DOI: 10.22034/jar.2024.4082.1948 مقاله پژوهشی، صفحات۴۷-۳۲

بررسی زیستایی و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت شده بر روی لایه پوششی مشتق از عضله‌ی قلبی

زهرا محمدیان[۱]، محمود تلخابی[۱*]، سارا رجبی[۲]، سعیده عرفانیان[۳] و لاله مودتیان[۱]

[۱] ایران، تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، گروه علوم جانوری و زیست شناسی دریا

[۲] ایران، تهران، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و فناوری سلولهای بنیادی جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات علـوم سلولی، گـروه مهندسی سلول

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۱۸

چکیده

درمان نقایص استخوانی به دلیل ترکیب، ساختار و عملکردهای پیچیده استخوان، بسیار چالش برانگیز است. مهندسی بافت رویکرد جدیدی برای درمان آسیب‌های استخوانی می‌باشد که در آن از مواد زیستی مناسب در محل آسیب استفاده می‌شود. در این مطالعه، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان (Bone marrow Mesenchymal Stem Cells; BMSCs) از استخوان ساق و ران رت، استخراج و در محیط αMEM کشت شدند. سپس مورفولوژی، مارکرهای سطحی و تمایز به استخوان و چربی مورد ارزیابی قرار گرفت. بافت قلب گوسفند، قطعه قطعه و با SDS ۱٪ سلول‌زدایی شد و سپس بوسیله رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی بافتی (هماتوکسیلین ائوزین، ماسون تری‌کروم، DAPI و آلسین بلو) بررسی شد. از بافت عضله قلبی سلول‌زدایی‌شده، کاردیوژل تهیه و سپس بستر پوششی دو بعدی مشتق از کاردیوژل ایجاد شد. به‌منظور بررسی زیستایی، تکثیر و تمایز به استخوان، BMSCs بر روی غلظت‌های مختلف (۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۸) این بستر پوششی، کشت شدند (از بستر پوششی کاردیوژلی به‌عنوان گروه آزمایش، بستر پوششی ژلاتینی به‌عنوان گروه کنترل مثبت و بستر فاقد هرگونه پوشش به‌عنوان گروه کنترل منفی استفاده شد). افزایش زیستایی، تکثیر و تمایز BMSCs در ظروف کشت حاوی کاردیوژل مشاهده شد. طبق نتایج حاصل از بررسی زیستایی سلول‌ها، با افزایش غلظت کاردیوژل، رشد و عملکرد سلول‌ها افزایش یافت؛ هرچند از نظر آماری معنادار نبود. نتایج این مطالعه نشان داد که کاردیوژل می‌تواند به‌عنوان یک بستر پوششی دو بعدی در کشت سلول استفاده شود و ریزمحیطی شبیه به درون بدن را فراهم کند.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، زیستایی، تکثیر، تمایز استخوانی، سلول‌زدایی، کاردیوژل

* نویسنده مسئول، تلفن: ۲۲۴۳۵۹۰۹، پست الکترونیکی: m_talkhabi@sbu.ac.ir

مقدمه

بروز اختلالات و بیماری‌های مربوط به استخوان، در سراسر جهان، به‌ویژه در جمعیت‌هایی که افزایش سن با افزایش چاقی و کاهش فعالیت بدنی همراه است، به‌شدت افزایش یافته است [۲]. استخوان یک اندام خودترمیم‌شونده است که به‌طور مداوم ساختار خود را بازسازی می‌کند. با این حال، استخوان قادر به ترمیم صدمات وخیم و حاد نیست و از این رو، جراحی و کاشت جایگزین‌های استخوانی مورد نیاز است. در مهندسی بافت از ترکیب داربست، سلول و مولکول‌های زیستی فعال برای ساخت بافتی به منظور بازسازی یا حفظ عملکرد بافت آسیب‌دیده یا حتی ایجاد یک

DOI: 10.22034/jar.2024.4082.1948 مقاله پژوهشی، صفحات۴۷-۳۲

اندام در آزمایشگاه استفاده می‌شود. هدف مهندسی بافت استخوان (Bone tissue engineering)، ترمیم و بازسازی استخوان و ایجاد بافت جدید استخوانی است [۱, ۶]. در درمان جراحت‌های شدید استخوانی، از پیوند استخوان استفاده می‌شود، اما مهندسی بافت رویکرد مناسب‌تری است؛ به این دلیل که در آن آسیب‌های استخوانی با فرآیند ترمیم بافت خودِ بیمار بازسازی می‌شود [۹]. در مهندسی بافت استخوان، ساختار، مکانیک و بافت استخوان مطالعه می‌شود و برای موفقیت کامل در ترمیم استخوان، دانش و اطلاعات مربوط به تکوین و رشد استخوان بسیار ضروری است. مهندسی بافت و سلول‌درمانی برای ترمیم آسیب‌های استخوانی با هم ترکیب شده‌اند. سلول‌های بنیادی، سلول‌هایی هستند که در ارگان‌های مختلف بدن یافت می‌شوند و به ترمیم آن بافت یا ارگان کمک می‌کنند. این سلول‌ها قابلیت جداسازی از ارگان‌ها را داشته و می‌توانند در شرایط برون‌تنی (In vitro) کشت و نگهداری شوند و در مواقع نیاز به سلول‌های خاصی تمایز داده شوند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs= Mesenchymal Stem Cells) و بویژه MSCs مشتق از مغز استخوان (BMSCs= Bone Marrow- derived Mesenchymal Stem Cells)، ظرفیت تکثیری بالا و توانایی خودتجدیدی دارند و می‌توانند به رده‌های سلولی مزودرمی که شامل استخوان، غضروف و بافت چربی است، تمایز پیدا کنند [۸, ۲۲]. علاوه‌براین، فاکتورهای زیستی محلولی را آزاد می‌کنند که می‌توانند تنظیم‌کننده‌ی سیستم ایمنی باشند. این عملکرد، فرآیند ترمیم در بافت آسیب‌دیده را بهبود می‌بخشد [۱۳]. شناخت نقش سلول‌های بنیادی در برخی بیماری‌ها، استفاده از BMSCs را در پزشکی بازساختی افزایش داده است. این سلول‌ها را می‌توان از چندین منبع بافتی مانند مغز استخوان، پریوستوم، بافت چربی، پالپ دندان و بند ناف به‌دست آورد. MSCs جدا شده از این بافت‌ها را می‌توان در شرایط آزمایشگاهی کشت داد و در آزمایش‌های بالینی به‌کار برد و در بسیاری از موارد طول عمر بیمار را با عوارض جانبی نامطلوب بسیار کمی افزایش داد. مطالعات، اثربخشی استفاده از این سلول‌ها در بازسازی استخوان در مدل‌های حیوانی را نشان می‌دهند [۱۰]. تمایز استخوانی MSCs فرآیند پیچیده‌ای است که در آن عوامل محیطی مختلفی دخیل هستند. دگزامتازون، اسید اسکوربیک و بتاگلیسرول‌فسفات‌ها رایج‌ترین مواد شیمیایی مورد استفاده هستند که تمایز MSCs را در شرایط آزمایشگاهی افزایش می‌دهند. ماتریکس خارج سلولی (ECM= Extracellular matrix) یک جزء غیرسلولی حائز اهمیت در ریزمحیط بافت است که از شبکه‌ای از ماکرومولکول‌ها شامل پلی‌ساکارید گلیکوزآمینوگلیکان‌ها (GAGs=Glycosaminoglycans) و پروتئین‌هایی مانند کلاژن‌ها، لامینین‌ها و فیبرونکتین تشکیل شده است. ECM که پس از سلول‌زدایی باقی می‌ماند، نقش مهمی به‌عنوان پشتیبان برای بافت و همچنین منبعی از سیگنال‌های بیوشیمیایی و بیوفیزیکی برای سلول‌های ساکن در آن ایفا می‌کند. ECM از طریق این دو نقش، تکثیر، مهاجرت، تمایز و رفتار سلولی را هدایت می‌کند [۷]. هیدروژل (Hydrogel) یک شبکه سه بعدی آب‌دوست است که می‌تواند هم از پلیمرهای طبیعی و هم از پلیمرهای مصنوعی تولید شود [۳]. هیدروژل‌ها به‌عنوان بیومواد چندکاره به‌دلیل ترکیب منحصربه‌فرد و خواص مشابه با ECMهای طبیعی، مانند محتوای آب بالا، زیست‌تخریب‌پذیری، تخلخل و زیست‌سازگاری، در مهندسی بافت و سلول‌درمانی کاربرد دارند [۱۶]. ترکیب، ساختار، خواص مکانیکی و خواص بیوشیمیایی هیدروژل‌ها برای کاربردهای مختلف زیست‌پزشکی مورد نظر به راحتی قابل تنظیم است. هیدروژل‌ها قادرند سلول‌ها را محصور کنند و از آن‌ها در برابر سلول‌های ایمنی محافظت کنند. علاوه‌براین، با استفاده از هیدروژل می‌توان فاکتورهای رشد را کپسوله کرد تا امکان

