تولیدات دامی

دوره ۲۰ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۷

صفحه‌های ۳۴۹-۳۳۹

مطالعه اثر داربست پلی-ال-لاکتیک-اسید در تمایز استخوانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداشده از بافت چربی اسب

بهناز بگشلوی افشار[۱]، رضا راه چمنی[۲*]، عبدالله محمدی سنگ‌چشمه[۳]، احسان سیدجعفری[۴]، یوسف مصطفی‌لو[۲]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران.

۲. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران.

۳. استادیار، گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران.

۴. استادیار، گروه زیست فناوری، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۵/۰۵/۰۲۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۳/۰۶

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی امکان جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی اسب و مطالعه بازده تمایز استخوانی این سلول‌ها در شرایط کشت تک بعدی (در ظرف کشت بافت پلاستیکی) و سه بعدی (روی داربست های پلی-ال-لاکتیک-اسید) بود. بافت چربی به روش بیوپسی از ناحیه قاعده دم اسب تهیه و سلول‌های بنیادی مزانشیمی با کمک هضم مکانیکی و آنزیمی از بافت چربی جدا شد. سلول‌ها بنیادی جداشده، در دو شرایط جداگانه شامل شرایط ظرف کشت بافت پلاستیکی (گروه شاهد) و شرایط داربست پلی-ال-لاکتیک-اسید با سه تکرار، به رده استخوان تمایز داده شدند. در طول ۲۱ روز تمایز آزمون‌های آلیزارین رد، اندازه‌گیری آنزیم آلکالین‌فسفاتاز و اندازه‌گیری میزان کلسیم رسوبی برای ارزیابی راندمان هر یک از این شرایط در تمایز سلول‌ها به رده استخوان مورد استفاده قرارگرفت. داده‌های حاصل در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه شدند. رنگ‌آمیزی آلیزارین رد به‌عنوان یک آزمون کیفی نشان داد در هر دو شرایط سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از بافت چربی اسب می‌توانند به رده استخوان تمایز یابند. با این حال سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت داده شده روی داربست پلی-ال-لاکتیک-اسید در مقایسه با سلول‌های کشت داده شده در شرایط ظرف کشت بافت پلاستیکی دارای فعالیت آنزیم آلکالین‌فسفاتاز و مقدار کلسیم رسوبی بیشتری بودند. یافته‌های این مطالعه نشان داد استفاده از داربست‌های پلی-ال-لاکتیک-اسید امکان رشد و تمایز بهینه سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از بافت چربی اسب را به رده استخوانی فراهم می‌سازد.

کلیدواژه‌ها: بافت چربی، پلی-ال-لاکتیک-اسید، تمایز استخوانی، داربست، سلول‌های بنیادی مزانشیمی.

* نویسنده مسئول

Email: r_rahchamani@yahoo.com

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی با توجه به داشتن ویژگی‌هایی نظیر توانایی تمایز به رده‌های مختلف، در دسترس بودن نسبی و قابلیت تکثیر گسترده بدون از دست دادن قدرت تمایزی، به‌عنوان منبع سلولی قابل‌توجهی برای سلول‌درمانی به‌خصوص برای افراد مسن می‌باشند [۱، ٤ و ٦].

برای اولین بار جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی اسب را گزارش کردند. پس از آن گزارش‌های دیگری با موضوع تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی اسب منتشر شد [۲۳ و ۱۲]. به‌منظور جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی از خاصیت چسبندگی این سلول‌ها به سطوح پلاستیکی استفاده شده است [۱۰]. با این روش سلول‌های بنیادی مزانشیمی از جانوران گوناگونی مانند موش [۱۳]، موش صحرایی [۲]، گربه، سگ [١٤]، خرگوش [١٥]، شتر [۲۰]، خوک [١٦]، بابون و انسان [۹] استخراج شده است.

سلول‌ها در کشت دو بعدی نمی‌توانند جهت‌گیری مناسب و سه بعدی را به‌دست‌آورند [٥ و ۲۲]. برای بهتر شدن اتصال و کلونی‌زایی سلول‌ها و نیز افزایش کارایی کشت، نیاز به کشت سه بعدی است. درنتیجه می‌توان رفتار سلول‌ها را در این نوع کشت ارزیابی و بررسی کرده و آن را به شرایط تنی (in vivo) تعمیم داد [٢٤ و ١٧].

یکی از اساس‌ترین قسمت‌های مهندسی بافت، داربست‌های زیست‌تخریب‌پذیر هستند. داربست‌ها بستری متخلخل می‌باشند که رشد سلول‌ها را به سمت تشکیل بافت موردنظر جهت می‌دهند. یک داربست پلیمری مناسب برای کاربردهای مهندسی بافت باید چندین ویژگی کلی مانند تخلخل بالا، سطح تماس بالا و استحکام ساختاری داشته باشد [١٦]. عملکرد داربست، هدایت، رشد و مهاجرت سلول می‌باشد [۱۸ و ۸].

جنس داربست نقش مهمی در رشد سلول و ایجاد سطح مورد نیاز برای چسبندگی سلولی ایفا می‌کند. پلی‌استرهای آلیفاتیک یکی از پرمصرف‌ترین پلی‌مرهای زیست‌تخریب‌پذیر هستند. پلی–ال–لاکتیک–اسید، یک پلی‌استر آلیفاتیک خطی است و باتوجه به زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری ذاتی خود و همچنین با توجه به‌اینکه در داخل بدن ظرف مدت ۲–٦ ماه تخریب می‌شود یک داربست مطلوب برای ترمیم استخوان است [۷، ۲۱ و ۲۲].

