخ ایمنی سلولی می‌شوند و به همین دلیل در تحقیقات کاربرد بسیاری پیدا کرده‌اند(۱۹-۱۶). بنابر این، آن‌ها به عنوان کاندیدهای ایده‌ال برای ترمیم بافت غضروف به شمار می‌آیند. انتخاب یک ماده زیستی مناسب به عنوان یک ماتریکس خارج سلولی به نوع و خصوصیات بافت مورد نظر بستگی دارد(۱۰،۹). داربست‌های مورد استفاده در مهندسی بافت می‌بایستی از خصوصیات ویژه‌ای برخوردار

باشند که برای بازسازی سلول حیاتی بوده و استحکام مکانیکی لازم را نیز فراهم سازند(۲۰). برای مثال، هیدروژل‌ها دسته‌ای از مواد بیوپلیمری هستند که دارای مزایایی هم‌چون محتوای آب بالا (معمولا تا بیش از ۳۰ درصد وزنی)، مواد موثر و توانایی کپسوله کردن یکنواخت سلول‌ها می‌باشند(۲۱). آن‌ها از زنجیره‌های پلیمری آب دوست تشکیل شده اند و از هیدروژل‌های طبیعی فیبرین می‌باشند که به دلیل شباهت ساختاری آن‌ها از نقطه نظر ماکرومولکولی به بافت‌های انسان، سازگارپذیری زیستی، سمیت پایین، هزینه نسبتا پایین و دسترسی فراوان به آن‌ها مورد تایید و پذیرش قرار گرفته‌اند. فیبرین گلو به طور گسترده در جهت ترمیم و بازسازی بافت غضروفی در مهندسی بافت استفاده شده است(۱۰،۲۲-۲۰). فیبرین گلو ترکیبی از فیبرینوژن و ترومبین است که به دلیل خواص سازگارپذیری و تجزیه‌پذیری زیستی خود و ظرفیت اتصال به سلول‌ها به عنوان وسیله زیستی مناسبی جهت پیوند سلول‌ها محسوب می‌شود(۲۴،۲۳). فیبرین یک داربست طبیعی اتولوگ است که نقش مهمی در رگزایی نیز دارد. به علاوه، این ماده زیستی می‌تواند به پیوند با کارایی بالا و انتشار سلولی یکنواخت کمک کند(۱۱،۱۰). فیبرین به دلیل آب دوست بودن و داشتن مقادیر فراوان آب می‌تواند به عنوان ماده زمینه خارج سلولی بستری مناسب جهت رشد سلول‌ها فراهم کند. همچنین آزاد شدن بسیاری از فاکتورهای زیست فعال از فیبرین می‌تواند در رشد و تمایز سلول‌ها نقش مهمی را ایفا نماید(۲۳). بنابراین، در این مطالعه توانایی فیبرین تهیه شده از فیبرینوژن و ترومبین خون در زنده نگه داشتن سلول ها و همچنین فراهم کردن محیط مناسب جهت القای تمایز کندروژنز در سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در حضور فاکتور رشد TGF-β3 مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به وسیله این پروتکل را با موفقیت تایید نمود. آنالیز آنتی‌ژن‌های سطحی سلول با استفاده از فلوسایتومتری نشان داد که بیش از ۹۰ درصد سلول‌های جداسازی شده مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی بالغ را بیان نمودند که هم‌سو با گزارشات منتشر شده قبلی بود(۲۳). یافته‌های حاصل از تست MTT نشان داد که توانایی زنده ماندن سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی به طور معنی‌داری در داربست فیبرینی نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است. دلیل این امر را می‌توان به قابلیت کپسوله کردن یکنواخت سلول‌ها توسط فیبرین نسبت داد. این نتیجه با بسیاری از پژوهش‌های محققین سازگار است(۱۵،۱۴،۹). برای اثبات وجود بافت غضروفی در ساختارهای حاصل از تمایز غضروف روش های مختلفی به کار می‌رود. همان طور که در مطالعات دیگر بیان شده است شواهد نشان می‌دهد که غضروف‌سازی توسط افزایش در بیان و تجمع کلاژن ۲ و اگریکان شناخته می‌شود(۲۳). هم‌چنین TGF-β۳ نیز به عنوان یک تحریک‌کننده غضروف‌سازی می‌تواند در طول کشت در آزمایشگاه بر روی تمایز سلول‌ها به غضروف مؤثر باشد(۱۴). در این مطالعه با استفاده از تکنیک Real-time PCR مشخص شد که بیان ژن‌های کلاژن نوع II و اگریکان به عنوان مارکرهای غضروفی در داربست فیبرین نسبت به گروه کنترل به صورت معنی‌داری افزایش یافته است. دلیل این افزایش را می‌توان اثر فاکتورهای رشد آزاد شده از فیبرین بر روی تمایز بهتر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی و کپسوله شدن سلول‌ها درون داربست هیدروژلی فیبرین دانست. همچنین با استفاده از بررسی هیستولوژی نشان داده شد که سلول‌های غضروفی بر روی داربست فیبرینی تشکیل شده‌اند. این نتایج تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی بر روی داربست فیبرینی را مطابق با گزارشات مطالعات قبلی تایید نمودند(۲۳،۱۴). طبق نتایج حاصل از بررسی‌های قبلی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی هنگامی که تحت شرایط کشت سه بعدی قرار بگیرند امکان تمایز به سلول‌های غضروفی را در شرایط خاصی پیدا می‌کنند(۲۴). به عبارتی، سلول‌های بنیادی