DOI: 10.22034/jar.2024.4082.1948 مقاله پژوهشی، صفحات۴۷-۳۲

انتقال آن‌ها به‌تدریج و به شیوه‌ای کنترل‌شده فراهم شود. کاردیوژل (Cardiogel) یک داربست طبیعی و ناهمگن ECM است که از فیبروبلاست‌های قلبی کشت‌شده در شرایط آزمایشگاهی، یا بافت سلول‌زدایی‌شده‌ی قلب به‌دست می‌آید. کاردیوژل برای بهبود رشد و بلوغ کاردیومیوسیت شناخته شده است. طبق مطالعات انجام‌شده، BMSCs که روی ECM ترشح‌شده خودشان کشت می‌شوند، در برابر استرس اکسیداتیو یا تمایز قلبی‌عروقی محافظت نمی‌شوند؛ اما تکثیر، چسبندگی سلولی و تمایز قلبی BMSCs کشت‌شده روی کاردیوژل افزایش می‌یابد و آن‌ها در برابر استرس اکسیداتیو محافظت می‌شوند. در مطالعه‌ی حاضر با استفاده از روشی ساده، بستر پوششی دو بعدی کاردیوژل و ژلاتین به‌منظور ارزیابی و مقایسه‌ی زیستایی، تکثیر و تمایز استخوانی MSCs ایجاد شده است و کاربرد بالقوه‌ی کاردیوژل در مهندسی بافت استخوان مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

سلول‌زدایی از بافت عضله قلبی: تعداد ۳ عدد قلب تازه که از گوسفندهای سالم و بالغ به دست آمده بودند و مورد تایید دامپزشک بودند از کشتارگاه تهیه شدند. قلبها و در شرایط خنک در محلول فسفات بافرسالین (PBS= Phosphate buffered salin1e) به آزمایشگاه منتقل گردید. سپس چربی‌های اضافی جدا و قلب به قطعات یک سانتی‌متری بریده شد. قطعات به مدت ۵ ساعت در آب دو بار تقطیر شده قرار گرفتند و ۵ بار آب دو بار تقطیر شده تعویض شد. قطعات قلب به محلول سدیم دودسیل سولفات (SDS= Sodium dodecyl sulfate) ۱٪ انتقال داده شدند و به مدت سه روز بر روی استیرر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. هر ۲۴ ساعت یکبار محلول SDS تعویض شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در محلول تریتون x-100 ۱٪ قرار گرفتند تا فرایند سلول‌زدایی تکمیل گردد. سپس بافت سلول‌زدایی‌شده در آب دو بار تقطیر به مدت ۴۸ ساعت شستشو داده شد تا کاملا SDS حذف شود [۱۵].

ارزیابی بافت‌شناسی بافت عضله‌ی قلبی سلول‌زدایی‌شده: رنگ‌آمیزی برای بافت قلب در دو حالت طبیعی و سلول‌زدایی‌شده، انجام شد. نمونه‌هایی از بافت طبیعی ابتدا با PBS دو مرتبه شست و شو داده شده و سپس در محلول پارافرمالدهید ۴ درصد فیکس شدند. در مرحله‌ی بعد، نمونه‌ها در دستگاه آماده‌سازی بافتی، آب‌زدایی شده و در پارافین قرار گرفتند. سپس از قالب‌های پارافینی برش‌های ۶µm تهیه شد. این برش‌ها با پلی‌ال‌لیزین (Polylysine) روی اسلایدهای شیشه‌ای چسبانده شدند. در مرحله‌ی بعد، در زایلل پارافین‌زدایی، و با هماتوکسیلین ائوزین (H&E= Hematoxylin-eosin)، ماسون تری‌کروم (MT= Masson’s trichrome)، DAPI= 4’,6-diamidino-2-phenylindole) و آلسین بلو (AB= Alcine blue) رنگ‌آمیزی شدند.

تهیه‌ی کاردیوژل از بافت عضله‌ی قلبی سلول‌زدایی‌شده: بافت قلب سلول‌زدایی‌شده، ابتدا توسط خشکایش انجمادی، پودر و سپس در استیک‌اسید ۰/۵ مولار حاوی ۰/۱٪ پپسین به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد استیرر شد و پس از اطمینان از هضم کامل بافت، به وسیله‌ی NaOH ۲ مولار خنثی و در یخچال نگهداری شد.

استخراج و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق مغز استخوان (BMSCs): استخراج BMSCs براساس پروتوکل استاندارد بهینه شده در آزمایشگاه انجام شد [۸]. به این صورت که ابتدا رت های بالغ نژاد ویستار (Wistar) با استفاده از کلروفورم بیهوش و سپس نخاعی شدند. سپس استخوان ساق و ران جداشده و عضله و بافت همبند اطراف آن‌ها پاک شد. استخوان‌ها درون ظرف محتوی PBS قرار

DOI: 10.22034/jar.2024.4082.1948 مقاله پژوهشی، صفحات۴۷-۳۲

داده شده و به زیر هود منتقل شدند. استخوان‌ها با الکل اتانول ۷۰٪ شسته شده و سپس مجددا به ظرف محتوی PBS استریل منتقل شدند. دو سر هر استخوان توسط قیچی مخصوص برش استخوان، قطع و سپس سرنگی حاوی محیط کامل (Alpha MEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاو (Fetal bovine serum; FBS) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین ((Penicillin-Streptomycin; Pen/Strep)) وارد حفره مرکزی استخوان‌ها شد و مغز استخوان به درون فلاسک تخلیه، و به آن محیط کامل اضافه شد و فلاسک درون انکوباتور (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و غلظت ۵٪ CO2) قرار داده شد. پس از گذشت ۷۲ ساعت محیط رویی خارج و کف ظرف توسط PBS منفی شستشو داده شد تا سلول‌های خونی خارج شوند و فقط BMSCs که به کف ظرف چسبیده‌اند، باقی بمانند. سپس محیط کامل، به ظرف اضافه شد. پس از پر شدن ۸۰-۹۰ درصد کف فلاسک توسط BMSCs، پاساژ سلولها با استفاده از تریسپین انجام شد. به این منظور فلاسک از انکوباتور خارج و به زیر هود منتقل و محیط رویی خارج گردید. توسط PBS منفی، یک مرتبه شستشو داده شد و به ازای هر فلاسک T25 مقدار ۱ میلی‌لیتر تریپسین ۰/۰۵٪ اضافه گردید و به‌منظور کنده شدن سلول‌ها از کف ظرف، به مدت سه دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. سپس فلاسکها توسط میکروسکوپ بررسی شد تا از کنده شدن سلول‌ها از کف فلاسک اطمینان حاصل شود و به زیر هود منتقل و جهت جداسازی بیشتر سلول‌ها، به وسیله‌ی سمپلر پیپتاژ انجام شد. برای خنثی کردن تریپسین، ۱ میلی‌لیتر محیط کامل به سلول‌ها اضافه و مجددا جهت یکنواختی سلول‌ها پیپتاژ انجام شد. سلول‌های کنده شده از کف فلاسک، به سه فلاسک دیگر انتقال داده شدند و به آن‌ها محیط کامل اضافه شد و در انکوباتور قرار گرفتند.

تعیین هویت BMSCs استخراج‌شده: هویت BMSCs براساس مورفولوژی، توانایی در چسبیدن به کف ظروف کشت، بیان مارکرهای مثبت (مارکرهای سطح سلولی CD44 و CD90)، عدم بیان مارکرهای منفی (مارکرهای سطح سلول‌های خونساز CD45 و CD34) و توانایی تمایز به سلول‌های استخوانی و سلول‌های چربی تایید شد.