هدف از این مطالعه بررسی امکان جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی اسب و مطالعه بازده تمایز استخوانی این سلول‌ها در شرایط کشت تک بعدی (در ظرف کشت بافت پلاستیکی) و سه بعدی (روی داربست‌های پلی–ال–لاکتیک–اسید) بود.

مواد و روش‌ها

بافت چربی از قاعده دم سه راس اسب پس از ایجاد بی‌حسی موضعی با تزریق ۳۰ سی‌سی لیدوکائین دو درصد در بیمارستان دامپزشکی دانشگاه تهران بیوپسی شد. حدود دو تا سه گرم از بافت چربی از هر حیوان استحصال شد و به لوله فالکون حاوی محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) همراه با ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین–استرپتومایسین به آزمایشگاه انتقال داده شد.

در آزمایشگاه بافت چربی با استفاده از قیچی استریل به قطعات کوچک قطعه‌قطعه شد و سپس به آن شش میلی‌لیتر آنزیم کلاژناز به‌مدت ۲۰ دقیقه اضافه شد. پس از آن بافت چربی به‌همراه محیط حاوی آنزیم کلاژناز در لوله فالکون قرار گرفت و به‌مدت پنج دقیقه در دور ۱۲۰۰×rpm سانتریفیوژ شد. محیط بالایی به آرامی برداشته و دور ریخته شد و رسوب پایینی به داخل

فلاسک مخصوص کشت سلول (TCP) در محیط DMEM با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) منتقل شد. این فلاسک در انکوباتور قرار گرفت و در شرایط ۳۷ سانتی‌گراد و پنج درصد دی‌اکسیدکربن کشت داده شد. پس از ۲٤ ساعت محیط کشت تعویض شد و سلول‌هایی که به سطح فلاسک مخصوص کشت سلول چسبیدند به‌عنوان سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای آزمایش‌های این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند.

رشد سلول‌ها هر ۲٤ ساعت زیر میکروسکوپ نوری ارزیابی شد و هر زمان سلول‌ها ۸۰ درصد از سطح فلاسک مخصوص کشت سلول را پر کردند با استفاده از آنزیم تریپسین از سطح فلاسک جدا شدند و در فلاسک‌های جدید با محیط کشت تازه قرار گرفتند و به‌عبارتی پاساژ داده شدند [۲٤].

داربست پلی-ال-لاکتیک-اسید به‌روش الکتروریسی ساخته شد. به این منظور از دستگاه الکتروریسی ساخت کشور ایران در آزمایشگاه مهندسی بافت دانشگاه تهران که شامل یک پمپ سرنگی برای تزریق محلول پلیمری و یک منبع تولید ولتاژ قوی بین صفحه جمع‌کننده و پمپ تغذیه می‌باشد، استفاده شد. ابتدا پلیمر پلی-ال- لاکتیک-اسید(سیگما، آلمان) در حلال کلروفرم و دی متیل فرمالدهید (مرک، آلمان) کاملاً حل شد. سپس محلول الکتروریسی در سرنگ پنج میلی‌لیتری قرار گرفت. سوزن سرنگ به جریان ولتاژ و الکترود بعدی به سطح ورق آلومینیومی جمع کننده متصل شد و سپس ولتاژ قوی ۲۰ کیلو ولت ایجاد گردید. نانوالیاف تشکیل شده بر روی صفحه جمع‌کننده که در فاصله ۱۵ سانتی‌متری از نوک سوزن قرار داشت، جمع‌آوری شد [۱۱].

الکتروریسی در محیط آزمایشگاه با دمای حدود ۲۵ سانتی‌گراد و طی شش ساعت انجام گرفت. معمولاً جهت افزایش چسبندگی سلول‌ها به سطح داربست از تکنیک تیمار پلاسما استفاده می‌شود. در این مطالعه تیمار با پلاسما توسط اکسیژن تحت فشار ۰/٤ میلی‌بار و به‌مدت چهار دقیقه انجام شد. جهت مطالعه ساختار نانو الیاف و ارزیابی مورفولوژی داربست نانوفیبری پلی-ال-لاکتیک-اسید، از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی در آزمایشگاه فیزیک دانشگاه امیرکبیر استفاده شد. در روند بررسی این میکروسکوپ لازم است که نمونه‌ها با لایه نازکی از طلا ۹۹ درصد پوشش داده می‌شوند.

برای همه آزمایش‌های این مطالعه از پاساژ سه سلول‌های بنیادی مزانشیمی برگرفته از بافت چربی اسب استفاده شد. به‌منظور ارزیابی میزان رشد و چسبندگی سلول‌ها، تعداد ۱۰ هزار سلول در هر چاهک پلیت ۲٤ خانه کشت داده شد و در روزهای سه، پنج و هفت به چاهک‌های مربوطه مقدار ۲۰۰ میکرولیتر محلول نمک تترازولیوم (MTT) اضافه شد و پلیت به‌مدت سه ساعت در انکوباتور قرار گرفت. در این آزمون نمک زرد تترازولیوم به‌وسیله سلول‌های زنده جذب شد و کریستال‌های بنفش رنگ نامحلول فرمازان تشکیل شد که با افزودن یک شوینده حل شد. این رنگ با روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۷۰ نانومتر سنجش و اندازه‌گیری شد. برای هر نوع سلول یک رابطه خطی میان تعداد سلول‌ها و میزان جذب اندازه‌گیری شده وجود دارد که این رابطه امکان تعیین دقیق هرگونه تغییرات در میزان تکثیر سلول‌ها را فراهم می‌سازد [۱۲].

