

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

سحر خواجه¹، عباس صاحبقدم لطفی^{2*}، وحید رزبان³، افشین محسنی فر⁴، مسعود سلیمانی⁵

- 1- کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی 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 14965-161، تهران، ایران

lotfi-ab@nigeb.ac.ir

(دریافت مقاله: 91/1/13، پذیرش: 91/10/1)

چکیده - بیشتر بیماران کبدی مدت زیادی متظر 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 تهیه بستر کلاژن-گلیکوزآمینوگلیکان، مولکول‌های هپاران‌سولفات، به صورت کووالان به وسیله 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.

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 کبد¹ به عنوان 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 هیپاتوسیت‌های جدا شده از کبد به عنوان درمان سریع‌تر و جایگزین پیوند کبد روی آورده‌اند. مزیت این روش این است که می‌توان از سلول‌های جدا شده از یک کبد اهدایی برای پیوند به چند بیمار استفاده کرد [7, 8]. اما از مشکلات این روش، سختی جداسازی و نگهداری سلول‌های هیپاتوسیت، تکثیر کم آن‌ها، واکنش سیستم ایمنی و احتمال رد سلول‌های پیوند شده 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 سلول‌های بنیادی بوده و این سلول‌ها می‌توانند به سلول‌های گوناگون از جمله هیپاتوسیت تمایز پیدا کنند، از دیدگاه درمانی بسیار مورد توجه است [16-19].

افزون بر نوع سلول، استفاده از بسترهای³ 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 به وسیله 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- گلیکوزامینوگلیکان⁵ (GAG) است که کاربرد وسیعی در مهندسی بافت دارد. بسترهای کلاژن- گلیکوزامینوگلیکان، بیشتر شرایط را به عنوان ماتریکس در [مهندسی بافت] دارند. برخی از این شرایط عبارت است از: سازگاری زیستی⁶، قابلیت تخریب در محیط زنده⁷، 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

4. Extra cellular matrix
5. Glycosaminoglycan
6. Biocompatible
7. Biodegradable

1. Liver-tissue engineering
2. Mesenchymal stem cells
3. Matrices

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 کتراست مشاهده شدند.

برای تمایز ادیپوزنیک 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 24 خانه 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 پروتئین 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-هپاران سولفات محلولی به غلظت 1 میکروگرم/میکرولیتر از هپاران سولفات

می‌کند؛ تمایز کبدی سلول‌های بنیادی روی آن به وسیله‌ی 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 هپاران سولفات، 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-هپاران سولفات 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 FITC¹ 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

1. Fluorescent isothiocyanate

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 تشکیل شده به خوبی به وسیله پیپتاژ کردن، محلول شد و OD محلول داخل هر چاهک در طول موج 570 nm با دستگاه الیزا ریدر خوانده شد. میانگین OD نمونه‌ها و میزان انحراف میانگین آن‌ها به دست آمد. این OD متناسب با تعداد سلول زنده داخل هر چاهک است.

viability = $100 \times$ میانگین کنترل / میانگین نمونه‌ها
 برای بررسی تکرارپذیری نتایج به دست آمده، آزمایش‌ها روی سلول‌های سه فرد دهنده‌ی سالم انجام شد. داده‌های به دست آمده از سه بار تکرار آزمایش با استفاده از تست ANOVA ارزیابی و به صورت میانگین \pm SEM² 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 حالی که شاخص‌های اختصاصی سلول‌های هماتوپوئیتیک، CD34 و CD31، بیان چندانی نداشتند (شکل 1). نتایج فلوسایتمتری نشان‌دهنده‌ی کیفیت خوب سلول‌های استفاده‌شده و آلوده‌نبودن آن‌ها به سلول‌های هماتوپوئیتیک است.

(شرکت Sigma) تهیه و با محلول EDC¹ (شرکت Fluka) مخلوط شد به گونه‌ای که تعداد مول EDC به کار رفته، دو برابر تعداد مول هیپاران‌سولفات بود. پس از 15 دقیقه انکوباسیون، این محلول در چاهک‌های پلیت 24-خانه حاوی کلاژن پوشش داده‌شده ریخته (10 میکروگرم هیپاران‌سولفات برای هر چاهک) و 24 ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. پس از این مدت، چاهک‌ها 3 بار با PBS شسته شدند.

