مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره هجدهم، شماره ۹، شهریور ۱۳۹۵، صفحه ۳۸-۳۲

رشد و تمایز کندروژنیک سلول های بنیادی مزانشیمی بافت چربی انسانی بر روی داربست کیتوسان

عباسعلی کریم پور(PhD)[۱]، فرشته طالب پور امیری(PhD)[۱*]، المیرا غفاری(MSc)[۲]، اکرم علیزاده(PhD)[۳]، زهرا جمال پور (PhD)[۴]، مهری میرحسینی(PhD)[۵]، امیر اسماعیل نژاد مقدم(PhD)[۱] ، ایوب برزگرنژاد(MD)[۶]

۱-مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۲-دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۳-مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
۴-دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران
۵-دانشکده پرستاری و مامایی آمل، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۶-گروه ارولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

دریافت: ۹۵/۱/۲۶، اصلاح: ۹۵/۳/۱۲، پذیرش: ۹۵/۵/۶

خلاصه

سابقه و هدف: درمان آسیب های غضروفی به هر علتی تنها با کاهش موقت درد مفاصل همراه است. با فراهم آمدن امکان تمایز سلولهای بنیادی از منابع مختلف به بافت های بالغ، می توان به ترمیم و درمان اسیب های وارده به بافت‌های غضروفی سیستم اسکلتی امیدوار بود. در این مطالعه، پتانسیل کندروژنیک اسکافولد CH-β-GP-HEC با سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی سلولهای بنیادی از بافت چربی زیر جلدی ناحیه شکم ۱۵بیماری که تحت عمل جراحی درمان فتق اینگوینال قرار گرفتند جدا شد. تعداد $۷-۶\times ۱۰^{۵}$ سلول برای مدت ۲۱ روز بصورت تک بعدی بر کف پلیت و بصورت سه بعدی بر روی داربست کیتوسان کشت داده شدند. تست MTT برای ارزیابی سمیت داربست بر میزان زنده ماندن سلول انجام شد. تکثیر و تمایز سلول ها پس از رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو در دو نوع کشت بررسی گردید. جهت تایید تشکیل غضروف، بیان کلاژن نوع ۲ بوسیله ایمنوهیستوشیمی ارزیابی شد.

یافته ها: در تست MTT متوسط OD بزرگتر از ۰/۸ برای سلول های کشت داده شده بر روی داربست در مقایسه با کنترل تایید کننده عدم سمیت داربست برای کشت سلول های بنیادی می باشد ($p>۰/۰۵$). تمایز کندروژنیک سلول ها بر روی داربست میزان بیشتری از رسوب گلیکوزآمینوگلیکان را در ماتریکس خارج سلولی در مقایسه با کشت تک-لایه نشان داد.همچنین در گروه کشت سه بعدی، سلول‌ها کروی و با هسته بازوفیل تر مورفولوژی متفاوتری نسبت به کشت تک لایه داشتند. در یافته‌های ایمنوهیستوشیمی افزایش سنتز کلاژن نوع ۲ به عنوان مارکر کندروژنز در کشت سه بعدی در مقایسه با کشت تک‌لایه دیده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه نشان داد که داربست هیدروژلی CH-β-GP-HEC با ساختار متخلخل محیط مناسبتری را برای رشد سلولهای بنیادی مزانشیمی و تمایز آنها به بافت غضروفی فراهم می کند.

واژه‌های کلیدی: کندروژنز، بافت چربی، سلول بنیادی مزانشیمی، کیتوسان، داربست.

مقدمه

درمان آسیب های غضروفی با علت تروما، زمینه ژنتیکی، یا با شرایط متابولیکی اغلب تهاجمی بوده و تنها با کاهش موقت درد مفاصل همراه است. با فراهم آمدن امکان تمایز سلول های بنیادی از منابع مختلف به بافت های بالغ، از جمله غضروف، سلول درمانی، چشم انداز امیدوار کننده ای برای ترمیم و درمان آسیب های وارده به بخشهای غضروفی سیستم اسکلتی ایجاد کرده است (۲و۱). استفاده از سلول های بنیادی مزانشیمی (MSC) به جای سلول های کندروسیت در مهندسی بافت غضروفی، به عنوان یک منبع جایگزین سلولی مورد توجه می‌باشد، چرا که می توان آنها را با عوارض کمترنسبت به سلولهای غضروفی از یک بیمار برداشت کرد (۴و۳). همچنین تکثیر و انبوه سازی و نگهداری سلولهای بنیادی برای استفاده در روشهای مهندسی بافت به مراتب ساده تر و مقرون به صرفه تر است (۶و۵). سلول بنیادی مشتق از بافت چربی انسانی توانایی تمایز به انواع رده های سلولی، مشابه سلول بنیادی مزانشیمی مغز استخوانی را دارد (۷). اگر چه محرکهای شیمیایی پیدا شدند که در القاء تمایز غضروفی MSCs نقش دارند اما تولید سلول تمایز یافته ای که بتواند با انتقال به محیط In vivo عملکردش حفظ شود هنوز جای بحث می باشد (۸). در مهندسی بافت جهت پیوند سلول، آنها را بر روی داربست‌های طبیعی و ساختگی کشت می دهند. داربستهای زیادی در محیط invivo و invitro مورد ارزیابی قرار گرفتند. هیدروژل‌ها نوعی از مواد بیومتریال هستند که با توجه به محتوای آب بالا، خواص

این مقاله حاصل پایان نامه المیرا غفاری دانشجوی رشته علوم تشریحی و طرح تحقیقاتی به شماره ۱۰۵۱ دانشگاه علوم پزشکی مازندران می باشد.