برای مطالعه آزمایش‌های مرتبط با القا، تعداد ۱۰ هزار سلول بنیادی مزانشیمی به هر چاهک پلیت ۲٤ خانه انتقال یافت و سلول‌ها پس از ۲٤ ساعت انکوباسیون تحت تأثیر فاکتورهای القاکننده تمایز استخوانی قرار گرفتند. این فاکتورها شامل دگزامتازون با غلظت ۱۰۰ نانومولار، اسیدآسکوربیک با غلظت ۰/۲ میلی‌مولار و بتاگلیسروفسفات با غلظت ۱۰ میلی‌مولار بودند. تمایز

سلول‌ها در شرایط ذکرشده به‌مدت ۲۱ روز انجام شد و هر سه روز یک بار تعویض محیط کشت انجام شد.

مطالعه ذخایر کلسیمی ایجادشده طی تمایز به رده استخوانی بسیار حائز اهمیت است. برای این منظور از رنگ‌آمیزی آلیزارین رد در روزهای هفت، ۱٤ و ۲۱ استفاده شد. مقدار ۲۵۰ میکرولیتر رنگ آلیزارین رد به هر چاهک اضافه شد و ۱۰ دقیقه پلیت‌های محتوی سلول‌های در حال تمایز در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس سلول‌ها با میکروسکوپ نوری معکوس ارزیابی شدند.

افزایش فعالیت آنزیم آلکالین‌فسفاتاز می‌تواند یکی از نشانه‌های تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به رده استخوانی باشد. جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آلکالین‌فسفاتاز در روزهای هفت، ۱٤ و ۲۱، ابتدا کل پروتئین‌های سلول‌های روی فلاسک مخصوص کشت سلول (گروه شاهد) و روی داربست (گروه تیمار) با استفاده از ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده استخراج شد. سپس فعالیت این آنزیم با استفاده از کیت مخصوص ساخت شرکت پارس آزمون اندازه‌گیری و در طول موج ٤۵۰ نانومتر خوانده شد [۱۲].

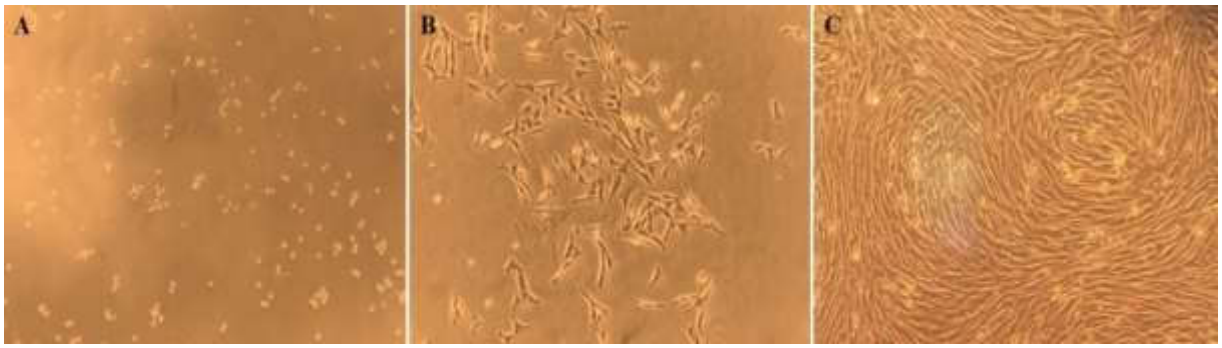
برای اندازه‌گیری رسوبات کلسیمی خارج سلولی ایجادشده طی فرایند تمایز در روزهای هفت، ۱٤ و ۲۱، ابتدا تمام نمک‌های معدنی رسوب کرده توسط اسید کلریدریک ۰/٦ نرمال استخراج گردید. سپس برای اندازه‌گیری میزان کلسیم از کیت تجاری شرکت پارس آزمون استفاده شد.

داده‌های حاصل بااستفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۱ (SPSS, IL, USA) در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه و میانگین‌ها به کمک آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) در سطح معنی‌داری پنج درصد مقایسه شدند.

نتایج و بحث

رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی در فلاسک مخصوص کشت سلول مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۱).

شکل ۱–A رسوب پایینی به‌دست آمده بافت چربی پس از هضم آنزیمی (به‌وسیله آنزیم کلاژناز) و سپس سانتریفیوژ کردن را نشان می‌دهد که به‌همراه محیط کشت DMEM به فلاسک مخصوص کشت سلول منتقل شده است. شکل ۱–B سلول بنیادی مزانشیمی جداشده از بافت چربی اسب را نشان می‌دهد که پس از مدت ۳ روز به کف فلاسک مخصوص کشت سلول چسبیده‌اند و مورفولوژی دوکی و چندوجهی خود را داشته و فاز رشد را سپری می‌کنند تا بیشتر سطح فلاسک را پر کنند (شکل ۱–C).