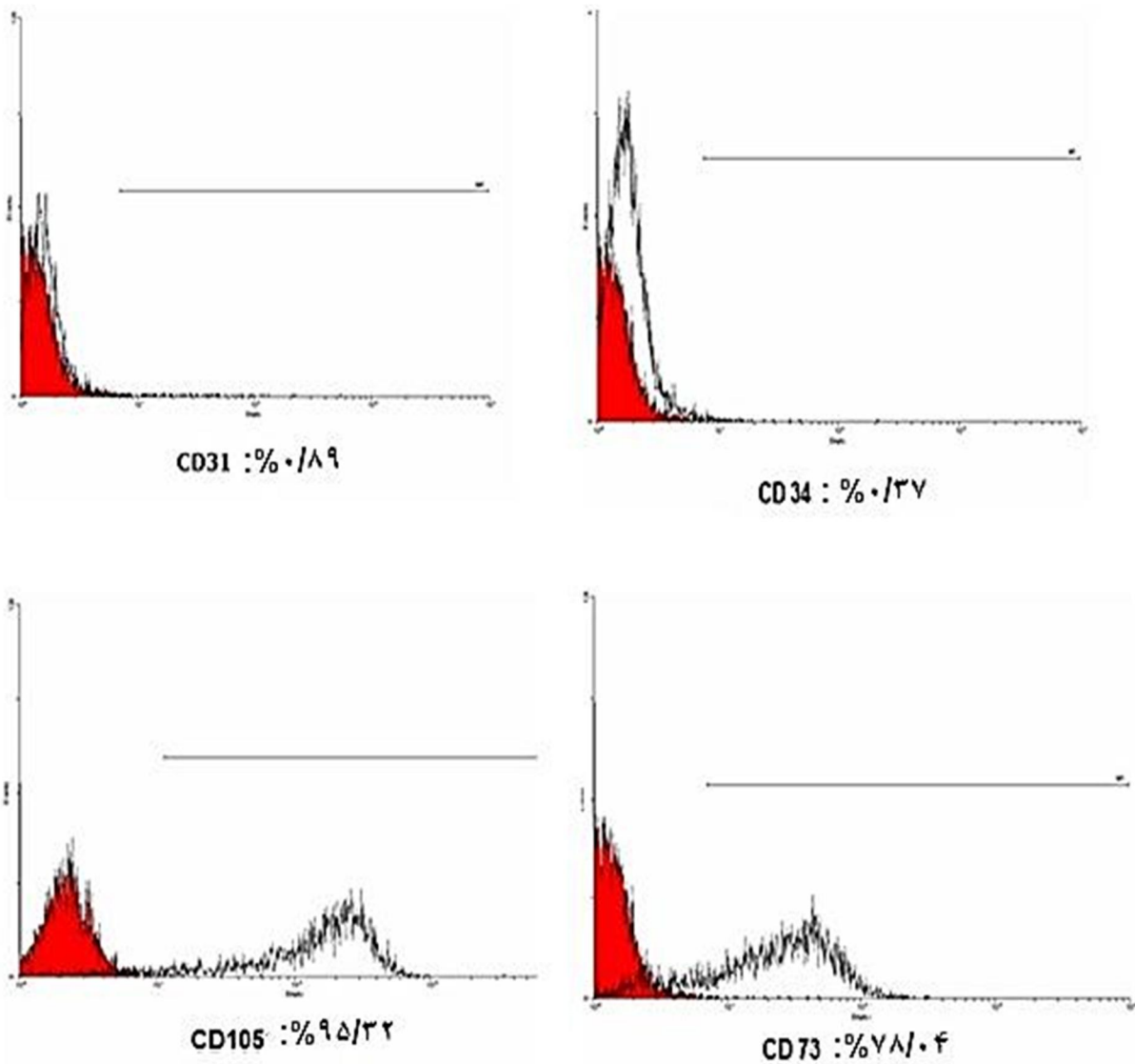
برای اندازه‌گیری مقدار هیپاران‌سولفات متصل شده به کلاژن از رنگ‌آمیزی safranin o استفاده شد. 30 میکرولیتر از محلول حاوی هیپاران‌سولفات قبل و بعد از انجام واکنش با 240 میکرولیتر محلول safranin o (0/4 میلی‌گرم / میلی‌لیتر در بافر استات سدیم 50 میلی‌مولار با PH=7) مخلوط و میزان جذب محلول به دست آمده در طول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

