زیست‌فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دورهٔ 4، شمارهٔ 1، بهار و تابستان 1392

طراحی و ساخت بستر تمایز کبدی برای بهبود چسبندگی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی

سحر خواجه[1]، عباس صاحبقدم لطفی[2*]، وحید رزبان[3]، افشین محسنی‌فر[4]، مسعود سلیمانی[5]

1- کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم‌پزشکی شیراز، ایران
2- استاد بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
3- استادیار ژنتیک ملکولی، گروه مهندسی بافت، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
4- استادیار بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
5- استادیار خون‌شناسی،گروه خون‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

* کدپستی 161-14965، تهران، ایران
lotfi-ab@nigeb.ac.ir
(دریافت مقاله: 91/۱/13، پذیرش: 91/10/1)

چکیده - بیشتر بیماران کبدی مدت زیادی منتظر عضو پیوندی خواهند بود. توانایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در تمایز به سلول‌های شبه‌کبدی امید تازه‌ای برای درمان بیماری‌های کبدی است. مهندسی بافت، تمایز کبدی را با اتصال گروه‌های گوناگون مانند گلیکوزآمینوگلیکان‌هایی همچون هپاران‌سولفات به سطوح کشت، بهبود داده است. در تمایز کبدی، جدا شدن و مرگ سلول‌ها مشکلی است که کارایی سلول‌درمانی را کاهش می‌دهد. هدف این مطالعه، طراحی و ساخت بستری با الگوبرداری از ماتریکس خارج سلولی کبد است که بتواند از چسبندگی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی حمایت کند.

در این پژوهش، کلاژن به‌گونه‌ای فیزیکی روی سطح ظروف کشت پلی‌استیرنی پوشش داده شد. برای تهیه‌ی بستر کلاژن-گلیکوزآمینوگلیکان، مولکول‌های هپاران‌سولفات، به صورت کووالان به‌وسیله‌ی EDC به کلاژن متصل شد. میزان چسبندگی سلول به روش شمارش سلولی و تکثیر سلول به دو روش شمارش سلولی و MTT بررسی شد.

وجود گلیکوزآمینوگلیکان روی کلاژن به‌وسیله رنگ‌آمیزی با سافرونین o تأیید شد. نتایج نشان داد که بیشترین میزان چسبندگی سلول‌ها به ترتیب مربوط به ماتریکس کلاژن، کلاژن-هپاران‌سولفات و پلی‌استیرن است. بستر کلاژن نیز بیشترین میزان تکثیر سلولی را نشان می‌دهد؛ پس از آن، ماتریکس کلاژن-هپاران‌سولفات توانست بستر مناسب‌تری نسبت به سطح پلی‌استیرن برای تکثیر سلول‌ها فراهم کند.

این مطالعه نشان می‌دهد که ماتریکس شبیه‌سازی‌شده کبدی با استفاده از کلاژن همراه با گلیکوزآمینوگلیکان می‌تواند چسبندگی و ماندگاری سلول‌های بنیادی مزانشیمی را در سطح بهتری در مقایسه با سطوح معمولی کشت سلولی حمایت کند.

کلید واژگان: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تمایز کبدی، چسبندگی سلولی،گلیکوزآمینوگلیکان.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-31]

1- مقدمه

درمان بیماری‌های کبدی با پیدایش و تکامل پیوند کبد، پیشرفت‌های بسیاری کرده است. ولی چون تقاضا برای ارگان اهدایی بیش از تعداد ارکان موجود است و نیز با توجه به مسئله رد پیوند، نیاز به درمان‌های جایگزین بدیهی است [1]. طی سال‌های نزدیک، مهندسی بافت کبد[1] به‌عنوان یک روش درمانی مناسب، جایگزین پیوند کبد برای بیمارانی که در انتظار پیوند عضو به سر می‌برند مطرح شده است [2-6]. امروزه محققان به پیوند هپاتوسیت‌های جداشده از کبد به‌عنوان درمان سریع‌تر و جایگزین پیوند کبد روی آورده‌اند. مزیت این روش این است که می‌توان از سلول‌های جداشده از یک کبد اهدایی برای پیوند به چند بیمار استفاده کرد [7, 8]. اما از مشکلات این روش، سختی جداسازی و نگهداری سلول‌های هپاتوسیت، تکثیر کم آن‌ها، واکنش سیستم ایمنی و احتمال رد سلول‌های پیوندشده است [9-11]. به خاطر توان تکثیر و تمایز بالا، سلول‌های بنیادی یکی از منابع سلولی مناسب برای پیوند است [12]. از میان انواع سلول‌های بنیادی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs)[2] انتخاب مناسبی برای پیوند سلولی در بیماری‌های کبدی محسوب می‌شود [13-15]. چون جداسازی و کار با سلول‌های بنیادی مزانشیمی آسان‌تر از انواع دیگر سلول های بنیادی بوده و این سلول ها می‌توانند به سلول‌های گوناگون از جمله هپاتوسیت تمایز پیدا کنند، از دیدگاه درمانی بسیار مورد توجه است [16-19].

افزون بر نوع سلول، استفاده از بسترهای[3] بیولوژیکی سازگار با بدن فاکتورهای مهم در مهندسی بافت است. برای رسیدن به این هدف، رفتار سلول روی مواد داربستی بررسی شده است. در مطالعات نزدیک، محققان سعی کرده‌اند با الگوبرداری از فضای خارج سلولی و عوامل مؤثر در القا تمایز سلول‌ها به سمت بافت مورد نظر، شرایط واقعی بدن موجود زنده را برای تمایز سلول‌های بنیادی تقلید کنند [9، 11]. همچنین مشخص شده است که تغییر موضعی در ترکیب غشا پایه به‌وسیله‌ی ماتریکس خارج سلولی (ECM)[4] تنظیم می‌شود که نقش مهمی در پایداری سلول‌های بنیادی دارد؛ افزون بر آن، ساختار ماتریکس، غلظت موضعی فاکتورهای ترشحی موجود در niche سلول‌های بنیادی را تنظیم می‌کند [13، 14].

تاکنون محققان از بسترهای دوبعدی و سه‌بعدی مختلفی در تمایز سلول‌های بنیادی استفاده کرده‌اند. یکی از این بسترها، ماتریکس‌های کلاژن-گلیکوزامینوگلیکان[5] (GAG) است که کاربرد وسیعی در مهندسی بافت دارد. بسترهای کلاژن-گلیکوزآمینوگلیکان، بیشتر شرایط را به‌عنوان ماتریکس در [مهندسی بافت] دارند. برخی از این شرایط عبارت است از: سازگاری زیستی[6]، قابلیت تخریب در محیط زنده[7]، تولید محصولات غیرسمی پس از تجزیه و میزان تخلخل بالا [10].

