مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۸۶/هفته سوم تیر ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۳/۲۴

مقایسه‌ی تأثیر داربست‌های بر پایه‌ی ابریشم بر تمایز کندروسیت‌های خرگوشی

میترا نعیمی[۱]، دکتر محمدحسین فتحی[۲]، دکتر محمد رفیعی‌نیا[۳]، دکتر شاهین بنکدار[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: آرتروز به دلیل آسیب به مفاصل در میان افراد کهنسال و نیز ورزشکاران شایع است که منجر به درد، شکنندگی، محدودیت حرکتی و تورم بافت می‌شود. در باز تولید غضروف به روش مهندسی بافت، استفاده از داربست مناسب برای حفظ تمایز سلولی ضروری می‌باشد؛ زیرا کندروسیت‌هایی که به صورت تک لایه کشت داده می‌شوند، تمایز غضروفی خود را از دست می‌دهند. هدف از پژوهش حاضر، مقایسه‌ی حفظ تمایز غضروفی کندروسیت‌های جدا شده از بافت غضروف خرگوشی در داربست ابریشم و داربست کامپوزیتی ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات بود.

روش‌ها: داربست ابریشم و داربست کامپوزیتی ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات به روش خشکاندن انجمادی تهیه گردید. ساختار داربست‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شد. کندروسیت از بافت غضروف مفصلی خرگوش استخراج شد و در داربست‌های تهیه شده به مدت ۱۴ روز کشت داده شد. درصد بقای سلولی توسط روش MTT (۳-(۵،۴-Dimethylthiazol-۲-yl)-۵،۲-diphenyltetrazolium bromide) اندازه‌گیری شد. برای بررسی ترشح گلیکوزآمینوگلیکان از روش رنگ‌آمیزی آلسیان بلو و برای بررسی میزان بیان ژن کلاژن نوع II از Real-time PCR (Real-time polymerase chain reaction) استفاده گردید.

یافته‌ها: مطالعه با میکروسکوپ الکترونی روبشی به هم پیوستگی تخلخل‌ها را در داربست کامپوزیتی نشان داد. نتایج آزمون MTT، عدم سمیت سلولی داربست‌های تهیه شده را تأیید کرد. میزان ترشح گلیکوزآمینوگلیکان‌ها و نیز میزان بیان کلاژن نوع II با تفاوت معنی‌داری از نظر آماری در داربست کامپوزیتی بیشتر بود ($P < ۰/۰۵۰$).

نتیجه‌گیری: داربست کامپوزیتی ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات برای حفظ تمایز کندروسیت‌ها بسیار مناسب‌تر از داربست ابریشم و یا کشت تک لایه‌ی کندروسیت‌ها می‌باشد.

واژگان کلیدی: غضروف، مهندسی بافت، کندروسیت

ارجاع: نعیمی میترا، فتحی محمدحسین، رفیعی‌نیا محمد، بنکدار شاهین. **مقایسه‌ی تأثیر داربست‌های بر پایه‌ی ابریشم بر تمایز کندروسیت‌های خرگوشی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۸۶): ۷۵۱-۷۴۰

مقدمه

۸۰-۶۵ درصد بافت غضروف مفصلی، سیال و ۳۵-۲۰ درصد ماتریکس خارج سلولی متشکل از کلاژن و پروتئوگلیکان و نیز سلول‌های بسیار تخصص یافته به نام کندروسیت است (۱). کندروسیت‌ها سلول‌های کوچکی با هسته‌ی بیضی شکل هستند که یک یا دو هستک دارند. کندروسیت‌ها در درون ماتریکس خارج سلولی قرار

۱- دانشجوی دوره‌ی مشترک دکترای تخصصی، گروه پژوهشی بیومواد، دانشکده‌ی مهندسی مواد، دانشگاه صنعتی اصفهان و دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استاد، گروه پژوهشی بیومواد، دانشکده‌ی مهندسی مواد، دانشگاه صنعتی اصفهان و مرکز تحقیقات مواد دندانی، دانشکده‌ی دندان پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دانشیار، مرکز تحقیقات بیوسنسور، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- استادیار، بانک سلولی ایران، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: میترا نعیمی
Email: m.naeimi@ma.iut.ac.ir

گرفته‌اند. در مورد بافت غضروفی که دچار آرتروز شده است، کندروسیت‌ها رفتاری متفاوت با کندروسیت‌های بالغ طبیعی دارند. در پی بروز عارضه‌ی آرتروز، توانایی کندروسیت‌ها در حفظ تعادل بین فعالیت‌های آنابولیکی (تولید ماتریکس) و کاتابولیکی (تخریب ماتریکس) به خطر می‌افتد.