ارزیابی زیستایی سلول‌های کشت‌شده روی بستر کاردیوژل: این مطالعه شامل سه گروه آزمایشی بود: ۱) گروه آزمایش که در آن چاهک‌ها توسط غلظت‌های مختلف کاردیوژل (غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۸) پوشیده شدند، ۲) گروه کنترل مثبت که برای پوشش کف چاهک‌ها از ژلاتین یک درصد استفاده شد، ۳) گروه کنترل منفی که چاهک‌ها با هیچ ماده‌ایی پوشیده نشدند. برای ارزیابی زیستایی سلول‌ها، ۳×۱۰^{۳} سلول در پاساژ اول در هر چاهک از پلیت ۹۶ چاهکی پوشیده با غلظتهای مختلف کاردیوژل، ژلاتین (کنترل مثبت) و بدون پوشش (کنترل) کشت شد. سپس ۵ میلی‌گرم از پودر (MTT=(3-[4,5-dimethylthiazol-2- yl]- 2, 5diaphenyl tetrazolium bromide) در ۱ میلی‌لیتر محیط کامل حل و به فالکون محتوی ۹ میلی‌لیتر محیط، اضافه و پیپتاژ شد. به هر چاهک از پلیت ۹۶ چاهکی حاوی سلول کشت شده بر روی بستر کاردیوژل، ژلاتین و بدون پوشش، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT اضافه و به مدت ۲ الی ۳ ساعت درون انکوباتور قرار داده شد. سپس محیط رویی خارج و به هر چاهک ۱۰۰ میلی‌لیتر (DMSO= Dimethylsulfoxide) اضافه شد. پس از حل شدن بلورهای فورمازان (Formazan) و مشاهده تغییر رنگ، جذب آن‌ها توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد.

بررسی چرخه‌ی سلولی BMSCs کشت‌شده روی بستر پوششی: برای این‌منظور، ۳×۱۰^{۴} سلول در پاساژ اول در چاهک‌های یک پلیت شش چاهکی در سه گروه بستر پوششی کاردیوژل، بستر ژلاتین و بستر بدون پوشش، کشت

DOI: 10.22034/jar.2024.4082.1948 مقاله پژوهشی، صفحات۴۷-۳۲

شدند. پس از ۷۲ ساعت محیط رویی چاهک‌ها خارج و به سلول‌ها تریپسین ۱٪ اضافه شد. پس از اطمینان از کنده شدن سلول‌ها، برای خنثی کردن تریپسین، محیط کامل به آن‌ها اضافه شد. سلول‌های کنده شده از کف چاهک‌ها در سه گروه به سه فالکون ۱۵ انتقال داده شدند و در سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰ در دقیقه (RPM= Revolutions per minute) قرار گرفتند. پس از پایان مرحله‌ی سانتریفیوژ، محیط رویی از فالکون‌ها خارج و محیط کامل جدید به سلول‌ها اضافه شد و آن‌ها در شرایط خنک برای خوانش، به شرکت بافت آزما منتقل شدند. سپس سلول‌ها یک بار با استفاده از PBS شستشو داده شدند و با استفاده از اتانول ٪۷۰ سرد به مدت ۳۰ دقیقه تثبیت شدند. سپس سلول‌ها با دو بار و با استفاده از PBS شستشو داده شدند. سپس سلول‌های هر گروه به مدت ۵ دقیقه با استفاده از ۵۰ میکرولیتر RNase (از استوک ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر) تیمار شدند و سپس رنگ (PI= Propidium Iodide) (از استوک ۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) به سلول‌ها اضافه شد. برای بررسی پروفایل چرخه سلول، سلول‌ها توسط دستگاه فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفتند.

ترسیم منحنی رشد BMSCs کشت شده روی بستر پوششی کاردیوژل: برای این‌منظور، ۳×۱۰^{۴} سلول در پاساژ اول در هر چاهک از سه پلیت شش چاهکی حاوی بستر پوششی کاردیوژل، بستر ژلاتین و بدون پوشش، کشت و به مدت شش روز در انکوباتور نگهداری و روزانه به کمک لام نئوبار شمارش شدند. به‌منظور شمارش، پس از تریپسینه کردن سلول‌ها و اضافه کردن محیط کامل برای خنثی‌سازی تریپسین، مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی همگن بین لامل و لام نئوبار به آرامی انتقال داده شد. سپس بوسیله‌ی میکروسکوپ معکوس، تعداد سلول‌ها در ۴ مربع در لام نئوبار شمارش و میانگین تعداد سلول‌ها در $۱۰^{۴}$ ضرب شد. بدین‌صورت تعداد سلول‌ها در ۱میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی به‌دست آمد. محیط کشت چاهک‌ها هر دو روز یکبار تعویض شد.

بررسی زمان دو برابر شدن تعداد BMSCs کشت شده روی بستر پوششی کاردیوژل: برای این‌منظور، تعداد ۳×۱۰^{۴} سلول در پاساژ اول در هر چاهک از سه پلیت شش چاهکی حاوی بستر پوششی کاردیوژل، بستر ژلاتین و بدون پوشش، کشت و به مدت شش روز در انکوباتور نگهداری شد. سلول‌ها در روز اول و روز ششم کشت، شمارش شدند و تعداد آن‌ها، در فرمول (2(log) increase+1(log=time (Doubling قرار گرفت و زمان دو برابر شدن سلول‌ها در هر گروه محاسبه شد.

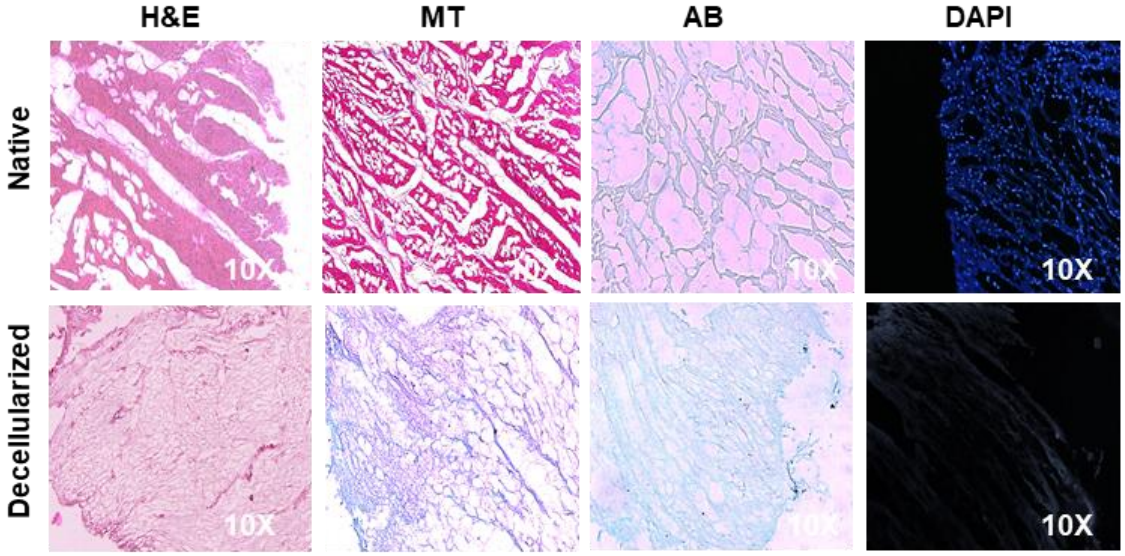
بررسی تمایز استخوانی BMSCs کشت‌شده روی بستر پوششی کاردیوژل: سلول‌ها در پاساژ سوم در چاهک‌های پلیت شش چاهکی پوشش‌داده شده با کاردیوژل، ژلاتین و بدون پوشش، کشت داده شدند. هر سه روز یکبار محیط تمایزی استخوان چاهک‌ها تعویض شد. روز بیست و یکم، محیط کشت از هر چاهک خارج و ۳ بار با PBS 1X به آرامی شستشو داده شد. سپس سلول‌ها با فرمالدهید ۴ درصد برای ۱۵ دقیقه در دمای اتاق فیکس شدند. سپس فیکساتیوخارج و ۳ بار با آب مقطر شستشو داده شد و سلول‌ها توسط آلیزارین رد (Alizarin red) رنگ‌آمیزی شدند.