در تمایز کبدی، جدا شدن سلول‌ها و مرگ آن‌ها از مشکلاتی است که کارایی سلول‌درمانی را کاهش می‌دهد. کلاژن یکی از اجزای اصلی ECM بدن است که توانایی بالایی برای ایجاد چسبندگی بین سلول‌ها داشته و برهم‌کنش‌های اختصاصی سلول را ایجاد

1. Liver-tissue engineering
2. Mesenchymal stem cells
3. Matrices
4. Extra cellular matrix
5. Glycosaminoglycan
6. Biocompatible
7. Biodegredable

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-31]

می‌کند؛ تمایز کبدی سلول‌های بنیادی روی آن به‌وسیله‌ی محققان گوناگون بررسی شده است [12، 16، 17، 20-25]. تمایز کبدی را می‌توان با اتصال گروه‌های مختلف مانند گلیکوزآمینوگلیکان‌ها به سطوح کشت بهبود داد [26]. گلیکوزآمینوگلیکان‌ها از جمله هپاران‌سولفات، گروهی از پلی‌ساکاریدهای ECM است که نقش مهمی در پیام‌دهی، تکثیر و تمایز سلول به‌ویژه طی تکامل جنینی ایفا می‌کند.

هدف این مطالعه، شبیه‌سازی ماتریکس خارج سلولی کبد با ساخت دو بستر کلاژن و کلاژن-هپاران‌سولفات و سپس بررسی رفتارهای سلولی مانند چسبندگی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان روی آن‌ها در مقایسه با سطح ظروف کشت معمولی است.

2- مواد و روش‌ها

در این پژوهش، سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان سه فرد دهنده‌ی سالم، تهیه و پاساژ چهار آن‌ها استفاده شد.

برای تأیید خلوص و ماهیت سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تعیین شاخص‌های سطحی آن‌ها به روش فلوسایتومتری انجام شد. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال نشان‌دارشده با FITC[1] علیه CD34، CD73، CD105 و آنتی‌بادی نشان‌دارشده با PE، علیه CD31 استفاده شد.

از خصوصیات سلول‌های بنیادی مزانشیمی، توانایی تمایز به سلول‌های استخوانی و چربی است. برای تمایز به سلول‌های استخوانی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی 14 روز در معرض محیط کشت DMEM با گلوکز بالا (4000 g/l) حاوی 10 درصد FBS و القاگرهای تمایزی دگزامتازون 10 میکرومولار، 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر اسید آسکوربیک و 10 میکرومولار بتاگلیسروفسفات قرار داده شدند. در این مدت، سلول‌ها در 37 درجه سانتی‌گراد و 5 درصد CO2 نگه‌داری شدند و تعویض محیط هر 3 روز انجام شد. پس از 14 روز سلول‌ها به روش Alizarin O red رنگ‌آمیزی شدند و با میکروسکوپ فاز کنتراست مشاهده شدند.

برای تمایز ادیپوژنیک سلول‌ها، تنها محیط القایی جایگزین شد. محیط القاکننده‌ی تمایز به چربی، حاوی 10 درصد FBS، 1 میکرومولار دگزامتازون، 200 میکرومولار اندومتاسین، 1/7 میکرومولار انسولین و 500 میکرومولار ایزوبوتانل متیل‌زانتین بود، پس از 14 روز با رنگ‌آمیزی اختصاصی Oil red staining، تمایز آن‌ها به سلول‌های چربی ارزیابی شد.

برای ساخت بستر کلاژن، محلولی از کلاژن IV (شرکت Sigma) با غلظت 10 میکروگرم/میلی‌لیتر تهیه و در چاهک‌های پلیت 24خانه ریخته شد؛ سپس 1 ساعت در دمای اتاق انکوبه شد (برای هر چاهک، 10 میکروگرم). پس از آن، محلول درون چاهک‌ها خارج و هر چاهک 2 بار با PBS شست‌وشو داده شد. برای تعیین مقدار پروتئین پوشش داده‌شده، OD محلول پروتئینی قبل و بعد از انکوباسیون در طول موج 280 nm اندازه‌گیری شد و با توجه به غلظت اولیه محلول، غلظت نهایی و در نتیجه میزان پروتئین در هر چاهک محاسبه گردید.

برای ساخت بستر کلاژن-هپاران‌سولفات محلولی به غلظت 1 میکروگرم/ میکرولیتر از هپاران‌سولفات

1. Fluorescent isothiocyanate

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-31]

(شرکت Sigma) تهیه و با محلول EDC[1] (شرکت Fluka) مخلوط شد به‌گونه‌ای که تعداد مول EDC به‌کار رفته، دو برابر تعداد مول هپاران‌سولفات بود. پس از 15 دقیقه انکوباسیون، این محلول در چاهک‌های پلیت 24خانه حاوی کلاژن پوشش داده‌شده ریخته (10 میکروگرم هپاران‌سولفات برای هر چاهک) و 24 ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. پس از این مدت، چاهک‌ها 3 بار با PBS شسته شدند.

برای اندازه‌گیری مقدار هپاران‌سولفات متصل‌شده به کلاژن از رنگ‌آمیزی safranin o استفاده شد. 30 میکرولیتر از محلول حاوی هپاران‌سولفات قبل و بعد از انجام واکنش با 240 میکرولیتر محلول safranin o (0/4 میلی‌گرم/ میلی‌لیتر در بافر استات سدیم 50 میلی‌مولار با PH=7) مخلوط و میزان جذب محلول به‌دست‌آمده در طول موج 510 nm ارزیابی شد.

برای بررسی چسبندگی سلول روی بستر، ابتدا محیط کشت حاوی تعداد 2×10^4 سلول در هر چاهک پلیت 4خانه روی بسترهای مورد نظر ریخته شد. میزان چسبندگی سلولی پس از 1 ساعت ارزیابی شد؛ به این‌صورت که محیط روی سلول‌ها خارج و چاهک‌ها با PBS شسته شدند. سپس سلول‌ها تریپسینه شده و با استفاده از لام هماسیتومتر، تعداد سلول‌های چسبیده شمارش شد.