در واقع، در مراحل اولیه‌ی بیماری، فعالیت تولیدی زیادتر می‌شود؛ اما با این وجود، کندروسیت‌ها قادر به جبران آسیب به ماتریکس نیستند. به علاوه، کندروسیت‌ها نقشی مستقیم در تخریب ماتریکس با تنظیم نمودن بیان آنزیم‌های تخریب کننده‌ی ماتریکس دارند. تغییرات دیگری مانند تغییر در میزان حضور کلاژن نسبت به غضروف طبیعی نیز در نتیجه‌ی بیماری آرتروز رخ می‌دهد (۴-۲).

بنا به تعریف، مهندسی بافت رشته‌ای است که از ترکیب علم بیولوژی مواد و علم مهندسی جهت بیان ارتباطات ساختاری بافت‌های فیزیولوژیکی و طبیعی پستانداران در راستای توسعه‌ی روش‌های نوین ترمیم بافت و جایگزین‌سازی بافت، پیشرفت نموده است (۵). به عبارت دیگر، مهندسی بافت را می‌توان به شکل بیولوژیکی، شیمیایی و با استفاده از اصول مهندسی در جهت ترمیم یا بازسازی بافت‌های زنده با به کارگیری زیست مواد، سلول‌ها و عوامل بیولوژیکی مورد استفاده قرار داد. از پلیمرها به طور گسترده در مهندسی بافت برای بازسازی بافت‌های زنده استفاده می‌شود (۷-۶).

در مورد سلول، شناسایی منبع مناسبی از سلول‌ها، اولین قدم می‌باشد. کندروسیت‌ها از این نظر که در غضروف طبیعی یافت می‌شوند، بهترین گزینه هستند. کندروسیت‌های تمایز یافته، مورفولوژی کروی دارند و با توجه به تولید مولکول‌های موجود در ماتریکس خارج سلولی مانند کلاژن نوع II و گلیکوزآمینوگلیکان‌های سولفاته، شناسایی می‌شوند. کندروسیت‌های مفصلی در بررسی و آزمون برون تنی به کندی تکثیر می‌شوند و در طی کشت به صورت تک لایه، ناپایدار می‌گردند و تمایز خود را از دست می‌دهند و بافتی با استحکام مکانیکی کم تولید می‌کنند (۵، ۲). کندروسیت‌هایی که تمایز خود را از دست داده‌اند، مشابه سلول‌های فیبروبلاست، دوکی شکل هستند و بیان کلاژن نوع I در آن‌ها زیاد است. در حالی که کلاژن نوع II و پروتئوگلیکان ندارند (۷). بازتولید بافت از بین رفته توسط مهندسی بافت نیاز به یک داربست متخلخل موقتی دارد. در این پژوهش، به منظور کاهش از دست رفتن تمایز سلول‌های کندروسیت در طی کشت، از داربست‌های سه بعدی پلیمری استفاده شده است.

در فرایند مهندسی بافت، سلول‌ها بر روی یک بستر زیست تخریب‌پذیر با حجم تخلخل بالا استقرار می‌یابند، رشد می‌کنند و تکثیر می‌شوند. یکی از اساسی‌ترین قسمت‌های مهندسی بافت، داربست‌های زیست تخریب‌پذیر هستند. این داربست‌ها، در حقیقت بستری متخلخل با ساختاری شبیه به ماتریکس خارج سلولی بافت هستند که رشد سلول را به سمت تشکیل بافت مورد نظر جهت می‌دهند (۸).

شناخت ساختمان شیمیایی و روش ساخت این داربست‌ها، نقش مهمی را در تعیین خواص فیزیکی این مواد دارد. از انواع مواد مورد استفاده در ساخت داربست، می‌توان به پلیمرهای طبیعی و مصنوعی اشاره کرد. پلیمرهای طبیعی مورد استفاده در مهندسی بافت غضروف عبارت از آلژینات، آگاروز، کیتوسان، کلاژن، هیالورونان، فیبرین و ابریشم هستند (۱۵-۹).

در این میان، ابریشم زیست ماده‌ای از جنس پروتئین است که کاربردهای فراوانی در پزشکی دارد (۲۲-۱۶). فیبروئین ابریشم از نظر خواص مکانیکی، قابلیت استفاده برای مهندسی بافت‌های ساختاری بدن را دارد. فیبروئین ابریشم در مهندسی بافت غضروف مورد توجه قرار گرفته است. فیبروئین ابریشم در بدن به آهستگی تخریب می‌گردد (۲۴-۲۳). به همین دلیل می‌توان آن را با مواد دیگر مانند کلاژن، کیتوسان، هیالورونیک اسید و آلژینات تلفیق نمود (۳۱-۲۵).

ماتریکس خارج سلولی طبیعی غضروف از الیاف کلاژن و پروتئوگلیکان‌هایی مانند کندروئیتین سولفات و هیالورونیک اسید تشکیل شده است (۷). اما استفاده‌ی درمانی وسیع از کلاژن و این پروتئوگلیکان‌ها به صورت بالینی به دلیل گران قیمت بودن محدود است. به علاوه، به دلیل خواص مکانیکی پایین، استفاده از آن‌ها به تنهایی در داربست‌های مهندسی بافت غضروف مطلوب نمی‌باشد. در پژوهش حاضر، داربست ابریشم خالص و داربست کامپوزیتی ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات با هدف استفاده به عنوان داربست مهندسی بافت غضروف، تولید شد و حفظ تمایز غضروفی کندروسیت‌های جدا شده از بافت غضروف خرگوشی در دو نوع داربست با هم مقایسه شد.