*مسئول مقاله: دکتر فرشته طالب پور امیری
آدرس: ساری، جاده خزر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران. تلفن: ۳۳۵۴۳۰۸۸-۰۱۱
E-mail:ftaleb2001@yahoo.co.uk

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.9.5.5]
[DOI: 10.22088/jbums.18.9.32]

الاستیسیتی، نرمی، نفوذ پذیری اکسیژن و زیست سازگاری بسیار عالی به بافت نرم شباهت بسیار زیادی دارند (۹). در میان بیومتریال‌های بر پایه هیدروژل طبیعی، نمک کیتوزان به عنوان بیومتریال امیدوار کننده در مهندسی بافت ارائه شده است (۱۱و۱۰) کیتوزان، یک آمینو پلی ساکارید طبیعی است که براحتی در طبیعت تخریب شده و پیش ساز گلیکوزآمینوگلیکان GAG طبیعی می باشد (۱۲). کیتوزان، به عنوان یک داربست هیدروژلی می تواند با ایجاد ریز محیط سه بعدی بیولوژیکی و بیوشیمیایی نقش مناسبی در رشد سلول، تمایز و افزایش چسبندگی سلول داشته باشد (۱۵-۱۳). کیتوسان بتا-گلیسرول فسفات هیدروکسی اتیل سلولز chitosan-beta glycerol phosphate-hydroxyethyl cellulose (CH-β-GP-HEC) یکی از داربست‌های کیتوسانی است که در بافت کبدی اثر زیست تخریب پذیری و زیست سازگاری آن مورد ارزیابی قرار گرفته است (۱۶). همچنین یک انتخاب مناسب به عنوان داربست قابل تزریق برای بافت عصبی می باشد (not publish). ارزیابی توانایی این هیدروژل برای پشتیبانی مناسب تمایز غضروفی سلول های بنیادی کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است(۱۷). در این تحقیق کیتوسان بتا- گلیسرول فسفات- هیدروکسی اتیل سلولز به عنوان یک پشتیبان داربستی برای کشت سه بعدی سلول های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از بافت چربی انسانی و تاثیر آن بر پتانسیل کندروژنیک این سلولها مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

آماده سازی هیدروژل بر پایه کیتوزان: پودر کیتوزان با وزن مولکولی ۱۰۰۰ کیلودالتون بوسیله اتوکلاو استریل شد و برای دو ساعت در معرض هوا خشک شد. ۰/۲۲۵ گرم از پودر در ۹ میلی لیتر از هیدروکلریک اسید(M۰/۱) با shaking حل شد. از سویی دیگر، ۲/۲۵ گرم از بتا- گلیسرول فسفات (Sigma) (β-GP) در ۳/۵ میلی لیتر از آب مقطر حل و با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرون استریل شد. هر دو محصول برای جلوگیری از ژله ای شدن برای مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ سرد شدند. سپس محلول β-GP سرد به صورت قطره قطره به محلول کیتوزان با هم زدن مداوم اضافه گردید تا یک محلول روشن تشکیل شود. سپس ۰/۱۲۵ گرم از هیدروکسی اتیل سلولز (Sigma)(HEC) در ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت DMEM حل شده و به محلول CH-β-GP اضافه گردید. تمام محلول‌ها در دمای ۴ درجه تهیه شد.

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی: در این مطالعه مقطعی نمونه‌های چربی از ناحیه اینگوینال ۱۵ بیمار۳۵-۲۰ سال که برای جراحی فتق مراجعه کرده بودند مطابق دستورالعمل کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران و با رضایت آگاهانه از بیماران بستری در بیمارستان امام خمینی ساری تهیه شد. سپس نمونه چربی در داخل لوله فالکون حاوی PBS با آنتی بیوتیک به آزمایشگاه کشت سلول بخش آناتومی منتقل شد. برای جداسازی سلول بنیادی مشتق از بافت چربی از روش هضم آنزیمی استفاده شد (۱۸).

نمونه چربی پس از سه بار شستشو در بافر PBS و پاک‌سازی خون و بافت اضافی، به قطعات چند میلیمتری تقسیم گردید. جهت هضم آنزیمی با آنزیم کلاژناز نوع I (sigma) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و CO2، ۵ درصد انکوبه شد. سپس آنزیم بوسیله DMEM (Bio Idea) حاوی FBS، ۱۰ درصد خنثی شد. سوسپانسیون سلولی سانتریفیوژ شده و مایع رویی تخلیه گردید. به پلاک سلولی محیط DMEM حاوی FBS (Gibco) ۱۰ درصد و پنی-سیلین- استرپتومایسین (Gibco) ۱ درصد اضافه شده و سپس سوسپانسیون سلولی به فلاسک کشت سلول (T-25) منتقل شد. از سلول‌های پاساژ سوم یا چهارم برای تمایز کندروژنیک استفاده شد.