ارزیابی تکثیر سلول روی بسترهای مطالعه شده در روزهای 2، 4، 6 و 8 به دو روش شمارش سلولی و MTT انجام و بر اساس آئین‌نامه تعیین رشد، بررسی شد. برای انجام MTT، نمک Thiazolyl (شرکت Roth آلمان) با استفاده از PBS به‌صورت محلول در آمد. پس از آن‌که محیط روی سلول‌ها برداشته شد، محلول MTT با غلظت نهایی 1 mg/ml در محیط کشت به چاهک‌ها اضافه و پلیت‌ها 4 ساعت در 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد؛ سپس این محلول، خارج و درون چاهک‌ها، DMSO (شرکت Sigma) ریخته شد. کریستال‌های بنفش فورمازان تشکیل‌شده به‌خوبی به‌وسیله پیپتاژ کردن، محلول شد و OD محلول داخل هر چاهک در طول موج 570 nm با دستگاه الایزا ریدر خوانده شد. میانگین OD نمونه‌ها و میزان انحراف میانگین آن‌ها به‌دست آمد. این OD متناسب با تعداد سلول زنده داخل هر چاهک است.

viability = میانگین نمونه‌ها / میانگین کنترل ×100

برای بررسی تکرارپذیری نتایج به‌دست‌آمده، آزمایش‌ها روی سلول‌های سه فرد دهنده‌ی سالم انجام شد. داده‌های به‌دست‌آمده از سه بار تکرار آزمایش با استفاده از تست ANOVA ارزیابی و به‌صورت میانگین ± SEM[2] ارائه شد. $P<0/05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

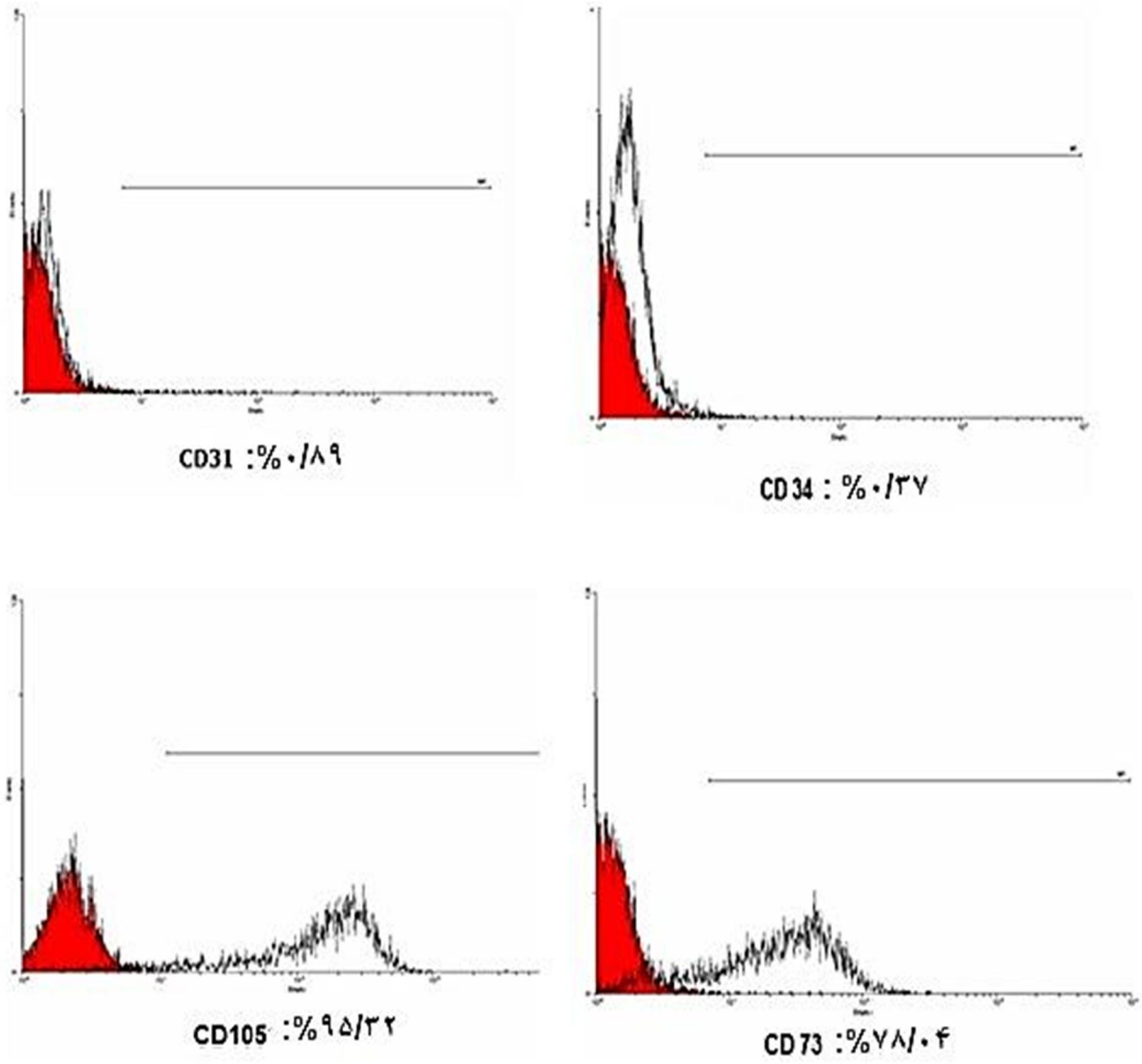
3- نتایج

بررسی شاخص‌های سطحی سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان به روش فلوسیتومتری نشان داد که درصد بیان شاخص‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی شامل CD73 و CD105 به ترتیب 78/04 و 95/32 درصد است؛ در حالی‌که شاخص‌های اختصاصی سلول‌های هماتوپوئیتیک، CD34 و CD31، بیان چندانی نداشتند (شکل 1). نتایج فلوسایتومتری نشان‌دهنده‌ی کیفیت خوب سلول‌های استفاده‌شده و آلوده‌نبودن آن‌ها به سلول‌های هماتوپویتیک است.