روش‌ها

تهیه‌ی داربست‌ها

برای انجام این مطالعه، فیبروئین ابریشم از پیله‌ی کرم ابریشم (خریداری شده از شرکت پرورش کرم ابریشم ایران) استخراج گردید. همچنین کندروئیتین سولفات و سدیم آلژینات با وزن مولکولی کم از شرکت سیگمای آمریکا خریداری شد. به منظور استخراج فیبروئین در ابتدا پیله‌ی کرم ابریشم به قطعات کوچک‌تر بریده شد و در محلول کربنات سدیم ۰/۰۲ مولار به مدت یک ساعت جوشانده شد. سپس شستشو با آب و خشک کردن الیاف انجام گردید.

الیاف حاصل در برمید لیتیوم حل گردید. سپس محلول حاصل در غشای دیالیز (شرکت Sigma آمریکا) ریخته شد و غشا به مدت ۴۸ ساعت در آب دیونیزه قرار داده شد. در این مرحله، آب دیونیزه در فواصل زمانی تعویض گردید. در مرحله‌ی بعد، محلول به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ قرار داده شد (۹۰۰۰ دور در دقیقه). محلول حاصل، برای ساخت داربست مورد استفاده قرار گرفت.

در این پژوهش، دو نوع داربست تهیه شد که شامل داربست خالص ابریشم و داربست کامپوزیتی ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات بود. به منظور ساخت داربست خالص ابریشم، محلول آبی ابریشم تولید شده با غلظت ۶ درصد وزنی مورد استفاده قرار گرفت. به منظور ساخت داربست کامپوزیتی ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات، پودر آلژینات در محلول کلرید سدیم ۰/۹ درصد و پودر کندروئیتین سولفات در آب مقطر حل شد. سپس محلول آبی ابریشم با محلول کندروئیتین سولفات و آلژینات با نسبت وزنی ۵:۱:۱ مخلوط گردید.

محلول‌های همگن تهیه شده در قالب‌های استوانه‌ای با قطر ۶ میلی‌متر ریخته شدند و به مدت ۷۲ ساعت در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند. در نهایت به مدت ۴۸ ساعت در دستگاه خشک‌کن انجمادی در ۵۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس داربست‌ها به مدت ۲۴ ساعت در

محلول کربودی‌ایمید (EDC یا (۱-Ethyl-۳- (۳- dimethylaminopropyl) carbodiimide (شرکت Merck آلمان) با غلظت ۵۰ میلی‌مولار و محلول N- هیدروکسی سوکسین ایمید (NHS یا N-Hydroxysuccinimide) (شرکت Merck آلمان) با غلظت ۲۵ میلی‌مولار غوطه‌ور شدند. بعد از شستشو توسط بافر فسفات (PBS یا Phosphate buffered saline)، داربست‌ها به مدت ۲۴ ساعت دیگر در دستگاه خشک‌کن انجمادی قرار داده شدند.

مطالعه با میکروسکوپ الکترونی روبشی

به منظور بررسی مورفولوژی و ریزساختار داربست‌ها، از میکروسکوپ الکترونی روبشی (Hitachi S ۴۱۶۰ ،Cold Field) استفاده گردید. سطح مقطع داربست‌ها قبل از تهیه‌ی تصویر توسط لایه‌ی نازکی از طلا پوشش‌دهی شد.

جداسازی سلول‌های کندروسیت خرگوشی

حیوانات مختلفی نظیر خرگوش، خوک، سگ، اسب و غیره در تحقیقات مربوط به غضروف و کندروسیت مورد استفاده قرار می‌گیرند. روش کلی کار به این صورت بود که در ابتدا قطعاتی از غضروف توسط برش از غضروف مفصل پای خرگوش جداسازی گردید. قطعات غضروفی برش خورده پس از خارج شدن از بدن و شستشو توسط PBS، به ظرف محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) حاوی آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین منتقل شدند. سپس مایع خارج شد تا قطعه‌ی غضروفی در ته ظرف ته‌نشین گردید. فرایند افزودن محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک چندین بار انجام گرفت. سپس محیط DMEM حاوی آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین، سرم جنینی گاوی و ۱۰۰ میلی‌گرم آنزیم کلاژناز A تهیه گردید و برای استریل نمودن از فیلتر ۰/۲ میکرومتر عبور داده شد.