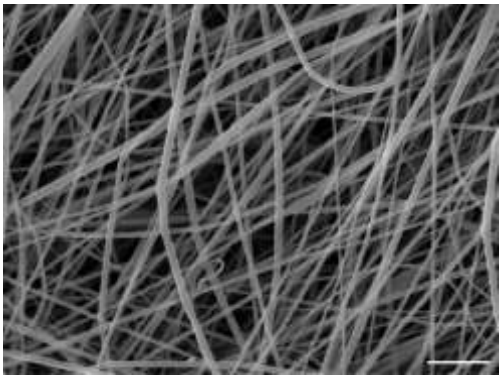


شکل ۱. مورفولوژی و مراحل افزایش سلول‌ها و پرکردن کل سطح فلاسک کشت سلول طی پاساژ سه. A) یک ساعت پس از ریختن سلول‌ها بر روی فلاسک، سلول‌ها هنوز به کف فلاسک نچسبیده‌اند. B) سلول‌ها پس از ٢٤ ساعت، تعداد کمی از سلول‌ها به کف فلاسک چسبیده‌اند. C) پس از هشت روز، سلول‌ها رشد کردند و سطح فلاسک را پرکردند.

شکل ۲ مورفولوژی داربست پلی-ال-لاکتیک-اسید را با استفاده از تصاویر به‌دست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان می‌دهد. این تصاویر نشان می‌دهد داربست ساخته‌شده در این مطالعه ساختار فیبری پیوسته و یکنواخت داشته و تخلخل بالایی را دارا می‌باشد و منافذ و قطر الیاف نانومتری آن نشان می‌دهد که زنجیره‌های پلیمری آن درگیری خوبی با یکدیگر داشته که منجر به تشکیل مهره و دانه در فیبر نشده است. در مجموع این تصویر نشان می‌دهد ساختار سه بعدی داربست پلی-ال-لاکتیک-اسید برای رشد سلول‌ها و تمایز آنها شرایط مناسب را فراهم کرده است (شکل ۲).

ارزیابی روند زنده‌مانی سلول‌ها در طی کشت آنها روی فلاسک مخصوص کشت سلول و همچنین روی داربست پلی-ال-لاکتیک-اسید با استفاده از آزمون MTT انجام شد. نتایج آزمون نشان داد که داربست پلی-ال-لاکتیک-اسید به دلیل ساختار مطلوب سطحی همانند فلاسک مخصوص کشت سلول توانایی چسبندگی سلول به سطح را داشته و در نتیجه امکان رشد و تکثیر بهینه سلول‌ها را در طی کشت فراهم می‌سازد. بر اساس داده‌های آزمون MTT، تفاوتی در رشد سلول‌ها در دو تیمار وجود نداشت. لذا داربست پلی-ال-لاکتیک-اسید همانند فلاسک مخصوص کشت توانسته است زیست‌سازگاری مطلوبی را فراهم سازد (جدول ۱).

روند تمایز استخوانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی را می‌توان از روی مورفولوژی سلول‌ها ارزیابی کرد. سلول‌های بنیادی در طی روند تمایز از حالت دوکی شکل و چندوجهی به حالت گرد در می‌آیند (شکل ۳) و موقعیت هسته در این سلول‌ها از موقعیت مرکزی خارج و به کناری رانده می‌شود. تفاوت‌های عملکردی و ساختاری سیتواسکلتون داخلی این سلول‌ها باعث ایجاد تفاوت مورفولوژیک آن‌ها بعد از تمایز سلولی می‌شود.

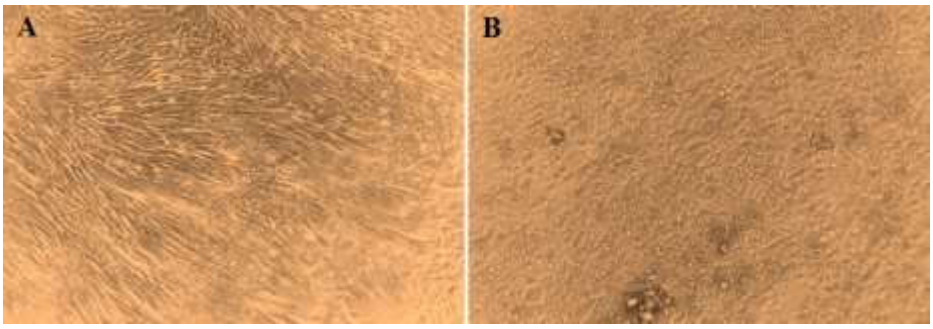


شکل ۲. الکترومیکروگراف از سطح داربست پلی-ال لاکتیک-اسید خالص، بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰X.
تخلخل زیاد و همچنین یکنواختی در قطر فیبرها و فیبرها بدون هیچگونه مهره مشاهده شدند.