1. 1-Ethyl-3- [3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride

2. Standard Error of Mean

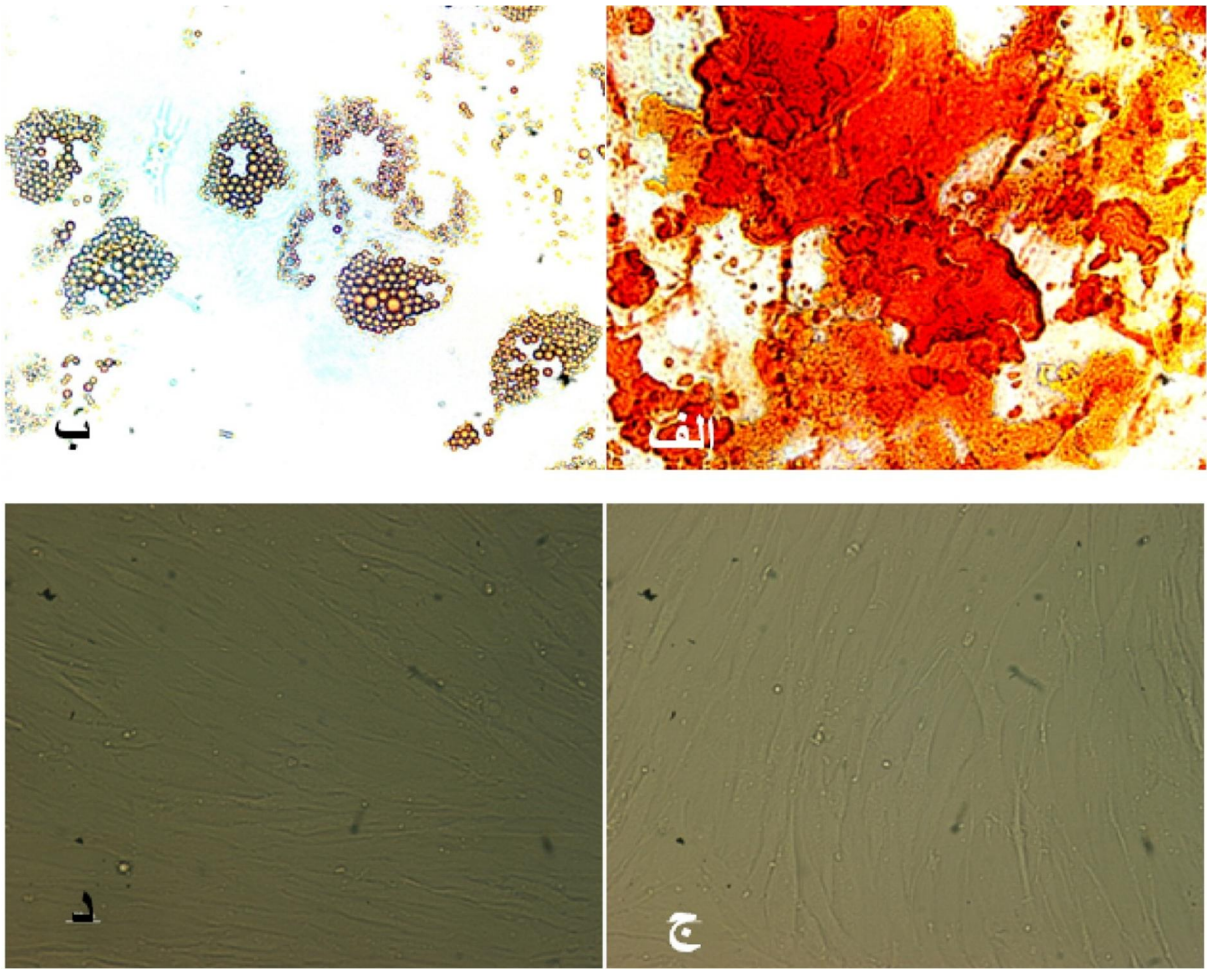
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-31]



شکل 1 بررسی بیان شاخص‌های سطحی سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان انسان به روش فلوسایتومتری، برای تأیید خلوص و ماهیت سلول‌های بنیادی مزانشیمی، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال نشان‌دارشده با FITC علیه CD34، CD73CD105 و آنتی‌بادی نشان‌دارشده با PE، علیه CD31 استفاده شد.

رنگ‌آمیزی اختصاصی Alizarin red نشان‌دهنده‌ی وجود رسوب کلسیم در سلول‌های تمایز داده‌شده به سمت سلول‌های استخوانی بود که از ویژگی‌های سلول‌های استخوانی است، تشکیل قطرات چربی که پس از رنگ آمیزی oil red به رنگ نارنجی مشاهده می‌شوند، در سلول‌های تمایزیافته به سمت ادیپوسیت مشاهده شد (شکل2).

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-31]

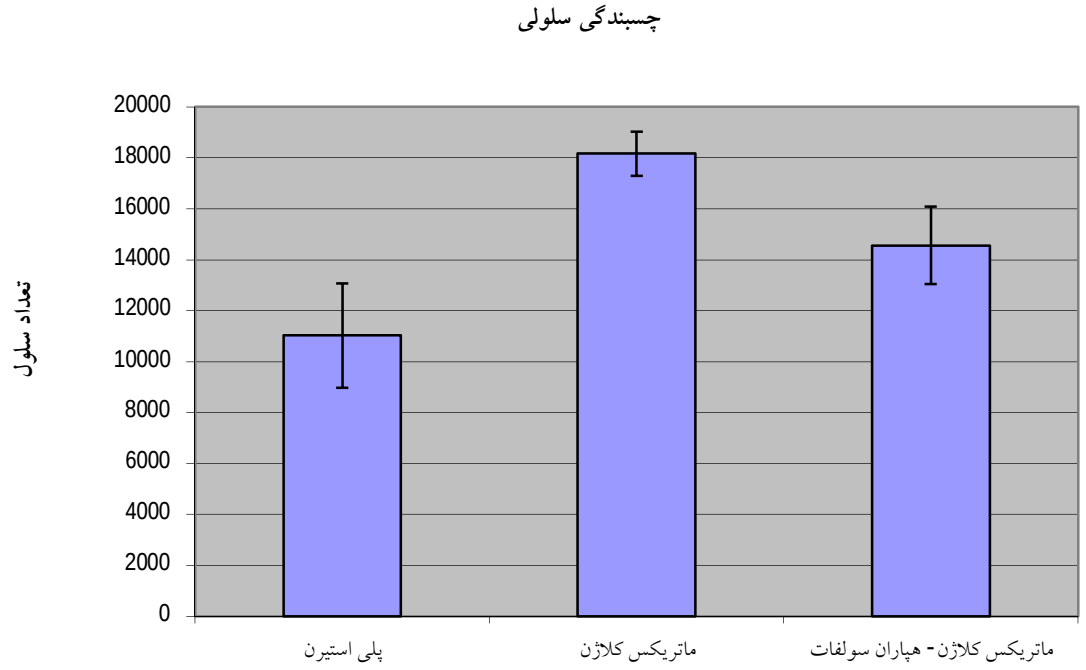


شکل 2 تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سمت سلول‌های استخوانی (الف) و چربی (ب). در تمایز سلول‌ها به سمت سلول‌های استخوانی، رسوب کلسیم رنگ‌آمیزی اختصاصی Alizarin red به رنگ قرمز مشاهده می‌شود. در تمایز سلول‌ها به سمت سلول‌های چربی، قطرات چربی به‌وجودآمده پس از رنگ‌آمیزی اختصاصی Oil red، به رنگ نارنجی دیده می‌شوند. سلول‌هایی که تمایز به سمت سلول‌های استخوانی (ج) و چربی (د) در آن‌ها القا نشده است.

نتایج اسپکتروفتومتری در ساخت بستر کلاژن نشان داد که این پروتئین حدود 10 µg در هر چاهک پوشش یافته است. همچنین نتایج رنگ‌آمیزی safranin و اسپکتروفتومتری در تثبیت هپاران‌سولفات به‌وسیله EDC، بیانگر آن بود که حدود 7 µg از این گلیکوزآمینوگلیکان در هر چاهک تثبیت شده است.

میزان چسبندگی سلولی (برحسب cell number/ well) روی بسترهای مطالعه‌شده و همچنین سطح ظروف کشت معمولی پس از گذشت 1 ساعت از کشت آن‌ها به روش ترپسینه کردن و شمارش به‌وسیله‌ی لام نئوبار بررسی شد (نمودار1). نتایج بیانگر آن بود که بیشترین میزان چسبندگی سلولی مربوط به بستر کلاژن و پس از آن بستر کلاژن - هپاران‌سولفات است.