محیط تهیه شده به نمونه افزوده شد و به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس سلول‌ها در شتاب ۲۵۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند تا به شکل پلت تبدیل شوند (۳۲). محیط رویی خارج شد و محیط کشت جدید حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱۲ Ham's F به سلول‌ها افزوده شد. سلول‌ها توسط این محیط باز شدند و در پلیت کشت سلولی ریخته شده و در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند. محیط کشت سلول‌ها هر ۲ روز یک بار تعویض گردید.

عصاره‌گیری از داربست‌ها

داربست‌های تولید شده با قرارگیری در دستگاه پرتو فرابنفش (UV یا Ultra violet) به مدت ۳۰ دقیقه استریل شدند. به منظور بررسی سمیت نمونه‌ها و تأثیر آن‌ها بر رشد و تکثیر سلول‌ها، فرایند عصاره‌گیری بر اساس استاندارد ایزو ۱۰۹۹۳-۵ انجام شد که طی آن به هر نمونه با سطح مقطع ۰/۵ ± ۳/۵ سانتی‌متر مربع، مقدار ۱ میلی‌لیتر محیط کشت افزوده گردید. مقدار مشخصی محیط کشت نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

شرایط محیط عصاره‌گیری تا حد امکان مشابه با شرایط محیط بدن، در انکوباتور و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن انتخاب شد. بعد از گذشت ۳ روز، محیط روی داربست‌ها خارج و از آن برای تعیین سمیت سلولی داربست‌ها استفاده گردید.

آزمون ارزیابی سمیت سلولی

برای بررسی میزان سمیت سلولی از آزمون دی متیل تیازول دی فنیل تترازولیوم بروماید MTT یا [۳-(۵،۴-Dimethylthiazol-۲-yl)-۵،۲-diphenyltetrazolium bromide] (شرکت Sigma) استفاده شد (۳۲). به این ترتیب که ابتدا ۱×۱۰^{۴} سلول درون پلیت کشت سلولی ۹۶ چاهکی ریخته شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت تا سلول‌ها به کف پلیت بچسبند. عصاره‌ی گرفته شده از هر نمونه، به چاهک کشت افزوده شد و سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت دیگر در مجاورت این عصاره‌ها قرار گرفتند. پس از آن محیط کشت خارج شد و ۱۰۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۰،۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد. پس از گذشت ۴ ساعت، محلول روی سلول‌ها تخلیه گردید و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل اضافه شد و به خوبی پیپت گردید. سپس میزان چگالی نوری (OD یا Optical density) نمونه‌ها توسط دستگاه میکروریدر الایزا (STAT FAX-۲۱۰۰) در طول موج ۵۴۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (۲۹-۲۲) و درصد بقای سلولی (Viability) محاسبه گردید. چاهک دارای سلول‌های بیشتر، چگالی نوری بالاتری نسبت به چاهک با سلول کمتر نشان می‌دهد.

رنگ‌آمیزی با آلسیان بلو

به منظور بررسی کیفی گلیکوز آمینو گلیکان ترشح شده در اطراف سلول‌ها در داربست، رنگ‌آمیزی با آلسیان بلو انجام گردید. پس از تثبیت سلول‌ها در داربست‌های حاوی سلول بعد از گذشت ۱۴ روز کشت سلول، آب‌گیری از نمونه‌ها انجام شد. سپس توسط محلول آلسیان بلو (۰/۰۵ درصد) رنگ‌آمیزی انجام پذیرفت و در نهایت، نمونه‌ها توسط اسید استیک ۳ درصد شستشو داده شدند (۳۲، ۸). داربست‌های فاقد سلول نیز از هر دو گروه به عنوان شاهد رنگ‌آمیزی شدند.

آنالیز بیان ژن

سوسپانسیون سلولی با غلظت ۲×۱۰^{۴} سلول در هر میلی‌لیتر به داربست‌ها اضافه شد و صفحه‌ی کشت به مدت ۱۴ روز در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن قرار داده شد. به منظور مطالعه‌ی عملکرد کندروسیت‌ها، ژن کلاژن نوع II موجود در RNA سلول‌ها توسط روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Real-time PCR یا Real- time polymerase chain reaction) بررسی شد.

استخراج RNA سلول‌ها توسط کیت (Qiagen, RNeasy Plus Mini Kit ۵۰) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. برای تبدیل RNA به cDNA (Complementary DNA) نیز طبق دستورالعمل شرکت سازنده‌ی کیت عمل شد. سپس مخلوط ۲ میکرولیتر از cDNA ساخته شده، ۱۰ میکرولیتر Real-time Master Mix (Takara)، ۶ میکرولیتر آب و ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (مستقیم و معکوس) تهیه شد. توالی پرایمرها در جدول ۱ نشان داده شده است.

سپس تنظیم دستگاه ترموسایکلر به گونه‌ای صورت گرفت که ابتدا دما به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد باقی بماند. سپس ۴۰ سیکل با تغییر دمایی ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۱ دقیقه در ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، به ازای هر سیکل به دستگاه اعمال شد. سپس در دستگاه

Real-time PCR مدل Applied Biosystems ساخت کشور آمریکا قرار داده شد.