فلوسیتومتری: به منظور تایید وجود سلول‌های بنیادی و برای شناسایی مارکر سطحی این سلول‌ها فلوسیتومتری انجام شد. برای این منظور دو مارکر سطحی اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی استرومایی شامل CD105 و CD90 و دو مارکر اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی هماتوپوئیتیک شامل CD31 و CD45 بررسی شدند (۱۹). از سلول‌های پاساژ ۴ بعد از شمارش توسط هموسایتومتر، حدود ۲×۱۰^{۵} سلول به هر لوله فالکون کنترل و آزمایش منتقل شد. سپس به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۲۵۰۰ سانتریفیوژ شدند و پس از دور ریختن مایع رویی، رسوب سلولی در BSA ۳٪ حل شد و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ انکوبه شد. سپس به لوله‌های تست، آنتی بادی‌های CD31, CD45 CD90,وCD105 کونژوگه شده با فیکواریترین (PE) اضافه شد. به لوله کنترل منفی نیز ایزوتیپ آنتی بادی علیه IgG1 کونژوگه شده با PE اضافه شد. نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شدند. سپس PBS به آن‌ها اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۲۵۰۰ سانتریفیوژ شدند. مایع رویی تخلیه و توده‌های سلولی نشان‌دار شده در cc ۲ بافر PBS حل و توسط دستگاه فلوسیتومتری تجزیه و تحلیل شدند.

کشت و تمایز کندروژنیک در روش تک لایه: در روش کشت تک لایه (Monolayer)، بعد از تریپسینه و سانتریفیوژ سلول‌ها، مایع رویی تخلیه گردید. پلاک سلولی مجددا در محیط تمایزی غضروف (Invitrogen) سوسپانسیون شدند. تعداد $۷-۶\times۱۰^{۵}$ سلول در کف هر چاهک ۲۴ خانه به صورت سوسپانسون پخش شد و محیط تمایزی هر ۲ روز تعویض گردید. سلول ها برای مدت ۲۱ روز با محیط تمایزی کشت داده شدند. برای گروه کنترل از محیط کشت کامل استفاده شد.

کشت و تمایز کندروژنیک بر روی داربست کیتوسان بتا- گلیسرول فسفات- هیدروکسی اتیل سلولز: داربست های آماده سازی شده ابتدا توسط الکل ۷۰٪ و سپس اشعه UV استریل شدند. هر کدام از تکه های داربست در کف پلیت ۲۴ خانه قرار داده و تعداد $۷-۶\times۱۰^{۵}$ سلول در مرکز هر داربست ریخته شد.پلیت حاوی سلول برای مدت ۲ ساعت انکوبه شد. سپس به میزان ۱ سی سی محیط کشت تمایزی به هر چاهک اضافه گردید. برای گروه کنترل از محیط کشت کامل DMEM استفاده شد. محیط کشت هر دو روز تعویض شد. سلول ها برای مدت ۲۱ روز بر روی داربست کشت داده شدند.

تست MTT: برای بررسی سمیت داربست کیتوسان بتاگلیسرول فسفات هیدروکسی اتیل‌سلولز از تست MTT استفاده شد. سلولهای ADSCs همانند بخش "کشت و تمایز" در داخل پلیت های ۲۴ خانه کشت داده شدند. ۲۴ ساعت بعد از کشت و اینکوبه شدن، ۱۰ µl از هیدروژل به هر خانه اضافه گردید. هر دو روز محیط کشت همانند بخش قبلی تعویض شد. بعداز ۲۱ روز ۱۰۰ µl از محلول آماده MTT به هر خانه اضافه شد و برای ۴ ساعت در دمای $۳۷\ ^{0}C$ اینکوبه شدند. برای حل شدن کریستال های فورمازون، به همان حجم از حلال DMSO به هر خانه اضافه می‌شود و برای ۱۵ دقیقه در محل تاریک قرار می‌گیرد. درنهایت جذب نوری محلول بدست آمده در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد.

ارزیابی هیستولوژیکی: ۲۱ روز بعد از کشت سلول‌ها داخل پلیت ۲۴ خانه، نمونه‌ها بعد از دو بار شستشو با بافر PBS به مدت ۲۰ دقیقه در پارافرمالدهید ۴٪ فیکس شدند. بعد از شستشو با آب مقطر، رنگ تولوئیدن بلو به آن‌ها اضافه شد. نمونه‌ها سپس با میکروسکوپ نوری بررسی شدند. ۲۱ روز بعد از کشت سلول بر روی داربست، نمونه‌ها بعد از شستشو، فیکس، آبگیری و شفاف سازی از داربست ها

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.9.5.5]
[DOI: 10.22088/jbums.18.9.32]

بلوک پارافینه تهیه شد. برش های ۵ میکرونی با رنگ آمیزی تولوئیدن بلو رنگ شدند. نمونه‌ها سپس با میکروسکوپ نوری بررسی شدند.