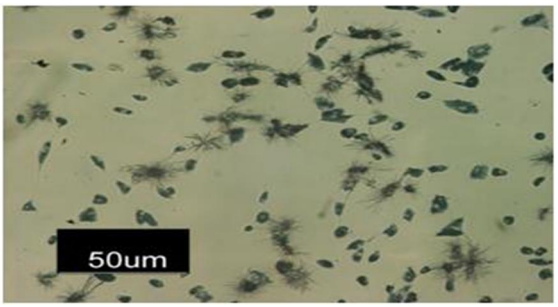
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-31]



نمودار 1 چسبندگی MSCs روی بسترهای کلاژن و کلاژن-هپاران‌سولفات در مقایسه با سطح پلی‌استیرن

چسبندگی سلول‌ها پس از کشت 2×10^4 سلول در هر چاهک و سپس تریپسینه کردن سلول‌های چسبیده به سطوح آزمایش، بعد از گذشت 1 ساعت بررسی شد. سلول‌های تریپسینه‌شده با استفاده از لام هماسیتومتر شمارش شدند.

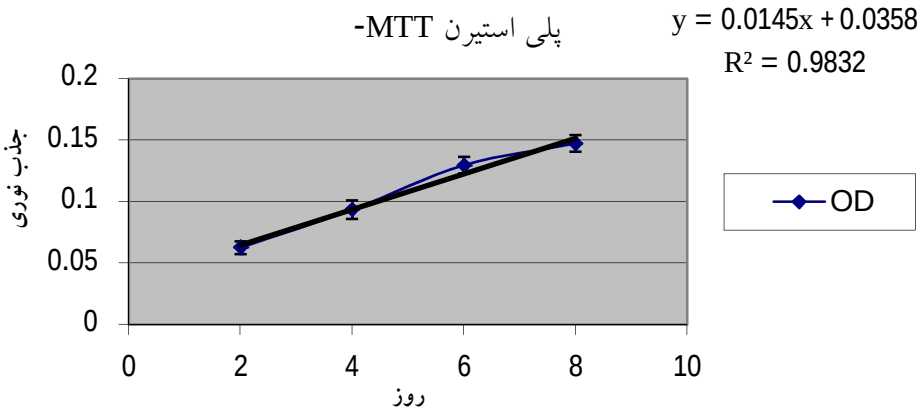
تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی روی بسترهای مطالعه‌شده، در طی 8 روز به دو روش MTT و شمارش سلولی، بررسی شد (نمودارهای 2 و 3). نتایج، بیانگر حمایت این بسترها از سلول‌های کشت‌شده روی آن‌ها است.



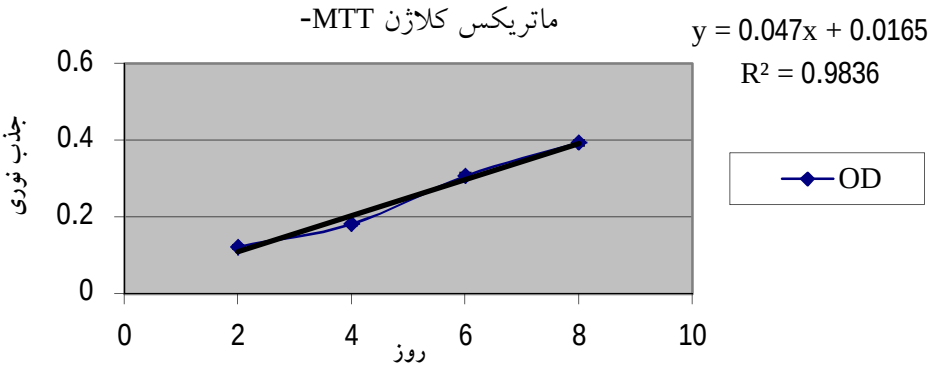
شکل 3 تشکیل کریستال‌های فورمازان در اثر واکنش معرف MTT با MSCs

کریستال‌های فورمازان پس از اضافه کردن DMSO به سلول‌ها در انتهای آزمایش MTT تشکیل می‌شوند.

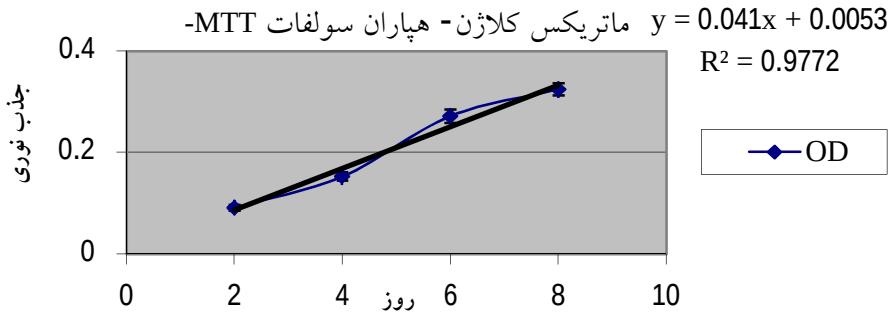
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-31]