در آزمون‌های کشت سلولی، از کشت تک لایه به عنوان نمونه‌ی شاهد استفاده شد و برای هر نمونه، سه مرتبه تکرار در نظر گرفته شد و از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) برای تحلیل آماری نتایج استفاده گردید.

یافته‌ها

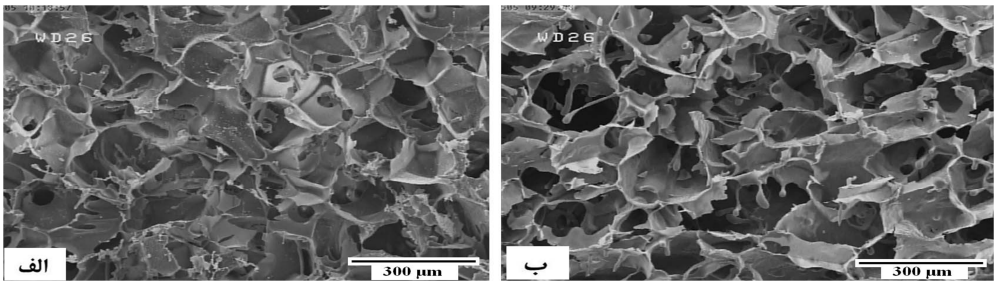
به منظور بررسی مورفولوژی و ریز ساختار داخلی داربست‌های تهیه شده، مطالعه با میکروسکوپ الکترونی روبشی به عمل آمد و تصویر میکروسکوپی لازم از نمونه‌ها تهیه شد. همان‌طور که در شکل ۱ دیده می‌شود، داربست کامپوزیتی ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات نسبت به داربست ابریشم دارای تخلخل‌های بزرگ‌تری است و داربست ابریشم، ساختاری فشرده‌تر دارد. همچنین ارتباط و به هم پیوستگی تخلخل‌ها در داربست کامپوزیتی ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات بیشتر از داربست ابریشم است. بنابراین، پیش‌بینی می‌شود که داربست کامپوزیتی ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات، حمایت بیشتری از رشد و تکثیر سلول‌ها داشته باشد.

در شکل ۲ تصویر میکروسکوپی نوری از سلول‌های کندروسیت استخراج شده از بافت غضروف مفصلی خرگوش نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، سلول‌ها بیشتر فضای پلیت را اشغال کرده‌اند. سلول‌ها با مورفولوژی چند ضلعی دیده می‌شوند که این مسأله نشان دهنده‌ی عدم وجود فنوتیپ فیبروبلاستی است.

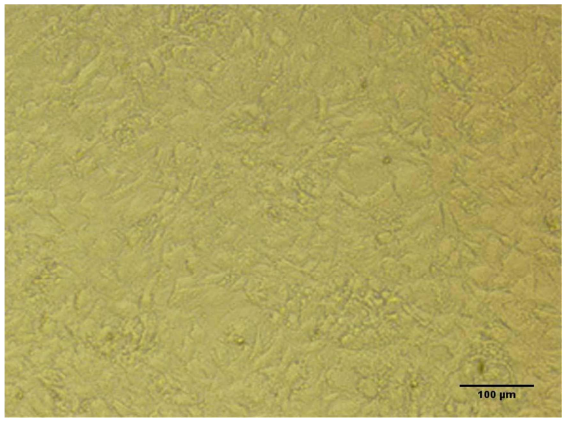
آزمون سمیت سلولی، به منظور بررسی سمیت نمونه‌ها بر میزان زنده ماندن سلول‌ها انجام گرفت. نتایج این آزمون در شکل ۳ آمده است. به عبارت دیگر، از آزمون MTT برای بررسی درصد بقای سلول‌ها تحت تأثیر عصاره‌ی نمونه‌ها استفاده شد تا بتوان معیاری از میزان زیست سازگاری نمونه‌ها به دست آورد. مطابق شکل ۳، داربست کامپوزیتی ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات در مقایسه با داربست ابریشم خالص و نمونه‌ی شاهد، بالاترین میزان بقا و رشد سلولی را با تفاوت چشمگیر و معنی‌داری از نظر آماری نشان داده است ($P < ۰/۰۵۰$).