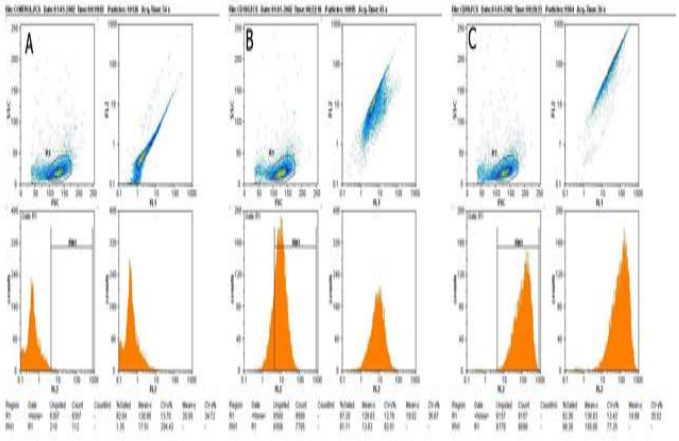
ارزیابی ایمونوهیستوشیمی: جهت ارزیابی ایمونوهیستوشیمی تشکیل غضروف، پس از تهیه لام‌ها با برش های ۵ میکرونی، شفاف کردن و آب دهی، بافت ها در استن فیکس شدند. به مدت ۲۰ دقیقه بازیابی لام‌ها در ماکروفر انجام شد. لام‌ها در بافر TBS (Tris-buffered saline) شسته شدند. فعالیت پراکسیدهیدروژن بافت ها با محلول H_2O_2 ۳٪ / در اتانل ۷۰ ٪ به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق خنثی شد. بعد از شستشو در بافر TBS نمونه‌ها با آنتی بادی اولیه علیه کلاژن Anti body Anti Collagen II به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از شستشوی لام‌ها دربافر TBS، مجددا با آنتی بادی ثانویه **بز** علیه خرگوش Goat anti-Rabbit IgG H&L (HRP)در دمای اتاق به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند. سپس بعد از شستشو در بافر TBS نمونه ها با سوبسترای DAB به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه و پس از شستشو با آب جاری به مدت ۵ دقیقه نمونه ها با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز آماری: آنالیز آماری، با استفاده از نسخه ۱۷ نرم افزار SPSS انجام شد. داده‌های تست MTT با تست آماری One Way ANOVA بیان شد و $p<۰/۰۵$ معنی دارد در نظر گرفته شد.

یافته ها

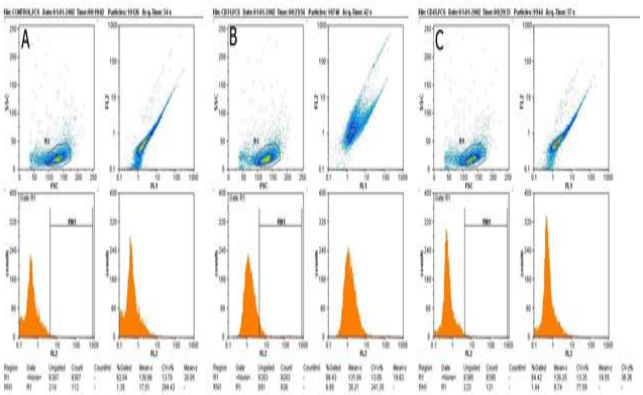
مورفولوژی سلول‌های کشت شده: ۲ روز بعد از کشت و تعویض اولین محیط کشت، سلول‌های دوکی شکل شبه فیبروبلاست با زوائد سیتوپلاسمی متصل به کف فلاسک دیده شدند. بعد از ۱۰ روز، تراکم سلول‌های کشت داده شده به ۸۰ درصد رسید و پاساژ داده شد.

نتایج حاصل از بررسی بیان مارکرهای سطحی به‌روش فلوسیتومتری: تجزیه و تحلیل مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی توسط روش فلوسیتومتری نشان داد که سلول‌های پاساژ ۴، چسبیده به کف فلاسک بطور میانگین ۸۱/۱ درصد از سلول‌ها مارکر CD105 و حدود ۹۹/۲ درصد سلول ها مارکر CD90 که از مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی استرومایی است را بیان کردند (شکل۱). در حالی‌که همین سلول‌ها مارکرهای سلول هماتوپوئیتیک مانند CD31 و CD45 را به میزان کمتر از ۷ درصد بیان کردند (شکل۲).

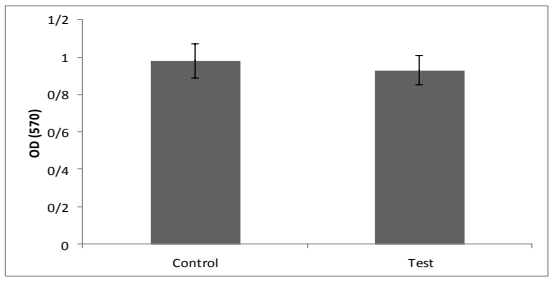


شکل ۱. بررسی فلوسایتومتری. منفی بودن مارکرهای سطحی استرومایی در گروه‌های CD 105 (B) و CD90 (C) نسبت به گروه کنترل (A)

نتایج حاصل از تست MTT: تست MTT جهت ارزیابی تاثیر هیدروژل CH-β-GP-HEC بر میزان حیات سلولی در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. سلول هایی که در داخل چاهک ها بر روی هیدروژل کشت داده شدند میزان OD به میزان ناچیز کاهش یافت. متوسط OD های خوانده شده در طول موج ۵۷۰ نانومتر برای گروه کنترل ۰/۸> و برای گروه کشت داده شده برروی هیدروژل ۰/۸≤ بوده که تفاوت آماری معنی داری را بین دو گروه نشان نمی دهد و تاییدکننده عدم سمیت داربست برای کشت سلولهای بنیادی می باشد(شکل ۳).