الف



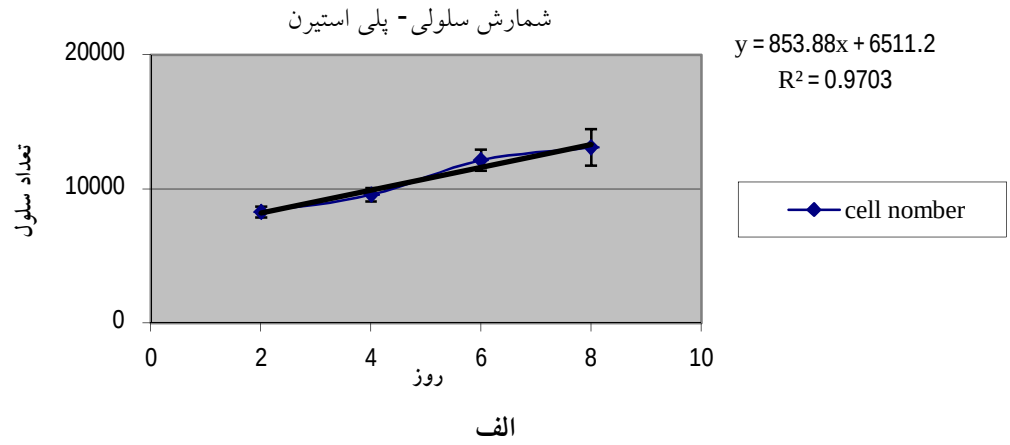
ب



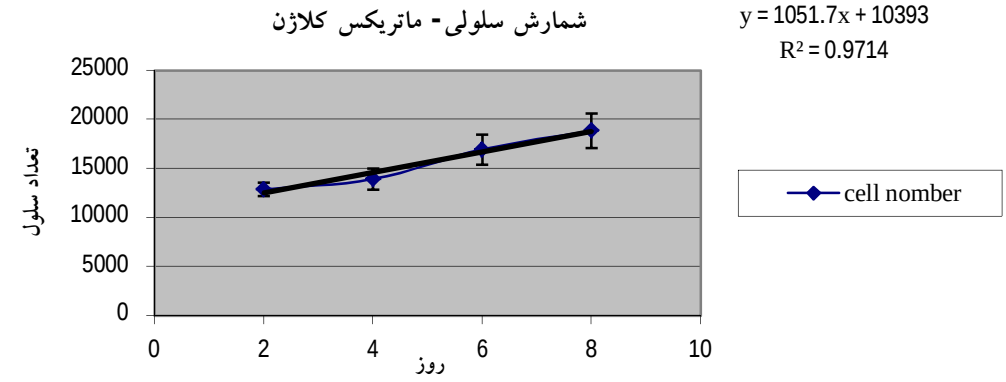
ج

نمودار 2 منحنی تکثیر MSCs با استفاده از تست MTT روی پلی‌استیرن (الف) کلاژن (ب) و کلاژن-هپاران‌سولفات (ج) ارزیابی تکثیر سلول در روزهای 2، 4، 6 و 8 به روش MTT انجام و بر اساس آئین‌نامه تعیین رشد بررسی شد. پس از برداشتن محیط روی سلول‌ها، محلول MTT با غلظت نهایی 1 mg/ml در محیط کشت به چاهک‌ها اضافه شد. پس از 4 ساعت انکوباسیون در 37 درجه سانتی‌گراد، این محلول خارج و DMSO درون چاهک‌ها ریخته شد. OD محلول داخل هر چاهک در طول موج 570 nm خوانده شد. میانگین OD نمونه‌ها متناسب با تعداد سلول زنده داخل هر چاهک است.

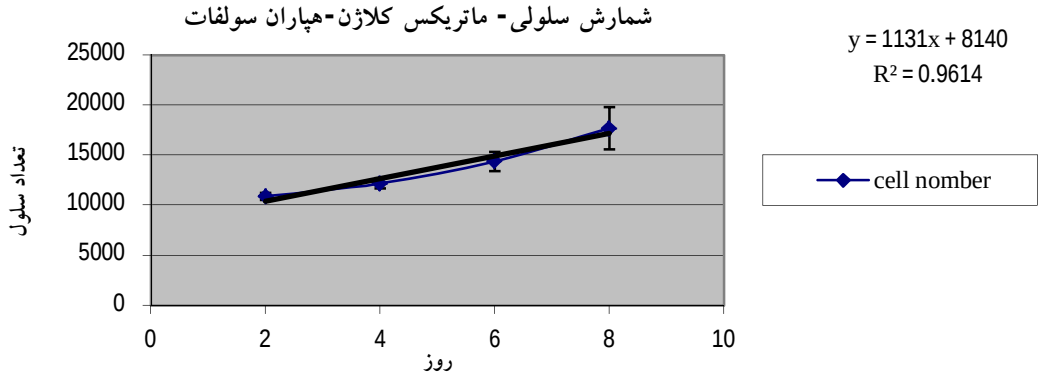
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-31]



الف



ب



ج

نمودار 3 منحنی تکثیر MSCs شمارش سلول‌های روی پلی‌استیرن (الف)، کلاژن (ب) و کلاژن- هپاران‌سولفات (ج). تکثیر سلول‌ها در روزهای 2، 4، 6 و 8 به روش شمارش سلولی و با استفاده از لام نئوبار، ارزیابی و بر اساس آئین‌نامه تعیین رشد بررسی شد.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-31]

نتایج، نشان‌دهنده‌ی آن بود که بیشترین میزان تکثیر سلولی مربوط به سلول‌های کشت‌شده روی بستر کلاژن بوده و پس از آن سلول‌های کشت‌شده بر روی بستر کلاژن-هپاران‌سولفات تکثیر بیشتری نسبت به سلول‌های سطح ظروف کشت دارند.

4- بحث

کبد یکی از اعضای مهم بدن است و کارکردهای بیولوژیک بسیاری شامل سنتز پروتئین‌های پلاسما، متابولیسم گلوکز و اسیدهای چرب و سمیت‌زدایی دارد. اکنون بیشتر بیماری‌های کبدی با پیوند کبد درمان می‌شود اما مشکلاتی همچون کمبود کبد اهدایی و رد پیوند، محققان را به فکر یافتن روش‌های دیگر انداخته است [27]. طی سه دهه‌ی گذشته، مهندسی بافت کبد امیدهای تازه‌ای برای روش درمانی جایگزین پیوند کبد ایجاد کرده است [27]. مطالعات بسیاری برای یافتن سلول‌های مناسب برای تمایز به هپاتوسیت و در نهایت ایجاد بافت کبد انجام شده است. سلول‌های بنیادی با قابلیت بالای تکثیر و تمایز، گزینه مناسبی محسوب می‌شوند. یافته‌های مختلف نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان قابلیت حرکت، مهاجرت و ترمیم بافت آسیب‌دیده را دارند [28]. تاکنون پتانسیل تمایز این سلول‌ها به سلول‌های شبه‌هپاتوسیت به‌وسیله‌ی محققان بسیاری تأیید شده است [23، 27، ، 30].

نتایج فلوسایتومتری برای شاخص‌های سطحی اختصاصی MSC و همچنین تمایز آن‌ها به سمت رده‌های سلولی استخوانی و چربی گویای ماهیت درست سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده‌شده در این مطالعه و نشان‌دهنده‌ی خلوص و آلوده‌نبودن آن‌ها به سلول‌های هماتوپویتیک است.

در مهندسی بافت، امیدوارکننده‌ترین نتایج بیشتر با شبیه‌سازی موفقیت‌آمیز محیط واقعی سلول‌ها به‌دست می‌آید. در این مطالعه نیز ساخت بستر کلاژن-هپاران‌سولفات برای شبیه‌سازی ECM بافت کبد انجام شد.

کلاژن نوع IV که در این مطالعه استفاده شد، یکی از پروتئین‌های اصلی ماتریکس خارج سلولی کبد است. هپاران‌سولفات، جزء دیگر ECM کبد نیز در فرایندهای فیزیولوژیک گوناگونی همچون مورفوژنز، ترمیم زخم، تنظیم رشد و تمایز سلولی و همچنین پایدارسازی ارتباط سلول- سلول و سلول- ماتریکس خارج سلولی نقش دارد [17، 20-22، 24-26، 31].