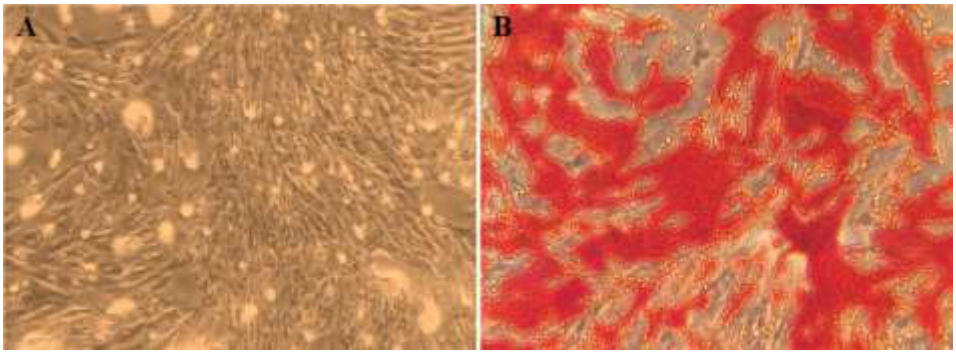
جدول ۱. اثر پلیت و داربست پلی-ال-لاکتیک-اسید بر رشد سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی اسب بر روی داربست در طی ۵ روز کشت

گروه‌ها	چگالی نوری		
	روز ۱	روز ۳	روز ۵
فلاسک مخصوص کشت	۰/۲۶±۰/۰۳	۰/٦٤ ± ۰/۰٤	۰/۷۳ ± ۰/۰۵
داربست پلی-ال-لاکتیک-اسید	۰/۳۹±۰/۰۹	۰/۵۹ ± ۰/۱۱	۰/۸۱ ± ۰/۰۱

آلیزارین رد یک ترکیب آلی است که به‌طور اختصاصی ماتریکس معدنی‌شده را در سلول‌ها به رنگ قرمز رنگ‌آمیزی می‌کند. به‌طوری‌که شدت رنگ‌پذیری سلول‌ها با میزان مواد معدنی موجود در ماتریکس آن ارتباط مستقیم دارد. این آزمون به‌دلیل محدودیت‌هایی که در عکس‌برداری از داربست وجود دارد نمی‌تواند برای سلول‌های در حال تمایز روی داربست انجام شود. سلول‌های بنیادی مزانشیمی در معرض محیط تمایز استخوان قرار گرفتند و برای ارزیابی میزان رسوب‌های کلسیمی با آلیزارین رد رنگ‌آمیزی شدند. بررسی عکس‌ها نشان داد که گره‌های کلسیمی، رنگ آلیزارین را به خود جذب کرده و به رنگ قرمز دیده می‌شوند (شکل ٤-B). سلول‌های فاقد محیط تمایزی رنگ سلولی را به خود جذب نکردند (شکل ٤-A). فعالیت آنزیم آلکالین‌فسفاتاز از جمله شاخص‌های ارزیابی کمی روند تمایز استخوانی محسوب می‌شود و می‌تواند در بررسی روند تمایزی مطالعه شود. این آنزیم توسط سلول‌های استئوبلاست تولید می‌شود. تفاوت معنی‌داری در فعالیت آنزیم آلکالین‌فسفاتاز در سلول‌های تمایزیافته روی داربست پلی-ال-لاکتیک-اسید با فعالیت آنزیم آلکالین‌فسفاتاز در سلول‌های گروه شاهد (که روی فلاسک مخصوص کشت تمایز یافتند) در روز هفت دوره تمایز مشاهده نشد. با این حال سلول‌های تمایز یافته روی داربست پلی-ال-لاکتیک-اسید فعالیت آنزیمی بیشتری ($P<0/05$) را در مقایسه با سلول‌های گروه شاهد در روزهای ١٤ و ٢١ تمایز نشان دادند (جدول ٢).



شکل ٣. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی اسب را در محیط پایه بدون فاکتورهای تمایزی (A) و در محیط پایه حاوی فاکتورهای تمایزی استخوان (B) را پس از کامل شدن روند تمایز آنها نشان می‌دهد.



شکل ٤. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی اسب را پس از رنگ‌آمیزی آلیزارین‌رد در محیط پایه بدون فاکتورهای تمایزی (A) و در محیط پایه حاوی فاکتورهای تمایزی استخوان (B) نشان می‌دهد.

جدول ۲. اثر فلاسک مخصوص کشت و داربست پلی-ال-لاکتیک-اسید بر میزان فعالیت آنزیم آلکالین‌فسفاتاز سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی اسب در طی روند ۲۱ روزه تمایز استخوانی

گروه‌ها	فعالیت آلکالین‌فسفاتاز (واحد بین‌المللی در میلی گرم کل پروتین)		
	روز ۷	روز ۱٤	روز ۲۱
فلاسک مخصوص کشت	۹/٦ ± ۰/٦	۵/۸ ± ۰/٤[b]	۲/۵ ± ۰/۳[b]
داربست پلی-ال-لاکتیک-اسید	۸/۹ ± ۱/۹	۷/۹ ± ۰/۵[a]	٤/۳ ± ۰/٦[a]