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده

جهت پرایمر	توالی پرایمر	نام ژن
مستقیم	۵′ CAGGCAGAGGCAGGAAACTAAC ۳′	کلاژن نوع II
معکوس	۵′ CAGAGGTGTTTGACACGGAGTAG ۳′	

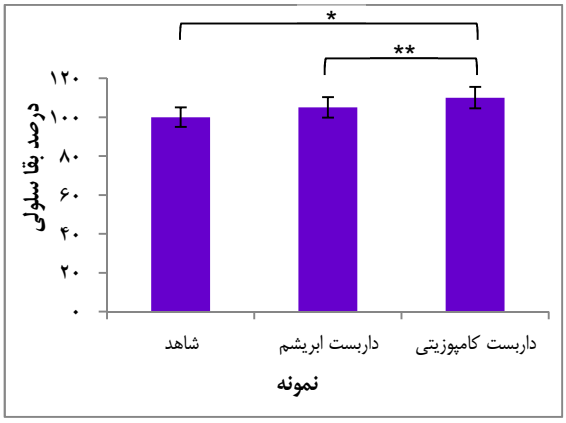


شکل ۱. تصویر میکروسکوپی الکترونی روبشی مربوط به داربست‌های تهیه شده، الف: داربست ابریشم و ب: داربست کامپوزیتی ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات



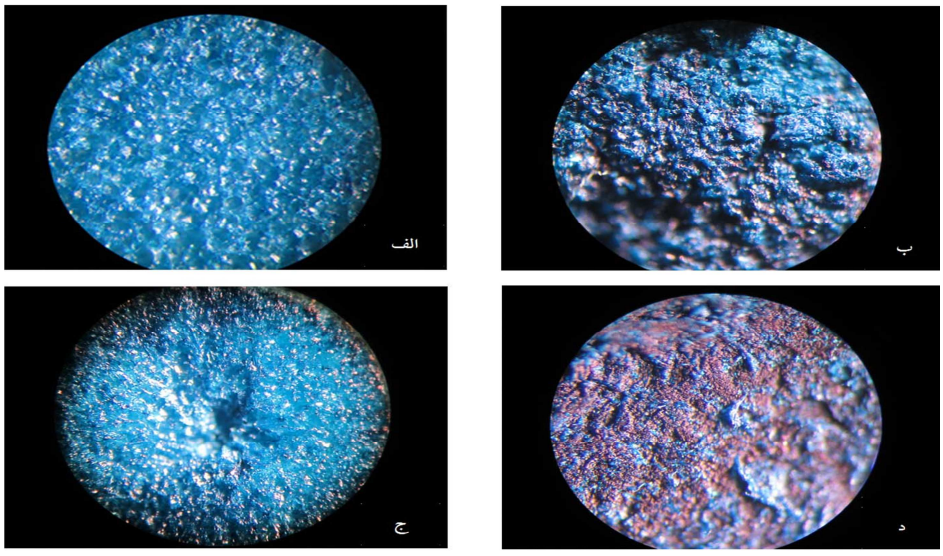
شکل ۲. تصویر تهیه شده با میکروسکوپ نوری از سلول‌های کندروسیت جدا شده از بافت غضروف مفصلی خرگوش در کشت تک لایه‌ی مربوط به پاساژ دوم

تصاویر حاصل از رنگ‌آمیزی نمونه‌ها با آلسیان بلو در شکل ۴ آمده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، داربست کامپوزیتی ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات بیشترین مقدار رنگ را به خود جذب کرده است. به عبارت دیگر، میزان ترشح گلیکوز آمینو گلیکان توسط سلول‌ها در این نوع نمونه بیشتر است.



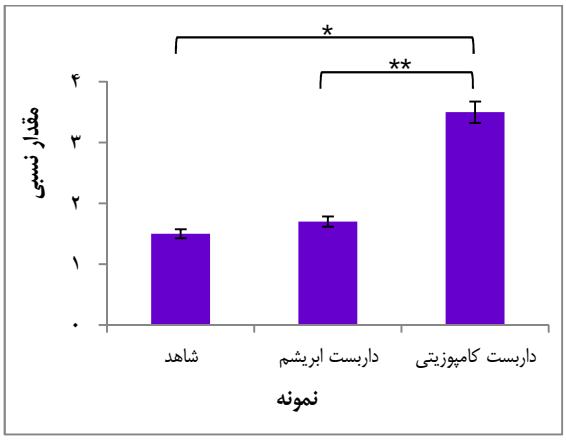
شکل ۳. درصد بقای سلولی بعد از مدت زمان مشخص کشت سلول. بالاترین میزان بقا و رشد سلولی در مورد داربست کامپوزیتی ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات مشاهده می‌شود. اختلاف‌های معنی‌دار؛ *: P = ۰/۰۲۰ و **: P = ۰/۰۳۰.

برای تعیین چگونگی رفتار کندروسیت‌ها در داربست‌های تهیه شده، بیان ژن کلاژن نوع II توسط کندروسیت‌های کاشته شده بر روی نمونه‌ها بررسی شد. بیان ژن‌های کندروسیت‌های خرگوشی کشت داده شده در داربست کامپوزیتی و داربست ابریشم خالص با نمونه‌ی شاهد مقایسه شده است (شکل ۵).



شکل ۴. تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی به ترتیب مربوط به الف و ب: داربست ابریشم و داربست کامپوزیتی ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات فاقد سلول، ج و د: داربست ابریشم و داربست کامپوزیتی ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات بعد از ۱۴ روز کشت سلول

در هر دو نوع داربست، ژن کلاژن نوع II بیان شده است. اما میزان بیان ژن در داربست کامپوزیتی ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات تفاوت معنی‌داری با میزان بیان ژن در داربست ابریشم خالص و نمونه‌ی شاهد نشان می‌دهد ($P < ۰/۰۵۰$).