ساخت بستر کلاژن- هپاران‌سولفات نیازمند پوشش دادن سطح پلی‌استیرنی ظروف کشت با کلاژن و پس از آن تثبیت شیمیایی مولکول‌های هپاران‌سولفات روی کلاژن است که با اتصال گروه‌های فعال‌شده‌ی کربوکسیل هپاران‌سولفات به گروه‌های آمین آزاد کلاژن می‌شود. فعال‌کردن گروه‌های کربوکسیل با استفاده از EDC انجام شد. همان‌گونه که اشاره شد نتایج رنگ‌آمیزی سافرانین O بیانگر اتصال موفقیت‌آمیز HS به کلاژن است. به این ترتیب دو جزء مهم ECM طبیعی کبد، هم‌زمان در بستر ساخته‌شده به کار رفته است.

در تمایز کبدی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، مشکلی که بیشتر باعث کاهش کارایی تمایز می‌شود، کاهش چسبندگی سلولی، جدا شدن سلول‌ها از سطح کشت، مرگ سلولی و تکثیرنشدن سلول‌ها است [10]؛ بنابراین همواره پس از ساخت هر بستر تمایزی و پیش از بررسی رفتار تمایزی، مطالعه‌ی رفتارهای سلولی شامل چسبندگی و تکثیر روی آن‌ها انجام می‌شود تا از ایجادنشدن آثار بد روی چسبندگی و تکثیر، اطمینان حاصل شود [17، 25، 26].

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-31]

پس از ساخت ماتریکس کلاژن-هپاران‌سولفات، چسبندگی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان روی آن بررسی شد. نتایج بیانگر آن بود که چسبندگی سلولی روی بستر کلاژن IV، بیشترین مقدار را نشان می‌دهد (نمودار 1). سلول‌های کشت‌شده روی بستر کلاژن-هپاران‌سولفات از چسبندگی خوبی نسبت به پلی‌استیرن برخوردار بودند. اگرچه به‌نظر می‌رسد کاهش چسبندگی سلولی مشاهده‌شده در ماتریکس کلاژن-هپاران‌سولفات به‌خاطر پیش‌گیری زنجیره‌های هپاران‌سولفات متصل‌شده به مولکول‌های کلاژن باشد اما در مقایسه با سطح ظروف کشت معمولی، بستر مناسبی برای چسبندگی و تکثیر سلولی ایجاد می‌کند.

نتایج به‌دست‌آمده از بررسی تکثیر سلولی طی 8 روز با استفاده از دو روش شمارش سلولی و MTT نشان داد که بستر کلاژن، بیشترین میزان تکثیر سلولی را نشان می‌دهد. پس از آن، بستر کلاژن-هپاران‌سولفات بستر مناسب‌تری است. با توجه به شیب خط می‌توان گفت که تکثیر سلولی به ترتیب بر روی بسترهای کلاژنIV و کلاژنIV-هپاران‌سولفات بیش از سطح پلی‌استیرن است (نمودار2).

مطالعات نشان می‌دهد که کلاژن‌ها فراوان‌ترین پروتئین‌های سازنده‌ی ECM است. از میان آن‌ها، کلاژن نوع IV از اجزاء اصلی غشای پایه است که در تمایز سلول‌های بنیادی نقش دارد. یکی از اجزای عملکردی ECM، لامینین است که ویژگی‌های آن به‌خوبی شناسایی شده است. این پروتئین، به‌عنوان جزء ساختاری همه‌ی غشاهای پایه، قادر است به کلاژن نوع IV و غشای سلولی متصل شده و برهم‌کنش‌های سلول- ماتریکس را واسطه‌گری کند و سبب پیش‌برد چسبندگی سلولی شود. فیبرونکتین (از دیگر پروتئین‌های ECM) نیز گلیکوپروتئینی است که قادر به اتصال به کلاژن نوع IV است و در چسبندگی سلول، رشد و تمایز نقش دارد [32، 33]. با توجه به این که فیبرونکتین و لامینین هر دو در سرم استفاده‌شده برای کشت سلولی (FBS) وجود دارند، یکی از سازوکارهایی که سبب بهبود چسبندگی و تکثیر سلولی به‌وسیله ماتریکس کلاژن-هپاران‌سولفات شده است، به‌کارگیری لامینین و فیبرونکتین سرم به‌وسیله جزء کلاژنی، در ماتریکس شبیه‌سازی شده است؛ پس روش استفاده‌شده در این مطالعه توانست افزون بر به‌کارگیری هم‌زمان چند جزء موثر ECM کبد، شامل کلاژن، لامینین، فیبرونکتین و هپاران‌سولفات در یک بستر، رفتارهای سلولی را بهبود دهد.

همچنین تحقیقات پیشین بیانگر آن است که توالی‌هایی از کلاژن IV، لامینین و فیبرونکتین با برهم‌کنش با گیرنده‌های سلولی مختلف مانند اینتگرین‌ها، گیرنده‌های تیروزین کینازی و گیرنده‌های جفت‌شده با G-proteinها در چسبندگی، تکثیر و تمایز سلولی نقش دارند [32، 33].

در نهایت، نتایج این مطالعه نشان داد که ماتریکس کلاژنIV- هپاران‌سولفات ساخته‌شده، نه تنها اثر نامطلوبی بر چسبندگی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان ندارد؛ بلکه سبب بهبود چشم‌گیر آن‌ها در مقایسه با سطح ظروف کشت معمولی می‌شود.

با توجه به مزایای این بستر، مانند الگوبرداری از ECM طبیعی بافت کبد در ساخت آن و نیز آثار مثبت کلاژن و هپاران‌سولفات بر تمایز کبدی و تکثیر و چسبندگی سلولی مناسب‌تر، پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده، توانایی این بستر برای استفاده در تمایز کبدی بررسی شود.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-31]

جدول 1 مقایسه‌ی چسبندگی و تکثیر سلولی MSCs روی سطح ظروف کشت و بسترهای کلاژن IV و کلاژن IV- هپاران سولفات.

	سطح ظروف کشت	بستر کلاژن IV	بستر کلاژن IV- هپاران سولفات
چسبندگی سلولی	+	+++	++
تکثیر سلولی	+	+++	++

* میزان نشان داده شده به صورت +++ نسبت به ++ بیشتر و میزان ++ نسبت به + بیشتر می‌باشد

5- مراجع

[1] Mahboobe Ghaedi, N.T., Mark A. Zern, Jian Wub, Alexander Revzin, Bottom-up signaling from HGF-containing surfaces promotes hepatic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011. 407: 295–300.

[2] Duan Y, C.A., Meng Y, Yamamoto N, He S, Gupta S, Gambhir SS, Zern MA., Differentiation and enrichment of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells in vitro and in vivo. *Stem Cells*, 2007. 25: 3058-68.

[3] Gupt S, L.D., Shafritz DA, Mitogenic effects of hepatic stimulator substance on cultured nonparenchymal liver epithelial cells. *Hepatology*, 1992. 15: 485-91.