میزان رسوب کلسیم خارج سلولی نیز از شاخص‌های ارزیابی کمی روند تمایز استخوانی می‌باشد که می‌تواند در بررسی القا تمایز استخوانی مطالعه شود. میزان رسوب کلسیم در سلول‌های تمایز یافته روی داربست پلی-ال-لاکتیک-اسید در روزهای هفت، ۱٤ و ۲۱ بیشتر از سلول‌های تمایز یافته روی فلاسک مخصوص کشت (شاهد) $P<۰/۰۵$ بود (جدول ۳).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی یکی از منابع سلولی مناسب برای استفاده در زمینه تحقیقات مهندسی بافت استخوان می‌باشد. در سال‌های اخیر استفاده از این منبع سلولی مورد استقبال گسترده‌ای قرار گرفته و با تکثیر و تمایز این سلول‌ها به بافت استخوان می‌توان از آن‌ها برای اهداف سلول‌درمانی استفاده کرد [٦ و ۸]. گزارش شده است که سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی شتر می‌تواند در شرایط برون‌تنی به رده استخوانی تمایز یابد [۲۰]. ارزیابی مورفولوژیکی سلول‌های چسبیده به فلاسک مخصوص کشت اشکال چند وجهی و دوکی را نشان می‌دهد که از ویژه‌گی‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌شمار می‌رود [٤ و ٦]. جمعیت سلولی جداشده از بافت چربی اسب در کشت اولیه به‌صورت یک جمعیت ناهمگون و هتروژن خود را نشان دادند، لیکن با پاساژهای متوالی در محیط کشت حاوی ۱۰ درصد سرم، جمعیت سلولی یکدست و همگونی به‌دست آمد که این مشاهده‌ها با سایر گزارش‌ها مطابقت دارد [٦ و ۲۳]. برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی و کشت و تکثیر آنها دستورالعمل‌های متنوعی وجود دارد، ولی نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که دستورالعمل‌های به‌کار گرفته‌شده در مطالعات قبلی در جداسازی و کشت این سلول‌ها از بافت چربی اسب نیز موفقیت‌آمیز بوده‌است [۲۰].

از آن‌جایی‌که در استراتژی‌های سلول‌درمانی از سلول‌های کاملاً تمایز یافته استفاده می‌شود اولین قدم در استفاده از سلول‌های مزانشیمی به‌منظور بازسازی ضایعات استخوانی، تمایز آن‌ها به استئوبلاست‌ها در شرایط برون‌تنی می‌باشد. علاوه بر این در بیشتر پژوهش‌ها، تمایز به استخوان به‌عنوان بخشی از پتانسیل سلول مزانشیمی مورد توجه قرار می‌گیرد.

یکی از ابزارهای ارزیابی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست‌ها، رنگ‌آمیزی اختصاصی آلیزارین‌رد برای معدنی شدن می‌باشد [۱۷]. مثبت شدن رنگ‌آمیزی آلیزارین‌رد دلیلی بر تشکیل نودول‌های کلسیمی در ماتریکس سلول و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استئوبلاست است. در این مطالعه، نودول‌های کلسیمی بعد از روز هفتم قابل رویت بود و رنگ قرمز ناشی از رنگ‌آمیزی نودول‌های تشکیل‌شده از نظر کیفی در روزهای ۱٤ و ۲۱ پس از شروع تمایز نسبت به روز هفت افزایش یافت. تشکیل نودول‌های کلسیمی وابسته به حضور کلسیم در داخل سلول است [۱٦].

جدول ۳. اثر فلاسک مخصوص کشت و داربست پلی-ال-لاکتیک-اسید بر میزان رسوبات کلسیمی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی اسب در طی روند ۲۱ روزه تمایز استخوانی

گروه‌ها	رسوب کلسیم (میکروگرم در چاهک)		
	روز ۷	روز ۱٤	روز ۲۱
فلاسک مخصوص کشت	۰/۰۱ ±۰ /۰۰۲[b]	۰/۲٤ ± ۰/۰۱۳[b]	۰/۵۹ ± ۰/۰۰٤[b]
داربست پلی-ال-لاکتیک-اسید	۰/۰٦ ± ۰/۰۱۱[a]	۰/۳۳ ± ۰/۰۱۳[a]	۰/٦٤ ± ۰/۰۱[a]

در مطالعه حاضر میزان کلسیم داخل سلولی افزایش قابل‌ملاحظه‌ای را از روز هفت تمایز تا روز ۲۱ نشان داد که تأییدی بر تشکیل نودول‌های کلسیم در طی روند ۲۱ روزه تمایز می‌باشد. این افزایش برای سلول‌های تمایزیافته روی داربست پلی-ال-لاکتیک-اسید در مقایسه با سلول‌های تمایزیافته روی فلاسک مخصوص کشت بیشتر بود که نشان می‌دهد تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی اسب با راندمان بهتری در مقایسه با تمایز آنها روی فلاسک مخصوص کشت انجام می‌شود.

برای حضور کلسیم، فعالیت آنزیم آلکالین‌فسفاتاز ضروری است [۱٦]. در مطالعه حاضر در روز هفتم، فعالیت آنزیم آلکالین‌فسفاتاز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایزیافته در مقایسه با سلول‌های بنیادی کشت‌داده‌شده در محیط پایه (بدون فاکتورهای تمایزی) افزایش یافت (داده‌ها گزارش نشده است). روند فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در طی ۲۱ روز تمایز کاهشی می‌باشد و داده‌های این مطالعه نیز نشان می‌دهد که فعالیت این آنزیم در روز ۲۱ به مراتب کمتر از روز ۱٤ و هفت تمایز بوده‌است. سلول‌های تمایزیافته روی داربست پلی-ال-لاکتیک-اسید در مقایسه با سلول‌های تمایزیافته روی فلاسک مخصوص کشت فعالیت آنزیمی بیشتری را در روزهای ۱٤ و ۲۱ نشان دادند هرچند این تفاوت در روز هفت معنی‌دار نبود.