برای بررسی چسبندگی سلول روی بستر، ابتدا محیط کشت حاوی تعداد 2×10^4 سلول در هر چاهک پلیت 4-خانه روی بسترهای مورد نظر ریخته شد. میزان چسبندگی سلولی پس از 1 ساعت ارزیابی شد؛ به این صورت 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 به صورت محلول در آمد. پس از آن‌که

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

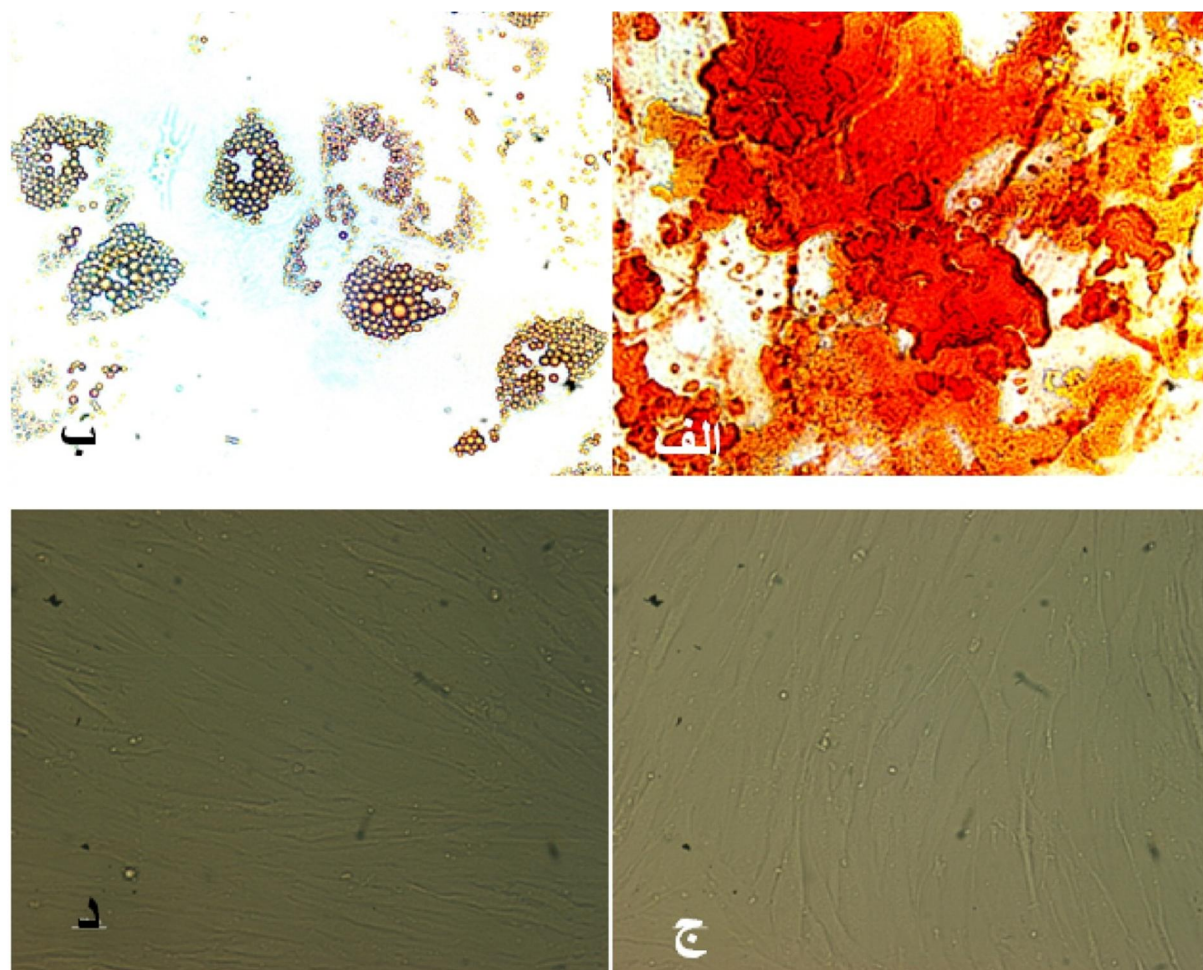
2. Standard Error of Mean



شکل 1 بررسی بیان شاخص‌های سطحی سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان انسان به روش فلوسایتومتری. برای تأیید خلوص و ماهیت سلول‌های بنیادی مزانشیمی، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال نشان‌دار شده با FITC علیه CD34، CD105، CD73 و آنتی‌بادی نشان‌دار شده با PE، علیه CD31 استفاده شد.