شکل ۲. بررسی فلوسایتومتری. منفی بودن مارکرهای سطحی سلول هماتوپوئیتیک در گروه‌های CD 31 (B) و CD45 (C) نسبت به گروه کنترل (A)

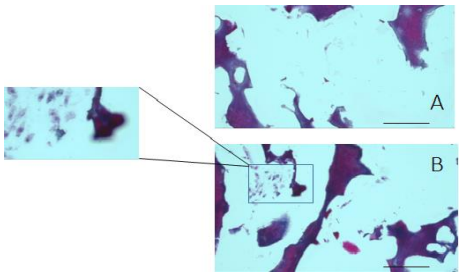


شکل ۳. نتایج تست MTT در ارزیابی بقاء hADSCs کشت داده شده با هیدروژل در روز ۳. (p>۰/۰۵)

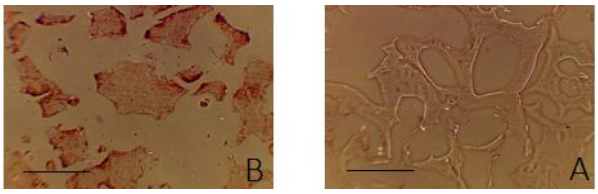
نتایج ارزیابی هیستولوژی و ایمنوهیستولوژی سلول‌های کشت داده شده در محیط تمایزی: ۲۱ روز بعد از شروع تمایز، ظرفیت غضروف‌زایی سلول‌های مزانشیمال در هر دو روش تک لایه و سه بعدی (داربست) از دیدگاه بافتی با رنگ آمیزی تولوئیدن بلو مشخص گردید. در گروه کشت سه بعدی، سلول‌های کروی با هسته بازوفیل شناسایی گردید که مورفولوژی متفاوتی نسبت به کشت تک لایه داشتند. علاوه بر این، ماتریکس خارج سلولی بازوفیل و به میزان زیاد در اطراف سلول ها دیده شد ولی میزان تمایز سلول‌ها و ترشح ماتریکس خارج سلولی در روش کشت تک لایه‌ای بسیار اندک بود. برای نشان دادن وجود پروتئوگلیکان در ماتریکس خارج سلولی، از رنگ آمیزی متاکروماتیک تولوئیدن بلو استفاده شد. رنگ آبی نشانگر متاکروماتیک بودن و حضور ماتریکس غضروفی بود(شکل۴).

برای تایید نتایج بدست آمده آنالیز ایمنوسیتوشیمی برای کلاژن نوع ۲ با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال انجام شد. تفاوت در میزان رنگ سلول‌هایی که با DAB باند شده بودند حاکی از آن بود که سلول‌های موجود در داربست میزان ماتریکس بیشتری را نسبت به سلول‌های با کشت تک لایه و داربست بدون محیط تمایزی ترشح کرده بودند (شکل۵).

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.9.5.5]
[DOI: 10.22088/jbums.18.9.32]



شکل ۴. تشکیل کولونی در سلول‌های غضروفی حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در داربست کیتوسانی در روز ۲۱ (B) و مقایسه آن با گروه کنترل (A). رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو. بزرگنمایی ۴۰×. Bar=20 µ.



شکل ۵. رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی. رنگ قهوه‌ای نشانگر وجود کلاژن نوع ۲ در ماتریکس خارج سلولی می‌باشد که در کشت سه بعدی (داربست) (B) تراکم رنگ بیشتری نسبت به کشت تک‌لایه‌ای (A) مشهود می‌باشد. بزرگنمایی ۴۰×. Bar=20 µ.