در فرایند تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست، ژن‌های مختلفی مانند استئوپونتین، استئوکلسین، استئونکتین، رانیکس ۲، کلاژن تیپ یک، آلکالین‌فسفاتاز و غیره دخالت دارند. در این میان ژن آلکالین‌فسفاتاز به‌عنوان اولین ژنی که در روند تمایز بیان می‌شود از اهمیت ویژه‌ای برخوداراست [۱٦]. در راستای این نظریه نتایج این مطالعه نیز نشان داد که در روز هفت تمایز، فعالیت آنزیم آلکالین‌فسفاتاز بیشترین حد خود را داشت و به‌تدریج از فعالیت آن کاسته شده تا به حداقل میزان خود در روز ۲۱ رسید. در صورتی‌که میزان فعالیت آنزیم آلکالین‌فسفاتاز کاهش نیابد (با توجه به نسبت یون‌های کلسیم به فسفات) میزان کلسیم از غلظت متعارف داخل سلول خارج شده و باعث مرگ سلول می‌گردد، لذا برای نگهداری غلظت کلسیم داخل سلول کاهش میزان فعالیت آنزیم آلکالین‌فسفاتاز توجیح‌پذیر است. داده‌های حاصل از این مطالعه نیز نشان می‌دهد که در روز ۲۱ میزان کلسیم داخل سلولی افزایش قابل‌ملاحظه‌ای را نسبت به روز ۱٤ و هفت نشان می‌دهد که تأییدی بر تشکیل نودول‌های کلسیم در روند ۲۱ روزه تمایز می‌باشد [۱۹].

مطالعه حاضر نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج‌شده از بافت چربی اسب علاوه بر کشت به‌صورت تک بعدی قادرند در محیط سه بعدی نیز به‌خوبی رشد کنند و همانند شرایط فلاسک مخصوص کشت رشد و تکثیر

مطلوبی داشته باشند. ارزیابی شاخص‌های کمی تمایز استخوان نیز نشان داد که داربست‌های پلی-ال-لاکتیک-اسید نسبت به شرایط فلاسک مخصوص کشت از پتانسیل بالاتری برای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به رده استخوانی برخوردار هستند؛ لذا استفاده از این داربست‌ها برای اهداف مهندسی بافت استخوان اسب و سلول‌درمانی در این گونه توصیه می‌شود.

منابع

1. Afizah H, Yang Z, Hui JH, Ouyang HW and Lee E (2007) 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 Engineering. 13(4): 659-6.
2. Álvarez-Viejo M, Menéndez-Menéndez Y and Otero-Hernández J (2015) CD271 as a marker to identify mesenchymal stem cells from diverse sources before culture. World journal of Stem Cells. 7(2): 470.
3. Avril P, Le Nail L R, Brennan M A, Rosset P, De Pinieux G, Layrolle P, Heymann D, Perrot P and Trichet V (2016) Mesenchymal stem cells increase proliferation but do not change quiescent state of osteosarcoma cells: Potential implications according to the tumor resection status. J Bone Oncol. 5(1): 5-14.
4. Burgos-Silva M, Semedo-Kuriki P, Donizetti-Oliveira C, Costa PB, Cenedeze MA, Hiyane MI, Pacheco-Silva A and Camara NO (2015) Adipose Tissue-Derived Stem Cells Reduce Acute and Chronic Kidney Damage in Mice. PLoS One. 10(11) :142-183.
5. Busser H, Najar M, Raicevic G, Pieters K, Velez Pombo R, Philippart P, Meuleman N, Bron D and Lagneaux L (2015) Isolation and characterization of human mesenchymal stromal cell subpopulations: comparison of bone marrow and adipose tissue. Stem cells and Development. 24(18): 2142-2157.
6. Chi K, Fu RH, Huang YC, Chen SY, Lin SZ, Huang PC, Lin PC, Chang FK and Liu SP (2016) Therapeutic Effect of Ligustilide-Stimulated Adipose-Derived Stem Cells in a Mouse Thromboembolic Stroke Model. Cell Transplant. 25(5): 899-912.
7. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D and Horwitz E (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 8(4): 315-317.
8. Dvorak MM, Siddiqua A, Ward DT, Carter DH, Dallas SL, Nemeth EF and Riccardi D (2004) Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 101(14): 5140-5145.
9. Fraser JK, Zhu M ,Wulur I and Alfonso Z (2008) Adipose-derived stem cells. Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols. 59-67.
10. Friedenstein A, Piatetzky-Shapiro I and Petrakova K (1966) Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. Development. 16(3): 381-390.
11. Frölich K, Scherzed A, Mlynski R, Technau A, Hagen R, Kleinsasser N and Radeloff A (2011). Multipotent stromal cells for autologous cell therapy approaches in the guinea pig model. ORL. 73(1): 9-16.
12. Guest DJ, Smith MRW and Allen WR (2008) Monitoring the fate of autologous and allogeneic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: Preliminary study. Equine Veterinary Journal. 40(2): 178-181.
13. Kim EH and Heo CY (2014) Current applications of adipose-derived stem cells and their future perspectives. World Journal Stem Cells. 6(1): 65-68.
14. Kim JH, Choi SC, Park CY, Park JH, Choi JH, Joo HJ, Hong SJ and Lim DS (2016) Transplantation of Immortalized CD34+ and CD34- Adipose-Derived Stem Cells Improve Cardiac Function and Mitigate Systemic Pro-Inflammatory Responses. PLoS One. 11(2): 147-153.
15. Koch TG, Heerkens T, Thomsen PD and Betts DH (2007) Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. BMC Biotechnology. 7(1): 26.
16. Koerner J, Nesic D, Romero JD, Brehm W, Mainil-Varlet P and Grogan SP (2006) Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Stem Cells. 24(6): 1613-1619.