سلول‌های استخوانی است. تشکیل قطرات چربی که پس از رنگ آمیزی oil red به رنگ نارنجی مشاهده می‌شوند، در سلول‌های تمایز یافته به سمت ادیوسیت مشاهده شد (شکل 2).

رنگ آمیزی اختصاصی Alizarin red نشان‌دهنده وجود رسوب کلسیم در سلول‌های تمایز داده شده به سمت سلول‌های استخوانی بود که از ویژگی‌های

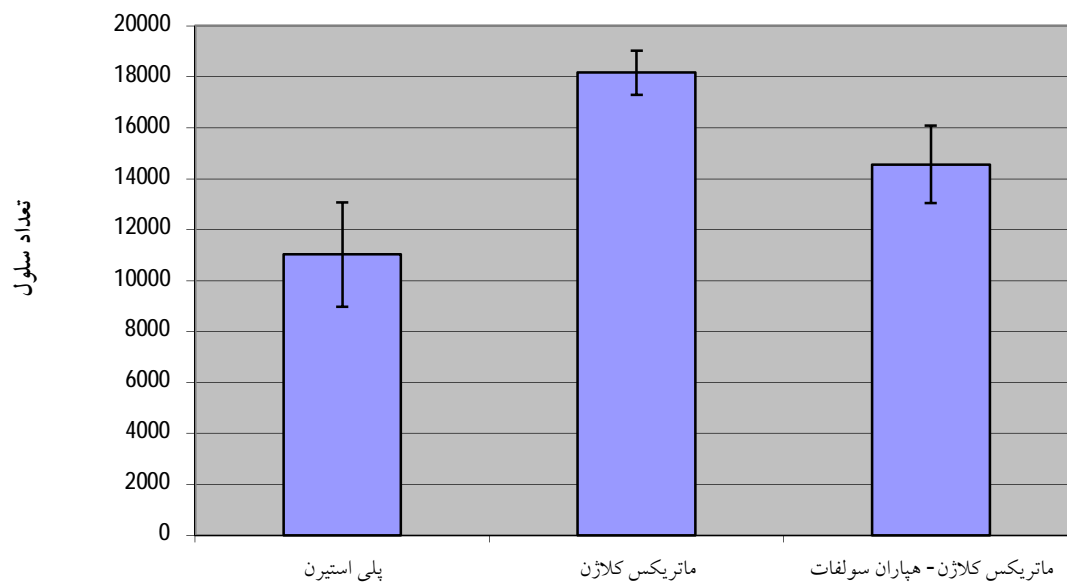


شکل 2 تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سمت سلول‌های استخوانی (الف) و چربی (ب). در تمایز سلول‌ها به سمت سلول‌های استخوانی، رسوب کلسیم رنگ‌آمیزی اختصاصی Alizarin red به رنگ قرمز مشاهده می‌شود. در تمایز سلول‌ها به سمت سلول‌های چربی، قطرات چربی به وجود آمده پس از رنگ‌آمیزی اختصاصی Oil red، به رنگ نارنجی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

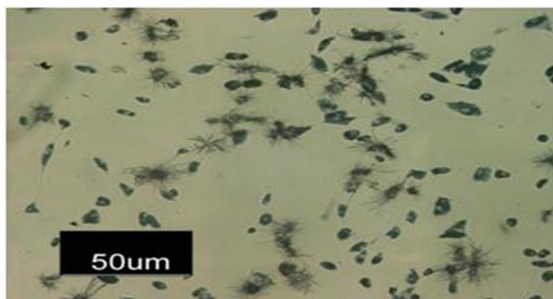
میزان چسبندگی سلولی (برحسب cell number/ well) روی بسترهای مطالعه‌شده و همچنین سطح ظروف کشت معمولی پس از گذشت 1 ساعت از کشت آن‌ها به روش تریپسین کردن و شمارش به وسیله لام نئوبار بررسی شد (نمودار 1). نتایج بیانگر آن بود که بیشترین میزان چسبندگی سلولی مربوط به بستر کلاژن و پس از آن بستر کلاژن-هیپران سولفات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

نتایج اسپکتروفتومتری در ساخت بستر کلاژن نشان داد که این پروتئین حدود $10 \mu\text{g}$ در هر چاهک پوشش یافته است. همچنین نتایج رنگ‌آمیزی safranin و اسپکتروفتومتری در تثبیت هیپران سولفات به وسیله EDC، بیانگر آن بود که حدود $7 \mu\text{g}$ از این گلیکوزآمینوگلیکان در هر چاهک تثبیت شده است.