مزانشیمی مشتق از چربی انسانی قادرند که در صورت کشت بر روی ماتریکس سه بعدی و در حضور محیطی حاوی مواد تنظیم‌کننده ویژه‌ای (دگزامتازون و TGFβ) که قابلیت حل‌پذیری دارند به سلول‌های غضروفی تمایز یابند(۲۵). در مطالعه صورت گرفته توسط Ahmed و همکاران مشخص شد که کپسوله شدن سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان بر روی داربست فیبرین‌گلو در حضور فاکتور TGF-β2 باعث افزایش بیان ژن اگریکان می‌شود که علاوه بر آن افزایش بیان ژن کلاژن II نیز مشاهده گردید(۲۳). نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر نیز افزایش بیان این دو ژن را تایید نمود. همچنین در تحقیق دیگری، پس از کپسوله شدن سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان و تحریک غضروف سازی، جمعیت کثیری از سلول‌های کندروسیت شکل درون داربست فیبرین گلو مشاهده گردید و علاوه بر این، آنالیز هیستولوژی نیز وجود سلول‌های غضروفی را به اثبات رسانید که یافته‌های حاصل از مطالعه ما نیز همسو با این نتایج بود(۱۴). Baumgartner و همکاران نیز گزارش کردند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی کشت شده بر روی فیبرین گلوی تجاری در حضور فاکتور TGF-β و در شرایط کم اکسیژن انواع سلول‌های کندروسیت گرد شکل را تولید نموده و باعث بیان کلاژن نوع II می‌شوند(۲۶). مطالعه حاضر نیز مناسب بودن هیدروژل فیبرین به دست آمده از فیبرینوژن و ترومبین خون را برای حمایت از چرخه غضروف زایی و بهبود بقا، تکثیر و تمایز غضروف در شرایط آزمایشگاهی تایید نمود.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که این یافته‌ها نشان داد که نه تنها داربست هیدروژلی فیبرین تهیه شده از فیبرینوژن و ترومبین خون، تکثیر و بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی را بهبود می‌بخشد بلکه توانایی ایجاد یک محیط مناسب جهت تمایز این سلول‌ها به رده غضروفی را نیز دارا می‌باشد.

سپاسگزاری

از جناب آقایان زارع و رجائی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند تشکر به عمل می‌آوریم.

References

1. Park JG, Lee JH, Kim JN, Kang JA, Kim KJ, Park KD et al. Chondrogenic Differentiation of Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells in Functional PLGA Scaffolds. Tissue Eng Regen Med 2011; 8(1): 47-54.
2. Wei Y, Hu H, Wang H, Wu Y, Deng L, Qi J. Cartilage regeneration of adipose-derived stem cells in a hybrid scaffold from fibrin-modified PLGA. Cell Transplant 2009; 18(2): 159-170.
3. Zhao H, Ma L, Gong Y, Gao C, Shen J. A polylactide/fibrin gel composite scaffold for cartilage tissue engineering: fabrication and an in vitro evaluation. J Mater Sci Mater Med 2009; 20(1): 135-143.
4. Chang CH, Lin FH, Kuo TF, Liu HC. Cartilage tissue engineering. Biomed Eng Appl Basis Comm 2005; 17(2): 61-71.
5. Eyrich D. Fibrin for tissue engineering of cartilage [PhD thesis]. Faculty of Chemistry and Pharmacy: University of Regensburg; 2006.
6. Ahmed TAE, Hincke MT. Fibrin for Encapsulation of Human Mesenchymal Stem Cells for Chondrogenic Differentiation. Stem Cells and Cancer Stem Cells. Springer Netherlands 2013; V(10): 59-69.
7. Chu CR, Friel N. Chondrogenic Progenitor Cells and Articular Cartilage Repair. Rheumatol Curr Res 2012; S3: 1-6.