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر با استفاده از سلول بنیادی مزانشیمی بافت چربی انسانی، اسکافولد CH-β-GP-HEC یک ساختار سه بعدی مناسب برای رشد و تمایز کندروژنیک سلول بنیادی در محیط In Vitro ایجاد کرد. تعداد سلول‌های بنیادی مزانشیمال در طی روند کندروژنز در محیط invitro و invivo به دلیل آپوپتوز کاهش می یابد (۲۲-۲۰). از طرفی پتانسیل کندروژنز سلول های بنیادی به تراکم بالای سلولی در محیط in vitro و in vivo نیاز دارد (۲۳). با توجه به موارد فوق و نیاز بالای سلول در سلول درمانی، استفاده از سلول بنیادی مزانشیمال نسبت به سلول کندروسیت مناسب تر خواهد بود. در مطالعات زیادی نشان داده شد که سلول هایADSCs توان تکثیری بالا دارند و می توانند به انواع رده های سلولی از جمله کندروسیت ها تمایز یابند. این نوع سلول‌های بنیادی به وفور از بافت چربی با حداقل آسیب می توانند حاصل شوند (۲۴). اگر چه در مطالعاتی هم نشان داده شد سلول هایBMSCs مناسب تر از سلول هایADSCs برای کندروژنز می باشد (۱) ولی مطالعات زیادی نیز نشان دادند که ADSCs از پتانسیل کندروژنی مناسبی بر خوردار هستند (۲۷-۲۵و۸). در سلول درمانی برای ترمیم ضایعات غضروفی امکان استفاده از سوسپانسیون سلولی با محدودیت هایی همراه می باشد. روش هایی که سلول بصورت لوکال به محل ضایعه غضروفی بچسبد کمتر تهاجمی بوده و برای کاربرد بالینی جذابتر می باشد (۲۸). اما با تزریق داخل مفصلی‌سلول مزانشیمال، سلول‌ها به غشاء سینوویال می چسبند و تنها بخش کوچکی از آنها در محل نقص غضروف دیده می شوند. با تزریق سلول بیشتر، سلول های بیشتری به محل نقص غضروف می چسبند، اما تعداد سلول های که به غشاء سینوویال متصل می شوند نیز افزایش می یابند و موجب افزایش خطر ابتلا به تکثیر سینوویوم می شود (۲۸). بنابراین استفاده از داربست برای انتقال سلول به محل آسیب دیده مناسب تر خواهد بود. پلیمرهای طبیعی از قبیل کیتوزان، ماده ای زیست تخریب پذیر و زیست سازگار با میزان تخریب سازمان یافته هستند (۲۹). میزان تخریب پذیری آن به درجه داستیلاسیون بستگی دارد (۳۰). در مطالعه قبلی نشان داده شد که این داربست با جاسازی در داخل بافت کبد بعد از ۱۸۰ روز ، بدون اینکه در مورفولوژی آن تغییری ایجاد گردد، کوچک شد. زمان ژلاتینی شدن محلول داربست-CH-β-GP-HECحدود ۳۰ دقیقه است و این زمان برای سلول درمانی و انتقال دارو به داخل بافت عصبی کافی است (not publish). وارد کردن سلول به داخل ژل زمان ژلاتینی شدن را کاهش می دهد (۳۱). Naderi و همکاران گزارش کردند این زمان برای داربست CH-β-GP-HEC به ۲۰ دقیقه می رسد (۳۲). در هیدروژل ها، اتصالات عرضی، ویسکوزیته محلول را افزایش داده و بدنبال آن دیفوزیون آن کاهش می یابد. در هیدروژل alginate با افزایش دانسیته سلول ویسکوزیته بیشتر می شود. آنها دریافتند اگر چه تراکم سلولی بالا برای سلول درمانی مناسب است، اما با افزایش ویسکوزیته و نیروی مکانیکی باعث آسیب سلول می شود (۳۳). ویسکوزیته هیدروژل می تواند بر روی دیفوزیون آب، رشد سلول، تمایز سلول و آزاد شدن دارو اثر بگذارد (۳۴). داربست CH-β-GP-HECکه به داخل بافت کبدجاسازی شد، مهاجرت و تکثیر سلول های بافت میزبان به داخل داربست گزارش شد و سمیتی هم مشاهده نشد (۱۶). در این مطالعه با انجام تست MTT، میزان زنده ماندن بالای سلول کشت داده شده بر روی داربست CH-β-GP-HEC با و بدون مدیوم تمایزی حاکی از زیست سازگاری بالای مواد داربست در تماس با ADSCs می باشد. برای نشان دادن نفوذ و گسترش سلول در داخل داربست، تجزیه و تحلیل با میکروسکوپ نوری انجام شد. ۲۱ روز بعد از شروع کشت و تمایز، تصاویر هیستولوژی نفوذ بالا و تشکیل کلونی داخل منافذ داربست را نشان داد. GAG یکی از مولکول های ماتریکس غضروفی برای بررسی تمایز غضروفی MSC ارزیابی شد. افزایش GAG در ۲۱ روز بعد از شروع تمایز در مقایسه با کشت تک‌لایه مشاهده شد. نتایج بافت‌شناسی نشان داد سلولهای تمایز یافته مشابه سلول کندروسیت ظاهر گرد داشتند و یک تجمع سلولی را تشکیل دادند. این امر نشان می دهد که سلول ها سالم هستند و به طرف هم حرکت کرده و با هم تعامل خوبی دارند. این مورد به خوبی شناخته شده است که تراکم سلولی درجریان تکوین مفصل در محیط آزمایشگاهی رخ می‌دهد (۶). بنابراین تماس سلول/سلول ممکن است در تمایز کندروژنیک MSCs در این سیستم اهمیت داشته باشد. افزایش ترشح کلاژن نوع ۲ ، ۲۱ روز بعد از کشت سلول در حضور محیط‌کشت تمایزی در سیستم کشت سه بعدی (داربست) با سیستم کشت تک‌لایه (مونولایر) قابل مقایسه بود. ترشح کلاژن ۲ و گلیکوزآمینوگلیکان بیان می‌کند که داربست CH-β-GP-HEC در القاء تمایز کندروژنز پتانسیل بالایی دارد. بخصوص زمانیکه با کشت مونولایر مقایسه می شود. نتایج این تحقیق نشان داد ترکیبات مشابه بافت های بدن که در ساختار داربست بکار می رود به همراه فاکتور های تمایزی وضعیت مطلوبی را برای القاء تمایز کندروژنز سلول ADSCs در مقایسه با کشت مونولایر ایجاد می کند. بنابراین استفاده از داربست های بیومتریال با فاکتور های تمایزی یک ابزار قدرتمند در بهبود پتانسیل کندروژنز می باشد و یک محیط بهتر و بهبود یافته تری برای تمایز کندروژنیک از سلول‌های بنیادی مزانشیمی ایجاد می کند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از ریاست مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی مازندران، تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.9.5.5]
[DOI: 10.22088/jbums.18.9.32]