چسبندگی سلولی



نمودار 1 چسبندگی MSCs روی بسترهای کلاژن و کلاژن-هپاران سولفات در مقایسه با سطح پلی استیرین

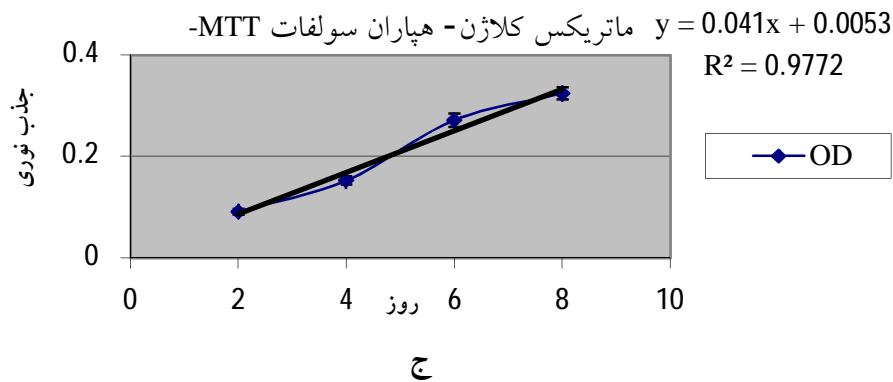
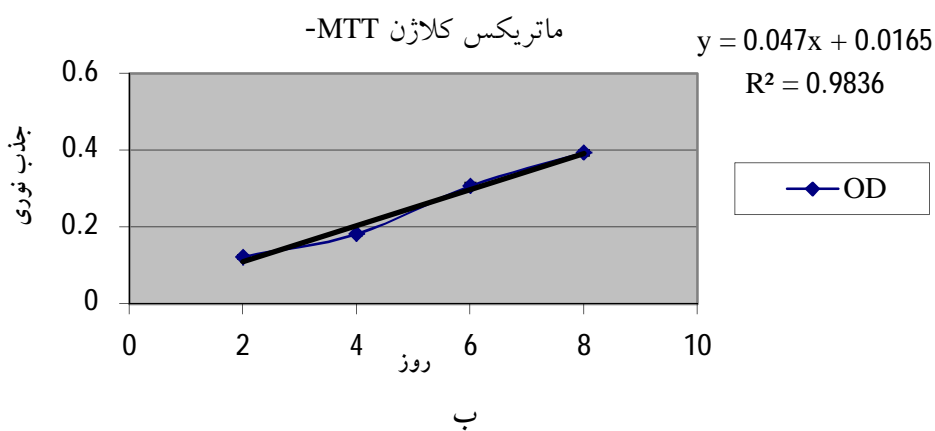
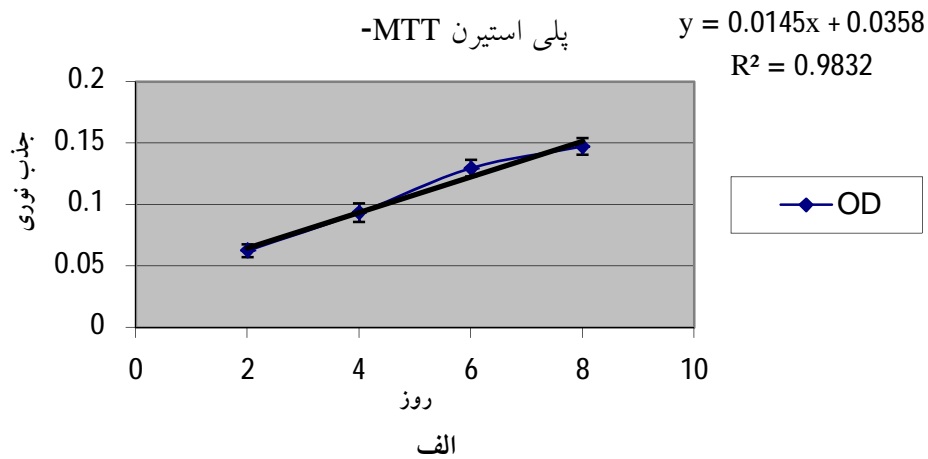