8. Diekman BO, Rowland CR, Lennon DP, Caplan AI, Guilak F. Chondrogenesis of adult stem cells from adipose tissue and bone marrow: induction by growth factors and cartilage-derived matrix. Tissue Eng Part A 2010; 16(2): 523-533.
9. Ahmed TA, Dare EV, Hincke M. Fibrin: A versatile scaffold for tissue engineering applications. Tissue Eng Part B Rev 2008; 14(2): 199-215.
10. Ahmed TA, Griffith M, Hincke M. Characterization and inhibition of fibrin hydrogel-degrading enzymes during development of tissue engineering scaffolds. Tissue Eng 2007; 13(7):1469-1477.
11. Jockenhoevel S, Zund G, Hoerstrup SP, Chalabi K, Sachweh JS, Demircan L, et al. Fibrin gel- advantages of a new scaffold in cardiovascular tissue engineering. Eur J Cardiothorac Surg 2001; 19(4): 424-430.
12. Laurens N, Koolwijk P, de Maat MP. Fibrin structure and wound healing. J Thromb Haemost 2006; 4(5): 932-939.
13. Zisch AH, Schenk U, Schense JC, Sakiyama-Elbert SE, Hubbell JA. Covalently conjugated VEGF--fibrin matrices for endothelialization. J Control Release 2001; 72(1): 101-113.
14. Ahmed TA, Hincke MT. Mesenchymal stem cell-based tissue engineering strategies for repair of articular cartilage. Histol Histopathol 2014; 29(6): 669-689.
15. Ghiasi M, Tabatabaei Qomi R, Kalhor N, Fazaeli H, Mehdizadeh M, Sheykh Hasan M. The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. SMU Medical Journal 2014; 1(2): 261-273.
16. Sheykhhasan M, Tabatabaei Qomi R, Kalhor N, Ghiasi M. Isolation and maintenance of canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in order to tissue engineering application. International Journal of Advanced Biological Science and Engineering (IJABBR) 2014; 1(2): 86-97.
17. Li J, Pei M. Cell senescence: a challenge in cartilage engineering and regeneration. Tissue Eng Rev 2012; 18(4): 270-287.
18. Sheykhhasan M, Kalhor N, Tabatabaei Qomi R, Ghiasi M. Optimization method for isolation and culture of chondrocytes in human nasal cartilage tissue. International Journal of Advanced Biological Science and Engineering (IJABSE) 2014; 1(1): 74-85.
19. Rasmusson I, Ringdén O, Sundberg B, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. Exp Cell Res 2005; 305(1): 33-41.
20. Park JS, Yang HN, Woo DG, Jeon SY, Park KH. Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells in fibrin constructs evaluated in vitro and in nude mouse and rabbit defects models. Biomaterials 2011; 32(6): 1495-1507.
21. Ahmed TA, Halpenny M, Atkins H, Giulivi A, Dervin G, Griffith M, HinckeM. Stabilization of fibrinmesenchymal stem cells (MSCs) constructs under hypoxic conditions during tissue engineering of articular cartilage. J Bone Joint Surg Br 2010; 92-B (suppl 1): 2-3.
22. Zanetti AS, Sabliov C, Gimble JM, Hayes DJ. Human Adipose-Derived Stem Cells and three-dimensional scaffold constructs: A review of the biomaterials and models currently used for bone regeneration. J Biomed Mater Res Part B Appl Biomate 2013; 101(1): 187-199.
23. Ahmed TA, Giulivi A, Griffith M, Hincke M. Fibrin glues in combination with mesenchymal stem cells to develop a tissue-engineered cartilage substitute. Tissue Eng

Part A 2011; 17(3-4): 323-335.

24. Jung SN, Rhie JW, Kwon H, Jun YJ, Seo JW, Yoo G, et al. In vivo cartilage formation using chondrogenic-differentiated human adipose-derived mesenchymal stem cells mixed with fibrin glue. J Craniofac Surg 2010; 21(2): 468-472.
25. Guilak F, Lott KE, Awad HA, Cao Q, Hicok KC, Fermor B, et al. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. J Cell Physiol 2006; 206(1): 229-237.
26. Baumgartner L, Arnhold S, Brixius K, Addicks K, Bloch W. Human mesenchymal stem cells: Influence of oxygen pressure on proliferation and chondrogenic differentiation in fibrin glue in vitro. J Biomed Mater Res A 2010; 93(3): 930-940.