Growth and Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Adipose Tissue on Chitosan Scaffolds

A.A. Karimpour Malekshah(PhD)[1], F. Talebpour Amiri(PhD)*[1], E. Ghaffari(MSc)[2], A. Alizadeh(PhD)[3], Z. Jamalpoor(PhD)[4], M. Mirhosseini(PhD)[5], A. Esmaeelnejad Moghaddam(PhD)[1], A. Barzegarnejad(MD)[6]

1.Cellular and Molecular Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, I.R.Iran
2.Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, I.R.Iran
3.Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R.Iran
4.Aja University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran
5.Faculty of Nursing and Midwifery, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, I.R.Iran
6.Department of Urology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 18(9); Sep 2016; PP: 32-8
Received: Apr 15th 2016, Revised: Jun 1st 2016, Accepted: Jul 27th 2016.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Treatment of cartilage damage for any reason is associated with temporary relief of joint pain. Providing the possibility of differentiating various stem cells into adult tissues can contribute to recovery and treatment of damaged cartilage tissue in skeletal system. In this study, chondrogenic potential of chitosan scaffold, CH-β-GP-HEC, with stem cells derived from human adipose tissue.

METHODS: In this cross-sectional study, adipose tissue-derived stem cells were separated from abdomen of 15 patients who underwent inguinal hernia repair. 6-7×10^5 cells were cultured in plate one-dimensionally and on chitosan scaffold three-dimensionally for 21 days. MTT assay was run to evaluate the toxic effect of scaffold on cell viability. Proliferation and differentiation of cells were studied in the two types of culture after toluidine blue staining. To confirm the formation of cartilage, expression of collagen type II was assessed by immunohistochemistry.

FINDING: In MTT assay, the average OD for cells cultured on scaffold is higher than 0.8 compared with control group, which confirms the nontoxicity of scaffold for culturing stem cells ($p>0.05$). Chondrogenic differentiation of cells on scaffold shows more glycosaminoglycan deposition in the extracellular matrix compared with one-layer culture. Moreover, in group with three-dimensional culture system, cells were spherical and the morphology of nucleus was different from one-layer culture. Regarding immunohistochemistry results, increased synthesis was observed in collagen type II as chondrogenesis markers in three-dimensional culture system compared with one-layer culture.

CONCLUSION: Results of the study revealed that hydrogel scaffold, CH-β-GP-HEC, with porous structure provides a better environment for the growth of mesenchymal stem cells and their differentiation into cartilage tissue.

KEY WORDS: *Chondrogenesis, Adipose Tissue, Mesenchymal stem cells, Chitosan, Scaffold*

Please cite this article as follows:

Karimpour Malekshah AA, Talebpour Amiri F, Ghaffari E, Alizadeh A, Jamalpoor Z, Mirhosseini M, Esmaeelnejad Moghaddam A, Barzegarnejad A. Growth and Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Adipose Tissue on Chitosan Scaffolds. J Babol Univ Med Sci. 2016;18(9):32-8.

***Corresponding author: F. Talebpour Amiri (PhD)**
Address: Mazandaran University of Medical Sciences, Khazar road, Sari, I.R.Iran
Tel: +98 11 33543088
E-mail: ftaleb2001@yahoo.co.uk

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.9.5.5]
[DOI: 10.22088/jbums.18.9.32]