شکل 3 تشکیل کریستال‌های فورمازان در اثر واکنش معرف MTT با MSCs

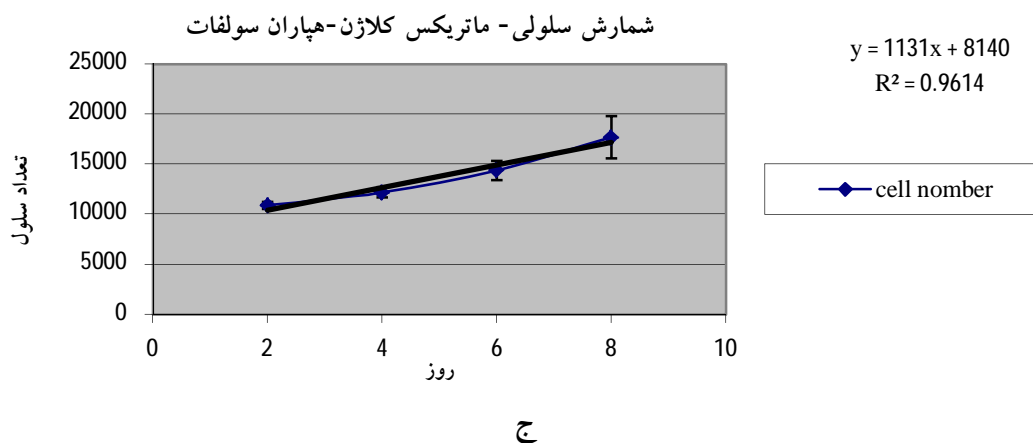
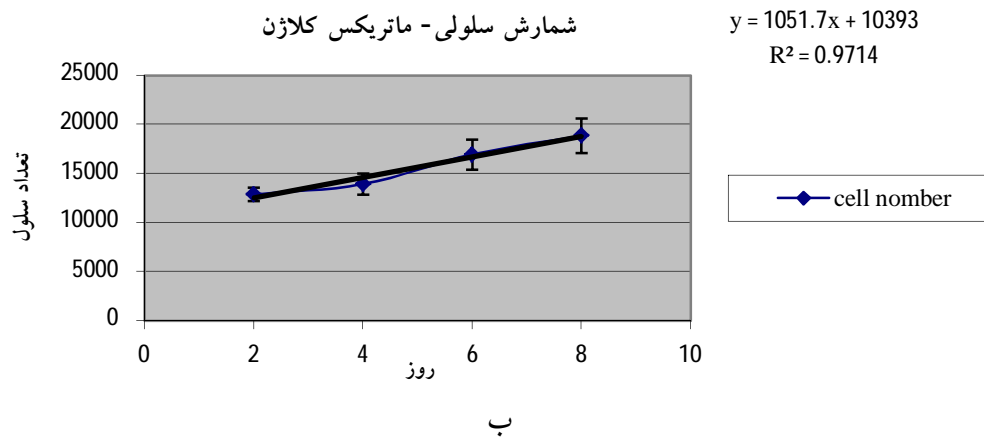
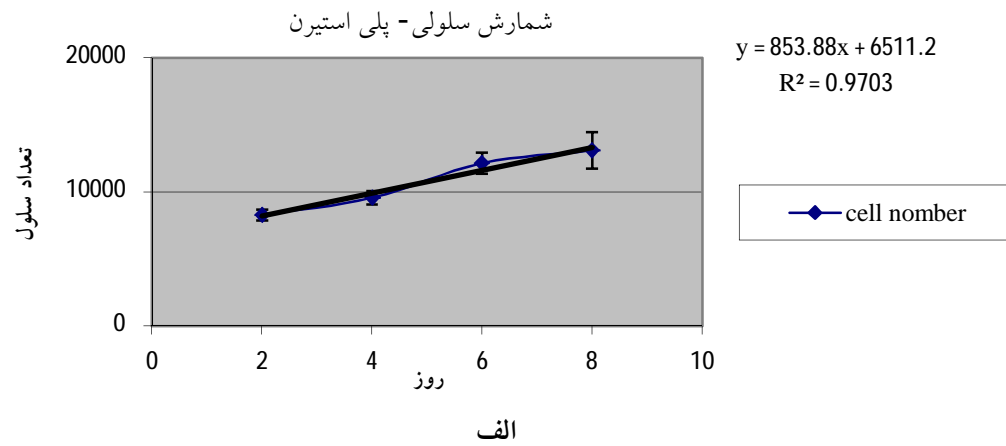
کریستال‌های فورمازان پس از اضافه کردن DMSO به سلول‌ها در انتهای آزمایش MTT تشکیل می‌شوند.