شکل ۵. نمودار حاصل از نتایج آنالیز بیان ژن (آزمون Real-time polymerase chain reaction). مقدار نسبی بیان ژن کلاژن نوع II در داربست ابریشم، داربست کامپوزیتی ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات و کشت تک لایه (به عنوان نمونه‌ی شاهد)، پس از گذشت ۱۴ روز کشت سلول‌های کندروسیت جداسازی شده از خرگوش. اختلاف‌های معنی‌دار؛ *: $P = ۰/۰۰۵$ و **: $P = ۰/۰۱۰$

بحث

یکی از اساسی‌ترین قسمت‌های مهندسی بافت، داربست‌های زیست تخریب پذیر هستند. داربست‌ها در حقیقت بستری متخلخل می‌باشند که رشد سلول‌ها را به سمت تشکیل بافت مورد نظر جهت می‌دهند (۲۵-۲۳). یک داربست پلیمری مفید برای کاربردهای مهندسی بافت باید چندین ویژگی کلیدی مانند حجم تخلخل بالا، سطح تماس بالا و استحکام ساختاری داشته باشد. فرایند ساخت داربست باید به گونه‌ای باشد که زیست سازگاری ماده‌ی سازنده را تحت تأثیر قرار ندهد. عملکرد داربست، هدایت، رشد و مهاجرت سلول‌ها می‌باشد. بنابراین، جنس داربست نقش مهمی در رشد سلول و ایجاد سطح مورد نیاز برای چسبندگی سلولی ایفا می‌کند. در نتیجه، توجه به انتخاب ماده‌ی سازنده‌ی داربست و روش ساخت داربست امری بسیار با اهمیت است.

داربست فیبروئین ابریشم به تنهایی ترد و شکننده است، بنابراین برای کاربردهای مهندسی بافت می‌توان آن را با پلیمرهای آب‌دوست تلفیق نمود. از طرفی، مشخص گردیده است که ماتریکس خارج سلولی طبیعی غضروف از کلاژن و گلیکوز آمینو گلیکان‌هایی مانند کندروئیتین سولفات و هیالورونان تشکیل شده است (۴-۱). بنابراین حضور کندروئیتین سولفات به دلیل مشابه بودن آن با گلیکوز آمینو گلیکان‌ها و آلژینات به عنوان پلیمری آب‌دوست به تولید غضروف کمک خواهد کرد. طبق نتایج حاصل از آزمون MTT، عصاره‌ی داربست‌ها اثر سمیتی بر سلول‌های کشت داده شده نشان نداد.

برای بررسی میزان ترشح ترکیبات ماتریکس خارج سلولی از سلول‌های کندروسیت، می‌توان از رنگ‌های متاکروماتیک نظیر آلسیان بلو استفاده نمود. در این روش رنگ‌آمیزی، جذب بیشتر رنگ در نمونه، نشان دهنده‌ی ترشح پروتئوگلیکان بیشتر توسط سلول‌های کاشته در آن نمونه است. همان‌طور که شکل ۴ نشان می‌دهد، داربست کامپوزیتی نسبت به داربست ابریشم خالص، رنگ بیشتری جذب کرده است. بنابراین می‌توان بیان نمود که افزودن کندروئیتین سولفات و آلژینات به فیبروئین ابریشم تأثیری مثبت بر حفظ تمایز غضروفی کندروسیت‌ها داشته است.

در پژوهشی محققان داربست‌هایی از ترکیب دو پلیمر ابریشم و هیالورونان تولید کردند (۲۶). هدف از ترکیب کردن این دو پلیمر، استفاده از خواص مکانیکی بهتر ابریشم همراه با به کار بردن خواص بیولوژیکی بهتر هیالورونان بوده است. طبق آزمون‌های انجام شده توسط این محققین، مقدار گلیکوز آمینو گلیکان تولید شده در داربست ابریشم- هیالورونان بسیار بیشتر از داربست ابریشمی خالص بوده است.

با توجه به نتایج حاصل از آنالیز بیان ژن (شکل ۵) بعد از گذشت ۱۴ روز، به غیر از کشت تک لایه (شاهد)، در هردو نوع داربست می‌توان بیان ژن کلاژن نوع II را به وضوح مشاهده نمود. اما میزان بیان ژن کلاژن II در داربست کامپوزیتی به طور معنی‌داری از داربست ابریشم خالص بیشتر بوده است. پس داربست کامپوزیتی قابلیت بسیار بیشتری در حفظ حالت تمایز کندروسیتی پس از جداسازی سلول‌های کندروسیت از بافت خرگوش دارا است.