[4] Newsome P N, J.I., Boyle S, Dalakas E, Mcaulay KA, Samuel K, Rae F, Forrester L, Turner ML, Hayes PC, Harrison DJ, Bickmore WA, Plevris JN, Human cord blood-derived cells can differentiate into hepatocytes in the mouse liver with no evidence of cellular fusion. *Gastroenterology*, 2003. 124: 1891-1.

[5] Teramoto K, A.K., Kumashiro Y, Kakinuma S, Ryoko Chinzei R, Keiko Shimizu-Saito K, Tanaka Y, Hirobumi Teraoka H, Shigeki Arii S., Hepatocyte differentiation from embryonic stem cells and umbilical cord blood cells. *Hepatob Pancreat Dis*, 2005. 12: 196-202.

[6] Zavana B, B.P., Vindignib, V, Amadoric A, Habelerc W, pontissod P, Montemurroe D, Abatangeloa G, cortivoa R., Extracellular matrix-enriched polymeric scaffolds as a substrate for hepatocyte cultures: in vitro and in vivo studies. *Biomaterials*, 2005. 26: 7038-45.

[7] DH, P., Alpha-1-antitripsin deficiency: diagnosis and treatment. *Clin Liver Dis*, 2004. 8(4): 839-59.

[8] Khan AA, P.N., Mahaboob VS, Rajendraprasad A, Ravindraprakash HR, Venkateswarlu J, Treatment of Crigler-Najjar Syndrom type 1 by hepatic progenitor cell transplantation: a simple procedure for management of hyperbilirubinemia. *Transplant Proc*, 2008. 40(4): 1148-50.

[9] CM, H., stem cell in digestive disease. *Indian journal of Gastrology*, 2007. 26(1): 23-24.

[10] LA, L., Advances in Hepatocyte transplantation: a myth becomes reality. *J Clin Invest*, 2001. 108(3): 367-9.

[11] Strom S, R.F., Hepatocyte transplantation: new possibilities for therapy. *Gastroenterology*, 2003. 124(2): 568-71.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-31]

[12] Pournasr, B., et al., Liver Development and In vitro Differentiation of Embryonic Stem Cells to Hepatocytes. *Yakhteh Medical Journal*, 2010. 11(4): 348-373.

[13] Lorenzini S, G.S., Grandini E, Andreone P, Bernardi M, Stem cells for end stage liver disease: how far have we got? *World J Gastroenterol*, 2008. 14(29): 4593-9.

[14] Lysy PA, C.D., Smets F, Najimi M, Sokal EM, Stem cells for liver tissue repair: current knowledge and perspectives. *World J Gastroenterol*, 2008. 14(6): 864-75.

[15] MT, E.G.M., Cell-based therapies for metabolic liver disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2008. 95(1-2): 3-10.

[16] Kuo TK, H.S., Chuang CH, Chen CT, ShihYR, Fang SC, Lee OK, Stem Cell Therapy for Liver Disease: Parameters Governing the success of Using Bone Marrow Mesenchymal Stem cells. *Gastroenterology*, 2008. 134(7): 2111-21.

[17] Kazemnejad S, A.A., Soleimani M, Gharehbaghian A, Mohammadi Y, Amirizadeh N, Jazayery M, Biochemical and molecular characterization of hepatocyte-like cells derived from human bone marrow mesenchymal stem cells on a novel three-dimensional biocompatible nanofibrous scaffold. *J Gastroen Hepatol*, 2009. 24: 278-87.

[18] Alireza Khoshdel, A.S.L., Masoud Soleimani, Morteza Daliri, Ali Mota, Behzad Adibi, Evaluation of Biochemical Markers in Hepatocyte like Cells Differentiated from Adipose Derivation Stem Cells. *World Applied Sciences Journal*, 2012. 16(5): 693-698.

[19] Raufi, A., et al., In vitro differentiation of human umbilical vein mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green. *Scientific Journal of Iran Blood Transfusion Organization*, 2010. 7(1): 34-40.

[20] Dickinson LE , K.S., Gerecht S, Reconstructing the Differentiation Niche of Embryonic Stem Cells Using Biomaterials. *Macromol Biosci*, 2011. 11(1): 36-49.

[21] GK, M., Liver Regeneration. *J Cell Physiol*, 2007. 213: 286-300.

[22] Lee JY, J.C., Zern MA, Revzin A, Analysis of Local Tissue-Specific Gene Expression in Cellular Micropatterns. *Biomaterials*, 2006. 78: 8305-8312.

[23] Snykers S, V.T., Becker A, Papeleu P, Vinken M, Chromatin remodeling agent trichostatin A: a key-factor in the hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells derived of adult bone marrow BMC. *Dev Biol*, 2007. 7: 24-39.

[24] Solanki, A.S., S. Memoli, K. A. Park, S. Y. Hong, S. Lee, K. B., Controlling differentiation of neural stem cells using extracellular matrix protein patterns. *Small*, 2010. 6(22): 2509-13.

[25] Tierney, C., Jaasma MJ, O'Brien FJ, Osteoblast activity on collagen-GAG

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-31]

scaffolds is affected by collagen and GAG concentrations. *J Biomed Mater*, 2008. 91: 92-10.

[26] Uygun BE, S.S., Matthew HWT, Effects of Immobilized Glycosaminoglycans on the Proliferation and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng*, 2009. 141: 7-12.

[27] Chen ML, L.K., Huang HC, Tsai YL, Wu YC, Kuo TM, Hu CP, Chang C, HNF-4α determines hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells from bone marrow. *World J Gasteroentro*, 2010. 16(40): 5092-103.

[28] Neuss S, B.E., Woltje M, Tietze L, Jahnen-Dechent W, Functional expression of HGF and HGF receptor/ c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization tissue repair and wound healing. *Stem cells*, 2004. 22: 405-14.

[29] Lee KD, K.T., Whang-Peng J, Chung YE, Lin CT, In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology*, 2004. 40: 1275-84.

[30] Lou S, G.P., Chen F, He C, Wang M, Lu C, The effect of bone marrow stromal cells on neuronal differentiation of mesencephalic neural stem cells in Spraguee Dawley rats. *Brain Res*, 2003. 1: 114-121.

[31] Schwartz RE, R.M., Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest*, 2002. 109(10): 1291-302.

[32] Castro-Sanchez L, S.-G.A., Navarro-Tito N, Martinez-Orozco R, Salazar EP, Native type IV collagen induces cell migration through a CD9 and DDR1-dependent pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Eur J Cell Biol*, 2010. 89: 843-52.

[33] Choi BH, Y.S.C.Y., Kang DG, Kim BJ, Song YH, Cha HJ, Cell behavior on extracellular matrix mimic materials based on mussel adhesive protein fused with functional peptides. *Biomaterials*, 2010. 31: 8980-88.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-31]