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 کشت شده روی آن‌ها است.



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



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

در مهندسی بافت، امیدوارکننده‌ترین نتایج بیشتر با شبیه‌سازی موفقیت‌آمیز محیط واقعی سلول‌ها به دست 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. فعال کردن 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 تکثیر نشدن 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 ایجاد نشدن آثار بد روی چسبندگی و تکثیر، اطمینان حاصل شود [17، 25، 26].

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 چربی‌گویای ماهیت درست سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده‌شده در این مطالعه و نشان‌دهنده‌ی خلوص و آلوده‌نبودن آن‌ها به سلول‌های هماتوپوئیتیک است.

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 استفاده شده برای کشت سلولی (FBS) وجود دارند، یکی از سازوکارهایی که سبب بهبود چسبندگی و تکثیر سلولی به وسیله ماتریکس کلاژن-هپاران سولفات شده است، به کارگیری لامینین و فیبرونکتین سرم به وسیله جزء کلاژنی، در ماتریکس شبیه سازی شده است؛ پس روش استفاده شده در این مطالعه توانست افزون بر به کارگیری هم زمان چند جزء موثر ECM کبد، شامل کلاژن، لامینین، فیبرونکتین و هپاران سولفات در یک بستر، رفتارهای سلولی را بهبود دهد.

همچنین تحقیقات پیشین بیانگر آن است که توالی هایی از کلاژن IV، لامینین و فیبرونکتین با برهم کنش با گیرنده های سلولی مختلف مانند اینتگرین ها، گیرنده های تیروزین کینازی و گیرنده های جفت شده با G-protein ها در چسبندگی، تکثیر و تمایز سلولی نقش دارند [32، 33].

در نهایت، نتایج این مطالعه نشان داد که ماتریکس کلاژن IV- هپاران سولفات ساخته شده، نه تنها اثر نامطلوبی بر چسبندگی و تکثیر سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان ندارد؛ بلکه سبب بهبود چشم گیر آن ها در مقایسه با سطح ظروف کشت معمولی می شود.

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

پس از ساخت ماتریکس کلاژن-هپاران سولفات، چسبندگی سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان روی آن بررسی شد. نتایج بیانگر آن بود که چسبندگی سلولی روی بستر کلاژن IV، بیشترین مقدار را نشان می دهد (نمودار 1). سلول های کشت شده روی بستر کلاژن-هپاران سولفات از چسبندگی خوبی نسبت به پلی استیرین برخوردار بودند. اگرچه به نظر می رسد کاهش چسبندگی سلولی مشاهده شده در ماتریکس کلاژن-هپاران سولفات به خاطر پیش گیری زنجیره های هپاران سولفات متصل شده به مولکول های کلاژن باشد اما در مقایسه با سطح ظروف کشت معمولی، بستر مناسبی برای چسبندگی و تکثیر سلولی ایجاد می کند.

نتایج به دست آمده 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 می دهد. پس از آن، بستر کلاژن-هپاران سولفات بستر مناسب تری است. با توجه به شیب خط می توان گفت که تکثیر سلولی به ترتیب بر روی بسترهای کلاژن IV و کلاژن IV-هپاران سولفات بیش از سطح پلی استیرین است (نمودار 2).

مطالعات نشان می دهد که کلاژن ها فراوان ترین پروتئین های سازنده ی ECM است. از میان آن ها، کلاژن نوع IV از اجزاء اصلی غشای پایه است که در تمایز سلول های بنیادی نقش دارد. یکی از اجزای عملکردی ECM، لامینین است که ویژگی های آن به خوبی شناسایی شده است. این پروتئین، به عنوان جزء ساختاری همه ی غشاهای پایه، قادر است به کلاژن نوع IV و غشای سلولی متصل شده و برهم کنش های سلول-ماتریکس را واسطه گری کند و سبب پیش برد چسبندگی سلولی شود. فیبرونکتین (از دیگر پروتئین های ECM) نیز

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, Abatangloea 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, Ravindrakrishna 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.

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

- 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
- [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, Amirzadeh N, Jazayeri 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

- 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 Sprague 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.
- 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-4 α determines hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells from bone marrow. *World J Gastroenterol*, 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