آنالیز آماری: در این مطالعه از شاخص‌های میانگین و انحراف معیار برای نشان دادن توزیع داده‌ها و همچنین جمع‌بندی آن‌ها استفاده گردید. نتایج حاصل با استفاده از تست‌های آماری T-test و one way ANOVA و در سطح معناداری P value < ۰,۵ مورد بررسی قرار گرفت و جهت رسم نمودار زیستایی، از نرم افزار GraphPad prism 9 استفاده شد.

مقاله پژوهشی، صفحات۴۷-۳۲ DOI: 10.22034/jar.2024.4082.1948

نتایج

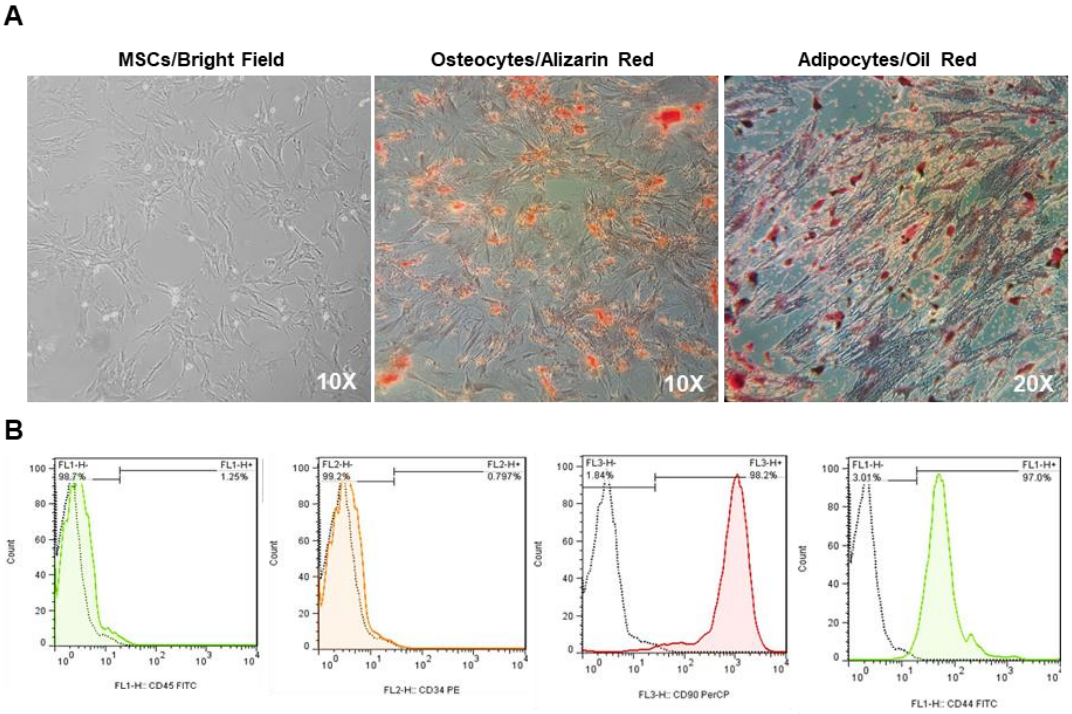
تایید سلول‌زدایی صحیح بافت عضله قلبی: به‌منظور اثبات سلول‌زدایی، ارزیابی‌های بافت‌شناسی انجام شد. نتایج به دست آمده از رنگ‌آمیزی MT نشان‌دهنده وجود کلاژن در ECM هر دو بافت طبیعی و بافت سلول‌زدایی‌شده است. نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی AB نیز نشانگر وجود گلیکوزآمینوگلیکان‌ها هم در بافت طبیعی و هم در بافت سلول‌زدایی‌شده می‌باشد. علاوه بر این، عدم وجود هسته‌های سلولی در بافت سلول‌زدایی‌شده نیز توسط رنگ‌آمیزی DAPI اثبات گردید (شکل ۱).



شکل ۱- رنگ‌آمیزی‌های بافتی بافت طبیعی و سلول‌زدایی‌شده‌ی قلب. مقایسه‌ی رنگ‌آمیزی H&E و DAPI بافت طبیعی و سلول‌زدایی‌شده نشان می‌دهد که سلول‌ها و هسته‌ی آن‌ها در پروسه‌ی سلول‌زدایی از بین رفته‌اند. رنگ‌آمیزی MT و AB نشان‌دهنده‌ی باقی ماندن کلاژن و گلیکوزآمینوگلیکان بعد از سلول‌زدایی است (بزرگنمایی کلی: ۱۰۰).

تایید هویت مزانشیمی BMSCs: کشت اولیه مغز استخوان رت حاوی سلول‌هایی بود که اکثر آن‌ها دارای مورفولوژی فیبروبلاستی یا دوکی‌شکل و برخی شناور بودند. سلول‌های شناور طی پاساژهای سلولی بعدی حذف شدند و سلول‌های فیبروبلاست‌شکل چسبنده، مورفولوژی خود را حفظ کردند و کف ظرف باقی ماندند (شکل ۲-A). این موضوع نشانگر ماهیت مزانشیمی سلول‌ها می‌باشد. نتایج نشان داد که ۹۷٪ سلول‌ها مارکر سطحی CD44 و ۹۸/۲٪ سلول‌ها مارکر سطحی CD90 را بیان کردند؛ درحالی که ۹۹/۲٪ سلول‌ها و ۹۸/۷٪ سلول‌ها به ترتیب مارکر سطحی CD45 و CD34 (مارکرهای سلول‌های خونی) را بیان نکردند (شکل ۲-B). بر این اساس، ماهیت مزانشیمی سلول‌ها تایید گردید. تمایز به سمت سلول‌های استخوانی توسط رنگ‌آمیزی آلیزارین رد و سلول‌های چربی توسط رنگ‌آمیزی اویل رد (Oil red) انجام گرفت (شکل ۲-A). این دو نوع تمایز به عنوان روش دیگری در جهت روشن کردن ماهیت MSCs در نظر گرفته شد.

مقاله پژوهشی، صفحات۴۷-۳۲ DOI: 10.22034/jar.2024.4082.1948



شکل ۲- A) مورفولوژی MSCs استخراج شده از مغز استخوان رت (بزرگنمایی کلی: ۱۰۰) و تمایز MSCs به سلول‌های استخوان و سلول‌های چربی (بزرگنمایی کلی: ۲۰۰). B) میزان بیان مارکرهای سطحی در BMSCs. این سلول‌ها فاقد مارکر اختصاصی هستند. ازاین‌رو برای شناسایی آن‌ها، مارکرهای مثبت و منفی در نظر گرفته شد. این سلول‌ها مارکرهای CD44 و CD90 را به میزان بالا بیان می‌کنند؛ درحالی‌که درصد بسیار کمی از آن‌ها، مارکرهای سلول‌های خونی اعم از CD45 و CD34 را بیان می‌کنند.