References

1.Afizah H, Yang Z, Hui JH, Ouyang H-W, Lee E-H. A comparison between the chondrogenic potential of human bone marrow stem cells (BMSCs) and adipose-derived stem cells (ADSCs) taken from the same donors. Tissue Eng. 2007;13(4):659-66..
2.Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. Tissue Engin. 1998;4(4):415-28..
3.Fortier LA. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. Vet Surg. 2005;34(5):415-23.
4.Helder MN, Knippenberg M, Klein-Nulend J, Wuisman PI. Stem cells from adipose tissue allow challenging new concepts for regenerative medicine. Tissue eng. 2007;13(8):1799-808..
5.Gao J, Yao J ,Caplan A. Stem cells for tissue engineering of articular cartilage. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: J Engin Med. 2007;221(5):441-50..
6.Caplan AI. Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. Tissue eng. 2005;11(7-8):1198-211..
7.Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue eng. 2001;7(2):211-28..
8.Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, Gimble JM, Guilak F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. Biomaterials. 2004;25(16):3211-22..
9.Li X, Kong X, Zhang Z, Nan K, Li L, Wang X, et al. Cytotoxicity and biocompatibility evaluation of N, O-carboxymethyl chitosan/oxidized alginate hydrogel for drug delivery application. Int J Biol Macromol. 2012;50(5):1299-305..
10.Molinaro G, Leroux J-C, Damas J, Adam A. Biocompatibility of thermosensitive chitosan-based hydrogels: an in vivo experimental approach to injectable biomaterials. Biomaterials. 2002;23(13):2717-22..
11.Khor E, Lim LY. Implantable applications of chitin and chitosan. Biomaterials. 2003;24(13):2339-49..
12.Lee J-Y, Nam S-H, Im S-Y, Park Y-J, Lee Y-M, Seol Y-J, et al. Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan-based biomaterials. J Control Release. 2002;78(1):187-97..
13.Gao J, Liu R, Wu J, Liu Z, Li J, Zhou J, et al. The use of chitosan based hydrogel for enhancing the therapeutic benefits of adipose-derived MSCs for acute kidney injury. Biomaterials. 2012;33(14):3673-81..
14.Willerth SM, Sakiyama-Elbert SE. Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery. 2008.Available from:
15.https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27050/
16.Reilly GC, Engler AJ. Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. J biomech. 2010;43(1):55-62..
17.Haddad-Mashadrizeh A, Matin MM, Bahrami AR, Edalatmanesh MA, Naderi-Meshkin H, Mousavi S, et al. Cytotoxicity and biocompatibility evaluation of chitosan-beta glycerol phosphate-hydroxyethyl cellulose hydrogel on adult rat liver for cell-based therapeutic applications. International J Biomed Eng Technol. 2013;12(3):228-39.[In Persian]..
18.Naderi H, Matin MM, Bahrami AR. Review Article: Critical issues in tissue engineering: biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems. J Biomater Appl. 2011;26(4):383-417..
19.Ghaffari E, Amiri FT, Malekshah AK, Mirhosseini M, Barzegarnejad A. Comparing the Chondrogenesis Potential of Human Adipose-derived Stem Cells in Monolayer and Micromass Culture Systems. J
20.Mazandaran Univ Med Sci. 2016;25(133):37-47..
21.Lee OK1, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Blood. 2004;103(5):1669-75..
22.Shirasawa S, Sekiya I, Sakaguchi Y, Yagishita K, Ichinose S, Muneta T. In vitro chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells:optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells. J cell biochem. 2006;97(1):84-97..
23.Koga H, Muneta T, Ju YJ, Nagase T, Nimura A, Mochizuki T, et al. Synovial stem cells are regionally specified according to local microenvironments after implantation for cartilage regeneration. Stem Cells. 2007;25(3):689-96..
24.Ichinose S1, Tagami M, Muneta T, Sekiya I. Morphological examination during in vitro cartilage formation by human mesenchymal stem cells. Cell Tissue Res. 2005;322(2):217-26..
25.Yokoyama A, Sekiya I, Miyazaki K, Ichinose S, Hata Y, Muneta T. In vitro cartilage formation of composites of synovium-derived mesenchymal stem cells with collagen gel. Cell Tissue Res. 2005;322(2):289-98..
26.Focaroli S, Teti G, Salvatore V, Durante S, Belmonte MM, Giardino R, et al. Chondrogenic differentiation of human adipose mesenchimal stem cells: influence of a biomimetic gelatin genipin crosslinked porous scaffold. Micros Res Tech. 2014;77(11):34-928..

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.9.5.5]
[DOI: 10.22088/jbums.18.9.32]

27.Dragoo JL, Lieberman JR, Lee RS, Deugarte DA, Lee Y, Zuk PA, et al. Tissue-engineered bone from BMP-2–transduced stem cells derived from human fat. Plastic Reconstruct Surg. 2005;115(6):1665-73..

28.Lee HJ, Choi BH, Min BH, Park SR. Changes in surface markers of human mesenchymal stem cells during the chondrogenic differentiation and dedifferentiation processes in vitro. Arthritis Rheum. 2009;60(8):2325-32..

29.Guilak F, Estes BT, Diekman BO, Moutos FT, Gimble JM. 2010 Nicolas andry award: multipotent adult stem cells from adipose tissue for musculoskeletal tissue engineering Clin Orthop Relat Res. 2010;468(9):2530-40..

30.Koga H, Shimaya M, Muneta T, Nimura A, Morito T, Hayashi M, et al. Local adherent technique for transplanting mesenchymal stem cells as a potential treatment of cartilage defect. Arthritis Res Thera. 2008;10(4):1-10..

31.Costa-Pinto AR, Reis RL, Neves NM. Scaffolds based bone tissue engineering: the role of chitosan. Tissue Eng Part B Rev. 2011;17(5):331-47..

32.Chatelet C, Damour O, Domard A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. Biomaterials. 2001;22(3):261-8.

33.Cheng S, Clarke EC, Bilston LE. Rheological properties of the tissues of the central nervous system: a review. Med Engin phys. 2008;30(10):1318-37..

34.Naderi-Meshkin H, Andreas K, Matin MM, Sittinger M, Bidkhori HR, Ahmadiankia N, et al. Chitosan-based injectable hydrogel as a promising in situ forming scaffold for cartilage tissue engineering. Cell Biol Inter. 2014;38(1):72-84..

35.Schuetz YB, Gurny R, Jordan O. A novel thermoresponsive hydrogel based on chitosan. Eur J Pharma Biopharmaceutics.2008;68(1):19-25..

36.Yao K, Li J, Yao F, Yin Y. Chitosan-based hydrogels: functions and applications: CRC Press; 2011.Available from: https://www.crcpress.com/Chitosan-Based-Hydrogels-Functions-and-Applications/Yao-Li-Yao-Yin/p/book/9781439821145.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.9.5.5]
[DOI: 10.22088/jbums.18.9.32]