17. Lettry V, Hosoya K, Takagi S and Okumura M (2010) Coculture of equine mesenchymal stem cells and mature equine articular chondrocytes results in improved chondrogenic differentiation of the stem cells. Japanese Journal of Veterinary Research. 58(1): 5-15.
18. Lim J-H, Boozer L, Mariani CL, Piedrahita JA and Olby NJ (2010) Generation and characterization of neurospheres from canine adipose tissue-derived stromal cells. Cellular Reprogramming (Formerly Cloning and Stem Cells). 12(4): 417-425.
19. Marino G, Rosso F, Cafiero G, Tortora C, Moraci M, Barbarisi M and Barbarisi A (2010) β-Tricalcium phosphate 3D scaffold promote alone osteogenic differentiation of human adipose stem cells: in vitro study. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 21(1): 353-363.
20. Mohammadi-Sangcheshmeh A, Shafiee A, Seyedjafari E, Dinarvand P, Toghdory A, Bagherizadeh I, Schellander K, Cinar MU and Soleimani M (2013) Isolation, characterization, and mesodermic differentiation of stem cells from adipose tissue of camel (Camelus dromedarius) In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal. 49(2): 147-154.
21. Nathan S, De SD, Thambyah A, Fen C, Goh J and Lee EH (2003) Cell-based therapy in the repair of osteochondral defects: a novel use for adipose tissue. Tissue Engineering. 9(4): 733-744.
22. Neupane M, Chang C-C, Kiupel M and Yuzbasiyan-Gurkan V (2008) Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. Tissue Engineering Part A. 14(6): 1007-1015.
23. Vidal MA ,Kilroy GE, Lopez MJ, Johnson JR, Moore RM and Gimble JM (2007) Characterization of Equine Adipose Tissue-Derived Stromal Cells: Adipogenic and Osteogenic Capacity and Comparison with Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. Veterinary Surgery. 36(7): 613-622.
24. Xu Y, Liu L, Li Y, Zhou C, Xiong F Liu Z, Gu R, Hou X and Zhang C (2008) Myelin-forming ability of Schwann cell-like cells induced from rat adipose-derived stem cells in vitro. Brain Research. 1239: 49-55.
25. Yoon E, Dhar S, Chun DE, Gharibjanian NA and Evans GR (2007) In vivo osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model. Tissue Engineering. 13(3): 619-627.

Animal Production
(*College of Abouraihan – University of Tehran*)

Vol. 20 ■ No. 2 ■ Summer 2018

Effect of poly (L-lactide) nanofiber scaffolds on osteogenic differentiation of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells

Behnaz Bageshlooyafshar[1], Reza Rahchamani[2 *], Abdollah Mohamadi-Sangecheshmeh[3], Ehsan Seyedjafari[4], Yousef Mostafaloo[2]

1. M.Sc. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Science and Natural Resource, University of Gonbad Kavous, Gonbad-e Kavus, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Science and Natural Resource, University of Gonbad Kavous, Gonbad-e Kavus, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Animal and Poultry Science, College of Aburaihan, University of Tehran, Pakdasht, Iran.
4. Assistant Professor, Department of Biotechnology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran.

Received: August 14, 2016 Accepted: May 27, 2017

Abstract

This study was conducted to investigate the differentiation potential of equine adipose-derived mesenchymal stem cell into bone in single-dimensional culture system (in plastic tissue culture) and in three-dimensional system (on poly-l-lactic acid scaffolds; PLLA). A porous structure that allows use of three-dimensional distribution and provides optimal growth of cells is of great clinical significance in the field of tissue engineering. In current study using equine adipose-derived stem cells (ASCs), we intended to compare the osteogenic differentiation potential of PLLA nanofibrous scaffold with tissue culture plastic (TCP). Adipose tissues were collected from 3 adult horses, and ASCswere isolated by enzymatic digestion. PLLA nanofibrous scaffold was successfully prepared using a phase separation method. Viability and growth characteristics of ASCs on TCP and scaffold were investigated by tetrazolium (MTT) based colorimetric assay. Alizarin Red staining was performed for determination of calcium deposition following osteogenic differentiation. Furthermore, other common osteogenic markers such as alkaline phosphatase (ALP) activity, and calcium content were also analyzed. Our data showed that the PLLA scaffold had no detrimental effect on the cell growth rate as evaluated by MTT assay. However, ASCs that differentiated on PLLA nanofibrous scaffolds indicated higher ALP activity and more calcium content than that on TCP. Adequate proliferation rate and higher expression of osteogenic markers of stem cells cultured on PLLA nanofibrous scaffolds provide this scaffold as a suitable substrate to support proliferation and differentiation of ASCs in equine.

Keywords: Adipose tissue, mesenchymal stem cells, osteogenic differentiation, poly-L-lactic-acid, scaffolds.

Corresponding author: r_rahchamani@yahoo.com