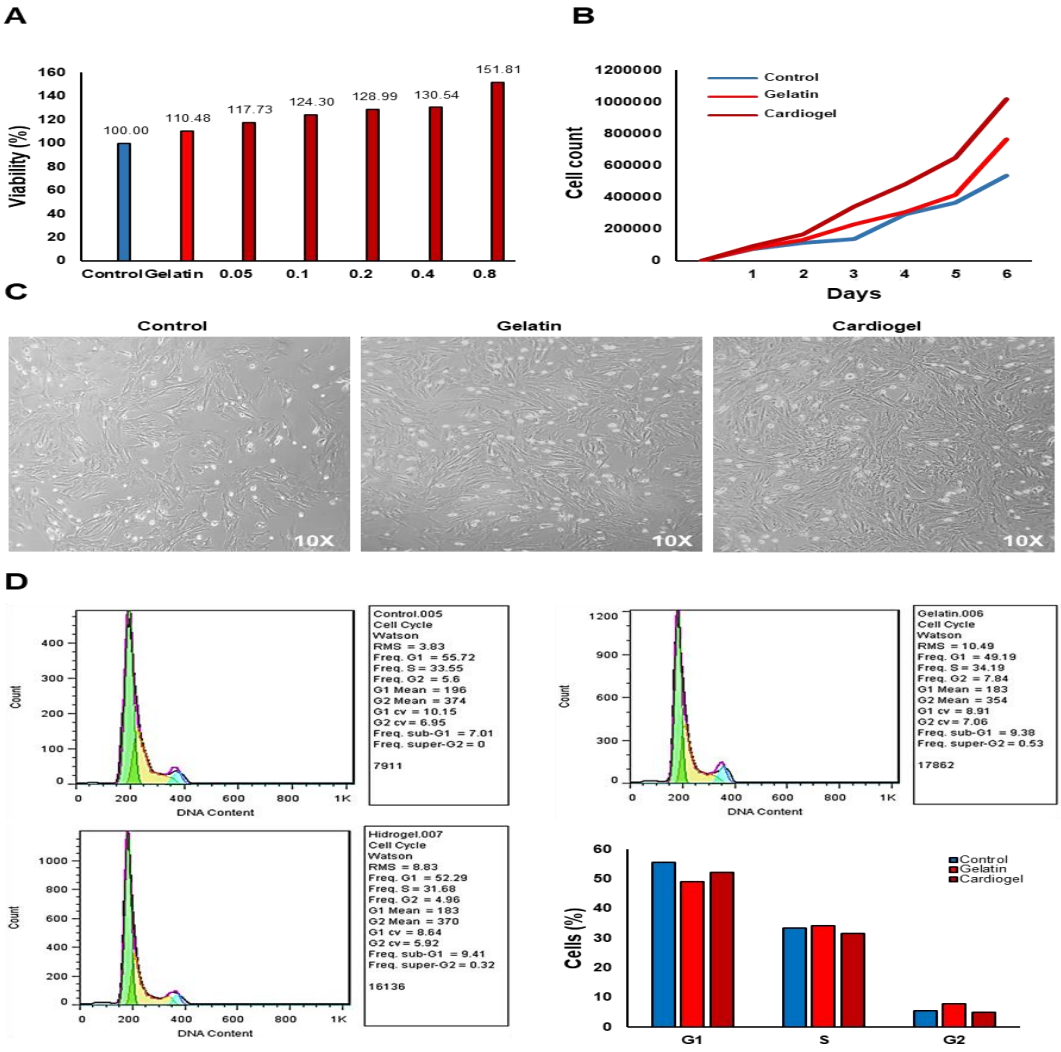
افزایش زیستایی BMSCs کشت‌شده روی کاردیوژل: سلول‌ها روی غلظت‌های مختلف (۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۸) از بستر پوششی کاردیوژل کشت شدند پس از ۷۲ ساعت برای بررسی میزان زیستایی، با استفاده از آزمون MTT مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس نمودار میزان زیستایی با نرم‌افزار Prism رسم شد. همانطور که در نمودار مشخص است، میزان زیستایی در گروه بستر پوششی کاردیوژل بیشتر از گروه‌های بستر ژلاتین و کنترل است. هرچند این اختلاف از لحاظ آماری معنادار نبود (P ۰/۳ value=) (شکل ۳-A).

افزایش سرعت تکثیر BMSCs کشت شده روی کاردیوژل: برای بررسی اثر بستر پوششی کاردیوژل بر رشد BMSCs منحنی رشد سلول ترسیم شد. مورفولوژی سلول‌ها نمایانگر روند صعودی رشد در بستر پوششی کاردیوژل بود. پس از پایان شمارش روزانه و ثبت نتایج، با استفاده از نرم افزار Prism، نمودار نقطه‌ای از روند رشد سلول‌ها رسم شد. در این نمودار، در گروه کاردیوژل، میزان رشد سلول‌ها، بیشترین افزایش را داشت؛ افزایش رشد سلول‌ها در گروه ژلاتین بیشتر از گروه کنترل، و در گروه کاردیوژل نسبت به گروه ژلاتین بالاتر بود. هرچند این اختلاف از لحاظ آماری معنادار نبود (P value=۰/۴) (شکل ۳-C,B).

بررسی پروفایل چرخه‌ی سلولی BMSCs کشت‌شده روی کاردیوژل: به منظور بررسی چرخه‌ی سلولی، BMSCs در چاهک‌های پلیت شش چاهکی، در سه گروه مختلف بستر پوششی کاردیوژل، بستر ژلاتین و بستر بدون پوشش کشت شدند. ۴۸ ساعت پس از کشت، سلول‌های گروه بستر

مقاله پژوهشی، صفحات۴۷-۳۲ DOI: 10.22034/jar.2024.4082.1948

پوششی کاردیوژل موفولوژی خود را حفظ کردند و بیشترین تراکم سلولی را داشتند. در این بررسی درصد BMSCs در فازهای مختلف سلولی S، G1 و G2 مورد ارزیابی قرار گرفت. بیشترین درصد سلول‌ها در فاز S و G2 در گروه ژلاتین و بیشترین درصد سلول در فاز G1 در گروه کنترل نشان داده شد (شکل ۳-D).



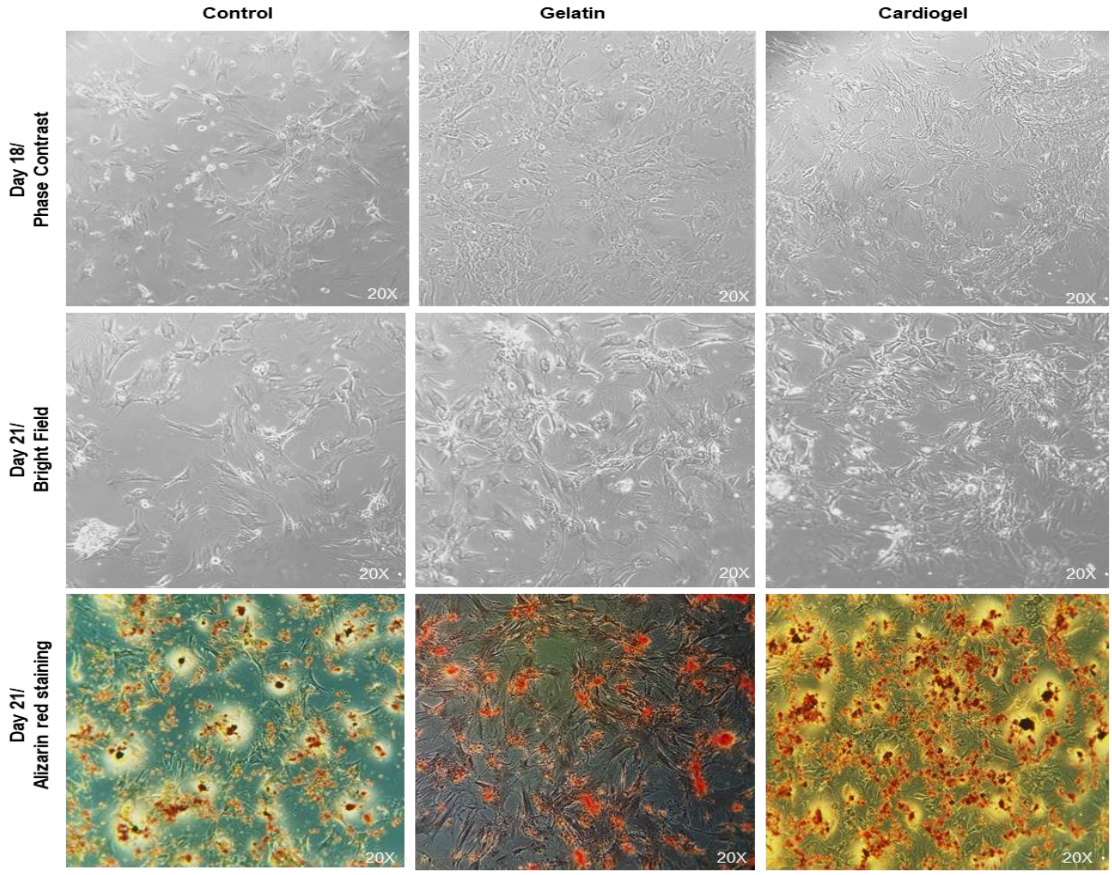
شکل ۳- A) نمودار زنده‌مانی MSCs در غلظت‌های مختلف از بستر پوششی کاردیوژل (n=3, P value= 0.3). B) منحنی رشد BMSCs بر روی بسترهای بدون پوشش، ژلاتین و کاردیوژل (n=3, p value= 0.4). C) مورفولوژی BMSCs در روز چهارم شمارش سلولی در منحنی رشد سلول بر روی بسترهای بدون پوشش، ژلاتین و کاردیوژل (بزرگنمایی کلی: ۱۰۰). D) نمودار چرخه سلولی MSCs کشت شده بر روی بستر بدون پوشش، بستر ژلاتین، بستر پوششی کاردیوژل و مقایسه‌ی چرخه سلولی گروه‌های مختلف.

کاهش زمان دوبرابر شدن جمعیت BMSCs کشت‌شده روی کاردیوژل: برای محاسبه‌ی زمان دوبرابر شدن جمعیت BMSCs، از فرمول (2(log) increase+1(log=time Doubling) استفاده شد. طبق این فرمول سلول‌های گروه بستر بدون پوشش در طول مدت ۶ روز، ۱۷/۵ برابر شدند و زمان دوبرابر شدن آن‌ها ۳۵ ساعت محاسبه شد. همچنین سلول‌های گروه بستر ژلاتین در ۶ روز، ۲۶/۱ برابر شدند و زمان دو برابر شدن آن‌ها، ۳۰ ساعت و گروه بستر پوششی

مقاله پژوهشی، صفحات۴۷-۳۲ DOI: 10.22034/jar.2024.4082.1948

کاردیوژل در مدت ۶ روز ۳۴/۶ برابر شدند و زمان دوبرابر شدن آن‌ها ۲۸ ساعت محاسبه شد. طبق این نتایج، زمان دوبرابر شدن سلول‌ها در گروه بستر پوششی کاردیوژل در مقایسه با گروه‌های ژلاتین و بدون پوشش، کاهش می‌یابد. بنابراین این بررسی نشان می‌دهد که بستر پوششی کاردیوژل نقش مثبتی در سرعت رشد و دوبرابر شدن جمعیت سلول‌ها دارد.

بررسی تمایز BMSCs به سلول‌های استخوانی: برطبق مشاهدات انجام شده، طی هفته نخست از آغاز فرآیند تمایز، تغییرات کمی در مورفولوژی سلول‌ها دیده شد؛ در حالی‌که در پایان هفته دوم، تغییر شکل سلول‌ها محسوس بوده و شکل پهن‌تری به خود گرفتند. در این زمان، سلول‌ها شروع به ترشح موادی در ماتریکس خارج‌سلولی خود کردند. در روز ۲۱ پس از آغاز تمایز، افزایش قابل‌توجهی در مقدار این مواد ترشح شده درگروه کنترل و گروه‌های ژلاتین و هیدروژل قلبی دیده شد. معدنی شدن ماتریکس MSCs با رنگ‌آمیزی آلیزارین رد بررسی شد. در این روش، آلیزارین رد می‌تواند به‌طور اختصاصی ماتریکس حاوی کلسیم را رنگ‌آمیزی کند و قرمز شدن نشان‌دهنده رسوب کلسیم در ماتریکس استخوانی است. ترشح این مواد در ماتریکس خارج سلولی سلول‌های گروهی که روی بستر کاردیوژل تمایز پیدا کرده بودند به میزان بیشتری مشاهده شد (شکل ۴).



شکل ۴- روز هجدهم و بیست‌ویکم تمایز MSCs به استخوان بر روی بسترهای بدون پوشش، ژلاتین و بستر پوششی کاردیوژل. (بزرگنمایی کلی: ۲۰۰). قرمز شدن نشان‌دهنده رسوب کلسیم در ماتریکس استخوانی است. ترشح این مواد در ماتریکس خارج سلولی سلول‌های گروهی که روی بستر کاردیوژل تمایز پیدا کرده بودند به میزان بیشتری مشاهده شد.

DOI: 10.22034/jar.2024.4082.1948 مقاله پژوهشی، صفحات۴۷-۳۲

بحث

استخوان دارای ظرفیت بازسازی طبیعی است که به‌طور معمول برای ترمیم شکستگی و سایر آسیب‌های رایج کافی است. با این حال، قابلیت‌های استخوان در طول زندگی تغییر می‌کند. پیری با افزایش بروز بیماری‌های استخوانی و کاهش ظرفیت ترمیم شکستگی همراه است. ازاین‌رو به درمان‌های موثر برای بهبود بازسازی استخوان نیاز است. ترکیبات استخوانی در مهندسی بافت استخوان، این پتانسیل را دارند که در درمان آسیب‌های استخوانی مورد استفاده قرار گیرند. از این ترکیبات استخوانی همچنین می‌توان در شرایط آزمایشگاهی، برای ایجاد مدل‌های زیستی به‌منظور انجام مطالعات رشد و تکوین استخوان، استفاده کرد [۱۴]. پتانسیل درمانی MSCs مدت‌هاست برای ترمیم استخوان پیشنهاد شده و مورد بررسی قرار گرفته است [۲۱]. در این مطالعه، MSCs رت از مغز استخوان ران و ساق پا، استخراج و هویت آن‌ها با آزمون‌های مختلف تایید شد. ظاهر فیبروبلاستی‌شکل و چسبندگی سلول‌های استخراج شده از ویژگی MSCs است. با استفاده از محیط کشت اختصاصی تمایز، BMSCs به سمت سلول‌های استخوانی و چربی تمایز داده شدند. اثبات تمایز به سمت سلول‌های استخوانی توسط رنگ‌آمیزی آلیزارین رد و تمایز به سلول‌های چربی و ایجاد واکوئل‌های چربی، توسط رنگ‌آمیزی اویل رد انجام گرفت. MSCs فاقد مارکر اختصاصی هستند؛ ازاین‌رو برای شناسایی آن‌ها مارکرهای مثبت و منفی در نظر گرفته شد. نتایج به‌دست‌آمده از فلوسایتومتری نشان داد که این سلول‌ها مارکرهای CD44 و CD90 را به میزان بالا بیان می‌کنند؛ درحالی‌که درصد بسیار کمی از آن‌ها، مارکرهای سلول‌های خونی اعم از CD45 و CD34 را بیان می‌کنند. سلول‌زدایی بافت‌ها یا اندام‌ها می‌تواند برای آماده‌سازی داربست‌های کاربردی در مهندسی بافت، یک استراتژی کارآمد باشد. ریزساختارهای ECM و ترکیبات بیوشیمیایی آن را می‌توان در ماتریکس‌های سلول‌زدایی‌شده حفظ کرد و ریزمحیط‌های اختصاصی بافت را برای بازسازی بافت، فراهم کرد [۱۱]. هیدروژل‌های حاصل از ECM با حفظ ترکیبات اصلی، می‌توانند بستر مناسبی برای اهداف مهندسی بافت باشند. ECM به‌وسیله‌ی اینتگرین‌ها، فاکتورهای سیگنال‌دهی محلول و گیرنده‌های سیتوکین، از طریق تعامل با سطح سلول در تنظیم رفتار بافت نقش کلیدی ایفا می‌کند [۴]. ماهیت ECM که سلول‌ها روی آن کشت می‌شوند، می‌تواند بر سرنوشت و تمایز یک نوع سلول به سلول‌های متفاوت تأثیر بگذارد. ECM قلب از رایج‌ترین مواد زیستی طبیعی است که حاوی پروتئین‌ها، پپتیدها، پلی‌ساکاریدها و دارای خصوصیات ویسکوالانسی است که می‌تواند بستری مناسب برای رشد سلول فراهم آورد. کاردیوژل در بدن با کاردیوژل سنتز شده در شرایط آزمایشگاهی متفاوت است، زیرا شرایط کشت می‌تواند نوع و مقدار پروتئین تولیدشده توسط فیبروبلاست‌های قلبی را تغییر دهد [۱۸]. بر اساس مطالعات گذشته، BMSCs که روی ECM ترشح شده خودشان کشت می‌شوند، در برابر استرس اکسیداتیو محافظت نمی‌شوند اما تکثیر، چسبندگی سلولی، تمایز و محافظت در برابر استرس اکسیداتیو در BMSCs کشت شده روی کاردیوژل افزایش می‌یابد [۲۰].

در این مطالعه از عضله‌ی قلبی سلول‌زدایی‌شده گوسفند به‌عنوان زیست‌ماده به‌منظور تهیه‌ی کاردیوژل و ایجاد بستری برای بررسی زیستایی، رشد، تکثیر و تمایز BMSCs، در حالت برون‌تنی استفاده گردید. در این پژوهش مقایسه‌ی رنگ‌آمیزی‌های بافتی بافت طبیعی و بافت سلول‌زدایی‌شده، بر از بین بردن سلول‌ها و باقی ماندن ترکیباتی مانند کلاژن، گلیکوزآمینوگلیکان، تاکید کرده و حاکی از حفظ ساختار ECM بود. ژلاتین یک پلی‌ساکارید طبیعی است که از هیدرولیز کلاژن به‌دست می‌آید. به‌دلیل شکستگی در پیوندهای هیدروژنی و کووالانسی کلاژن، ژلاتین دارای

مقاله پژوهشی، صفحات۴۷-۳۲
DOI: 10.22034/jar.2024.4082.1948

ساختار سیم‌پیچ است. ژلاتین به خاصیت ژل شدنش معروف است و در دمای بالاتر از ۴۰°C، در محلول‌های آبی حل می‌شود. با کاهش دما، ساختار سیم‌پیچی به ساختار مارپیچ سه‌گانه تبدیل شده و هیدروژل را تشکیل می‌دهد. منبع ژلاتین و شرایط فرآوری آن، استحکام و پایداری ژل را تعیین می‌کند. ژلاتین از منابع پستانداران به‌دلیل محتوای پرولین و هیدروکسی‌پرولین بالا، استحکام و دمای ذوب بالاتری دارد [۱۲] . در مطالعه‌ی ما از ژلاتین به‌عنوان گروه کنترل استفاده شد. پس از ایجاد بستر پوششی دو بعدی از کاردیوژل و ژلاتین، BMSCs در سه گروه کاردیوژل، ژلاتین و بستر بدون پوشش کشت شدند و رشد، تکثیر و تمایز آن‌ها در آزمون‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. برای بررسی زیستایی BMSCs از آزمون MTT استفاده شد. در این آزمون از غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد و نتایج نشان داد که با افزایش غلظت، میزان زیستایی نیز به مقدار کمی افزایش می‌یابد و اختلاف بین گروه‌ها از لحاظ آماری معنادار نبود (P value= ۰/۳). درصد زیستایی نزدیک به‌هم در غلظت‌های کاردیوژل، نشان می‌دهد غلظت کاردیوژل مورد استفاده برای پوشش، بر رشد سلولی در شرایط آزمایشگاهی تأثیر چندانی ندارد. از این پس، به‌منظور مصرف کمتر مواد، از غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای تمام آزمایش‌های پوشش‌دهی بعدی، استفاده شد. در منحنی رشد سلولی، جمعیت BMSCs در بستر پوششی کاردیوژل در مقایسه با بستر پوششی ژلاتین و بستر بدون پوشش به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت، هرچند این اختلاف نیز از لحاظ آماری معنادار نبود (P value= ۰/۴). از این‌رو به منظور بررسی آماری دقیق‌تر این نتایج، به انجام تکرار زیستی بیشتر نیاز است. هر نوع سلول در ECM بافت مبدا خود بهترین رشد و عملکرد را دارد. به‌عنوان مثال سلول‌های ماهیچه‌ی اسکلتی بر روی ECM بافت عضله‌ی اسکلتی در مقایسه با سایر ECMها، تکثیر بیشتری می‌یابد؛ اما در انجام مطالعات سلولی و تکوینی از بسترهای بافتی طبیعی متفاوتی برای کشت انواع سلول استفاده می‌شود. ECM نقش مهمی در هدایت تمایز و بلوغ سلول‌های بنیادی و پیش‌ساز دارد [۵]. بنابراین ما پتانسیل بستر پوششی کاردیوژل را در تمایز BMSCs به سلول‌های استخوانی بررسی کردیم. یکی از محدودیت‌های این مطالعه این است که احتمالاً برخی از اجزای ECM در طول پردازش از بین رفته‌اند. با این حال، اجزای ماتریکس باقی مانده بر تمایز و بلوغ سلولی تأثیر می‌گذارند.

در مطالعه ما نشان داده شد که ویژگی کاردیوژل به‌عنوان پوشش سطحی کشت، تکثیر سلولی را تقویت کرده و تمایز استخوان را افزایش می‌دهد. BMSCs کشت شده بر بستر پوششی کاردیوژل در مقایسه با بستر ژلاتین و بستر بدون پوشش، رشد و تکثیر چشمگیری داشتند. علاوه‌براین، لایه‌ی پوششی کاردیوژل در القای عملکردهای متابولیکی، بهتر از بستر ژلاتین عمل می‌کند. مطالعات نشان می‌دهد که صفحات پوشش داده شده با کاردیوژل باعث افزایش چسبندگی سلولی در مقایسه با صفحات بدون پوشش می‌شود. در مطالعه‌ی ما نیز مشاهده شد که سلول‌ها در گروه کاردیوژل، هنگام شمارش سلولی در مرحله‌ی تریپسینه کردن، به‌سختی از بستر جدا می‌شدند. مطالعات سیتوسازگاری نشان می‌دهد که کاردیوژل تکثیر، چسبندگی و مهاجرت سلولی را افزایش می‌دهد. این اثرات را می‌توان به پروتئین‌هایی مانند Tmsb4x و Psap که به‌عنوان ارتقادهنده‌ی بقا و مهاجرت سلولی، محافظ در برابر استرس و جلوگیری‌کننده از آپوپتوز شناخته شده‌اند، نسبت داد. پیش‌تر گفته شد که فاکتور Tmsb4x اثر مثبتی بر تکثیر و رشد MSCs دارد؛ اما مطالعه‌ای دیگر نشان داد که Tmsb4x تمایز استخوانی را مهار می‌کند [۱۷] و تمایز چربی را افزایش می‌دهد ولی نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که تمایز استخوانی BMSCs کشت‌شده بر روی صفحات پوشش‌داده‌شده با کاردیوژل در مقایسه با سلول‌های

DOI: 10.22034/jar.2024.4082.1948 مقاله پژوهشی، صفحات۴۷-۳۲

کشت‌شده بر روی صفحات ژلاتین و بدون پوشش افزایش می‌یابد. محتوای کلسیمی رنگ‌آمیزی شده توسط آلیزارین رد در گروه کاردیوژل تاییدکننده‌ی این ادعاست. بنابراین پیشنهاد می‌شود تمایز استخوانی بر روی بستر پوششی کاردیوژل به‌صورت کمی نیز بررسی شود. این مطالعه نشان می‌دهد که ریزمحیط سلول و تفاوت‌های ظریف در ترکیبات بستر پوششی می‌تواند در شرایط آزمایشگاهی بر روی فنوتیپ سلولی نقش مهمی داشته باشد. اخیراً بسترهای کشت سه‌بعدی به‌عنوان محیط شبیه‌تری نسبت به محیط درون‌تنی شناخته شده‌اند [۱۹]. با این حال، بستر سه‌بعدی همیشه برای همه مطالعات کشت سلول مناسب نیست. در اینجا، ما یک روش ساده برای ایجاد مقادیر زیادی از بستر پوششی ایجاد کرده‌ایم که شباهت خوبی با ریزمحیط درون‌تنی دارد و می‌تواند برای هر نوع سنجش کشت سلولی و بررسی انواع هیدوژل اعمال شود. مقرون‌به‌صرفه بودن و تاثیر بسیار بستر پوششی کاردیوژل بر تکثیر سلولی، این نوع پوشش را به زیست‌ماده‌ای کاربردی و ارزشمند در پزشکی بازساختی، تست‌های دارویی، سلول‌درمانی و بررسی‌های تکوینی تبدیل می‌کند و بیانگر ارزش این تحقیقات به طور گسترده‌تر می‌باشد.

در این مطالعه نشان داده شد که استفاده از کاردیوژل در کشت دو بعدی زیستایی، رشد، تکثیر و تمایز را در مقایسه با بستر ژلاتین و بستر بدون پوشش، افزایش می‌دهد. در آینده می‌توان از هیدروژل‌های مشتق از بافت سلول‌زدایی‌شده به علت قابلیت‌های گسترده و شکل‌پذیری‌شان، در بازسازی نقص‌های استخوانی استفاده کرد. هرچند برای بهسازی کاربرد این پژوهش نیاز به تکرار و بررسی‌های بیشتری است.

سپاسگزاری

این مطالعه به‌عنوان بخشی از پایان‌نامه نویسنده اول است که با حمایت دانشگاه شهید بهشتی و پژوهشگاه رویان انجام شده است.

منابع

1- Ahmadi, B.M., A. Noori, M.K. Ashtiani, S. Rajabi and M. Talkhabi, (2023). *5-Azacytidine incorporated skeletal muscle-derived hydrogel promotes rat skeletal muscle regeneration.* Cells & Development, **173**: p. 203826.

2- Amini, A.R., C.T. Laurencin and S.P. Nukavarapu, (2012). *Bone tissue engineering: recent advances and challenges.* Critical Reviews™ in Biomedical Engineering, **40**(5).

3- Chai, Q., Y. Jiao and X. Yu, (2017). *Hydrogels for biomedical applications: their characteristics and the mechanisms behind them.* Gels, **3**(1): p. 6.

4- Decaris, M.L., A. Mojadedi, A. Bhat and J.K. Leach, (2012). *Transferable cell-secreted extracellular matrices enhance osteogenic differentiation.* Acta biomaterialia, **8**(2): p. 744-752.

5- DeQuach, J.A., V. Mezzano, A. Miglani, S. Lange, G.M. Keller, F. Sheikh and K.L. Christman, (2010). *Simple and high yielding method for preparing tissue specific extracellular matrix coatings for cell culture.* PloS one, **5**(9): p. e13039.

6- Guo, L., Z. Liang, L. Yang, W. Du, T. Yu, H. Tang, C. Li and H. Qiu, (2021). *The role of natural polymers in bone tissue engineering.* Journal of Controlled Release, **338**: p. 571-582.

7- Hoshiba, T., H. Lu, N. Kawazoe and G. Chen, (2010). *Decellularized matrices for tissue engineering.* Expert opinion on biological therapy, :(۱۲)۱۰ p. 1717-1728.

8- Khanban, H., E. Fattahi and M. Talkhabi, (2019). *In vivo administration of G9a inhibitor A366 decreases osteogenic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells.* Excli journal, **18**: p. 300.

مقاله پژوهشی، صفحات۴۷-۳۲ DOI: 10.22034/jar.2024.4082.1948

9- Laurencin, C.T., A. Ambrosio, M. Borden and J. Cooper Jr, (1999). *Tissue engineering: orthopedic applications.* Annual review of biomedical engineering, **1**(1): p. 19-46.

10- Le, B.Q., V. Nurcombe, S.M. Cool, C.A. Van Blitterswijk, J. De Boer and V.L.S. LaPointe, (2017). *The components of bone and what they can teach us about regeneration.* Materials, **11**(1): p. 14.

11- Lee, J.S., J. Shin, H.-M. Park, Y.-G. Kim, B.-G. Kim, J.-W. Oh and S.-W. Cho, (2014). *Liver extracellular matrix providing dual functions of two-dimensional substrate coating and three-dimensional injectable hydrogel platform for liver tissue engineering.* Biomacromolecules, **15**(1): p. 206-218.

12- Liu, D., M. Nikoo, G. Boran, P. Zhou and J.M. Regenstein, (2015). *Collagen and gelatin.* Annual review of food science and technology, **6**: p. 527-557.

13- Manzini, B.M., A.d.S.S. Duarte, S. Sankaramanivel, A.L. Ramos, P. Latuf-Filho, C. Escanhoela, P. Kharmandayan, S.T.O. Saad, I. Boin and Â.C.M. Luzo, (2015). *Useful properties of undifferentiated mesenchymal stromal cells and adipose tissue as the source in liver-regenerative therapy studied in an animal model of severe acute fulminant hepatitis.* Cytotherapy, **17**(8): p. 1052-1065.

14- Marolt, D., M. Knezevic and G. Vunjak-Novakovic, (2010). *Bone tissue engineering with human stem cells.* Stem cell research & therapy, **1**(2): p. 1-11.

15- ۱۵. Parchehbaf-Kashani, M., M. Talkhabi and S. Rajabi, (2020). *Study of Polypyrrole-Cardiogel Combined Scaffold on Viability of Cardiac Cells.* Journal of Advanced Biomedical Sciences, **10**(4): p. 2905-2915.

16- Peppas, N.A., J.Z. Hilt, A. Khademhosseini and R. Langer, (2006). *Hydrogels in biology and medicine: from molecular principles to bionanotechnology.* Advanced materials, **18**(11): p. 1345-1360.

17- Santhakumar, R., P. Vidyasekar and R.S. Verma, (2014). *Cardiogel: a nano-matrix scaffold with potential application in cardiac regeneration using mesenchymal stem cells.* PloS one, **9**(12): p. e114697.

18- Shyamsunder, P., K.S. Ganesh, P. Vidyasekar, S. Mohan and R.S. Verma, (2013). *Identification of novel target genes involved in Indian Fanconi anemia patients using microarray*. Gene, **531**(2): p. 444-450.

19- Singelyn, J.M., J.A. DeQuach, S.B. Seif-Naraghi, R.B. Littlefield, P.J. Schup-Magoffin and K.L. Christman, (2009). *Naturally derived myocardial matrix as an injectable scaffold for cardiac tissue engineering.* Biomaterials, **30**(29): p. 5409-5416.

20- Sreejit, P. and R. Verma, (2011). *Cardiogel supports adhesion, proliferation and differentiation of stem cells with increased oxidative stress protection.* Eur Cell Mater, **21**: p. 107-121.

21- Utomo, L., M.M. Pleumeekers, L. Nimeskern, S. Nürnberger, K.S. Stok, F. Hildner and G.J. van Osch, (2015). *Preparation and characterization of a decellularized cartilage scaffold for ear cartilage reconstruction.* Biomedical materials, **10**(1): p. 015010.

22- Zuk, P.A., M. Zhu, P. Ashjian, D.A. De Ugarte, J.I. Huang, H. Mizuno, Z.C. Alfonso, J.K. Fraser, P. Benhaim and M.H. Hedrick, (2002). *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.* Molecular biology of the cell, **13**(12): p. 4279-4295.

مقاله پژوهشی، صفحات۴۷-۳۲ DOI: 10.22034/jar.2024.4082.1948

Evaluating the viability and differentiation of mesenchymal stem cells cultured on heart muscle-derived coating layer

Mohammadian Z.[1], Talkhabi M.[1*], Rajabi S.[2], Erfanian S.[2] and Mavaddatiyan L.[1]

[1] Dept. of Animal Sciences and Marine Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, I.R. of Iran

[2] Dept. of Cell Engineering, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Treatment of bone defects is very challenging due to the complex composition, structure, and functions of bone. Tissue engineering is a new approach to the treatment of bone injuries. In this study, bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) were extracted from rat tibia and femur and cultured in αMEM medium. Then, morphology, surface markers, and differentiation into bone and fat cells were evaluated. The sheep heart tissue was cut into pieces and decellularized with 1% SDS and then examined by tissue-specific staining (hematoxylin-eosin, Masson's trichrome, DAPI, and Alcian blue). Cardiogel was prepared from the decellularized cardiac muscle tissue and then a two-dimensional coating derived from cardiogel was created. To investigate the viability, proliferation, and differentiation, BMSCs were cultured on different concentrations (0.05, 0.1, 0.2, 0.4, and 0.8) of cardiogel coating which was used as the test group. The gelatin coating was used as a positive control group and the substrate without any coatings was used as a negative control group. Increased viability, proliferation, and differentiation of BMSCs were observed in culture vessels containing cardiogel. According to the results of the cell viability examination, with the increase in the concentration of cardiogel, the growth and the function of the cells increased; However, it was not statistically significant. The results of this study showed that cardiogel can be used as a two-dimensional coating in cell culture and provide a microenvironment similar to the inside of the body.

Key words: Mesenchymal stem cells, Viability, Proliferation, Bone differentiation, Decellularization, Cardiogel