بنابراین می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که پس از جداسازی سلول‌های کندروسیت و کشت آن‌ها برروی داربست کامپوزیتی طی ۱۴ روز، تمایز کندروسیتی حفظ می‌گردد و سلول‌ها ژن کندروسیتی (کلاژن نوع II) را بیان می‌نمایند. به عبارت دیگر، در داربست کامپوزیتی ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات، از دست رفتن تمایز کندروسیتی رخ نمی‌دهد. بنابراین، می‌توان بیان نمود که وجود کندروئیتین سولفات و آلژینات در داربست باعث رشد بسیار بهتر کندروسیت‌ها و تولید بهتر بافت غضروفی می‌شود؛ زیرا محیطی مانند ماتریکس خارج سلولی را برای سلول‌ها شبیه‌سازی می‌کند.

بر اساس این مطالعه، داربست ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات نسبت به داربست ابریشم جهت حفظ تمایز غضروفی کندروسیت‌ها محیط مناسب‌تری ایجاد می‌نماید. تخلخل‌های موجود در داربست ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات با یکدیگر ارتباط دارند. ترشح گلیکوز آمینو گلیکان‌ها توسط کندروسیت‌ها و نیز بیان ژن‌های غضروفی در این نوع داربست، بسیار بیشتر می‌باشد. بنابراین این نوع داربست می‌تواند به عنوان گزینه‌ای مناسب برای کاربردهای مهندسی بافت غضروف مطرح باشد.

تشکر و قدردانی

از جناب آقای مهندس محسن جانملکی، عضو هیأت علمی مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که ما را در انجام این پژوهش یاری دادند و نیز از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور که حمایت مالی این پژوهش (شماره‌ی طرح: ۹۱۰۰۳۴۰۸) را به عهده داشتند سپاسگزاری می‌نماییم.

References

1. Chung C, Burdick JA. Engineering cartilage tissue. Adv Drug Deliv Rev 2008; 60(2): 243-62.
2. Yokoyama A, Sekiya I, Miyazaki K, Ichinose S, Hata Y, Muneta T. In vitro cartilage formation of composites of synovium-derived mesenchymal stem cells with collagen gel. Cell Tissue Res 2005; 322(2): 289-98.
3. Doostmohammadi A, Monshi A, Salehi R, Fathi MH, Seyedjafari E, Shafiee A, et al. Cytotoxicity evaluation of 63s bioactive glass and bone-derived hydroxyapatite particles using human bone-marrow stem cells. Biomed Pap

Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2011; 155(4): 323-6.
4. Karbasi S, Mirzadeh H, Orang F, Urban J. A comparison between cell viability of chondrocytes on a biodegradable polyester urethane scaffold and alginate beads in different oxygen tension and pH. Iran Polym J 2005; 14 (9): 823-30.
5. Lanza R, Langer R, Vacanti J. Principles of tissue engineering. 4th ed. New York, NY: Academic Press; 2013. p. 1-15.
6. Atala A, Lanza R. Methods of tissue engineering.1st ed. New York, NY: Academic Press; 2002. p. 1027-36.
7. Nesic D, Whiteside R, Brittberg M, Wendt D, Martin I, Mainil-Varlet P. Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. Adv Drug Deliv Rev 2006; 58(2): 300-22.
8. Bueno EM, Glowacki J. Biologic foundations for skeletal tissue engineering. 1st ed. San Rafael, CA: Morgan and Claypool Publishers; 2011. p. 30-38.
9. Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, Gimble JM, Guilak F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. Biomaterials 2004; 25(16): 3211-22.
10. De FL, Grigolo B, Roseti L, Facchini A, Fini M, Giavaresi G, et al. Transplantation of chondrocytes seeded on collagen-based scaffold in cartilage defects in rabbits. J Biomed Mater Res A 2005; 75(3): 612-22.
11. Eyrich D, Brandl F, Appel B, Wiese H, Maier G, Wenzel M, et al. Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering. Biomaterials 2007; 28(1): 55-65.
12. YANG CHUN. Enhanced physicochemical properties of collagen by using EDC/NHS-crosslinking. Bull Mater Sci 2012; 35(5): 913-8.
13. Lv Q, Hu K, Feng Q, Cui F. Fibroin/collagen hybrid hydrogels with crosslinking method: preparation, properties, and cytocompatibility. J Biomed Mater Res A 2008; 84(1): 198-207.
14. Wenk E, Merkle HP, Meinel L. Silk fibroin as a vehicle for drug delivery applications. J Control Release 2011; 150(2): 128-41.
15. Vepari C, Kaplan DL. Silk as a Biomaterial. Prog Polym Sci 2007; 32(8-9): 991-1007.
16. Wang Y, Kim HJ, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials. Biomaterials 2006; 27(36): 6064-82.
17. Zhang X, Reagan MR, Kaplan DL. Electrospun silk biomaterial scaffolds for regenerative medicine. Adv Drug Deliv Rev 2009; 61(12): 988-1006.
18. Asakura T, Kuzuhara A, Tabeta R, Saito H. Conformational characterization of Bombyx mori silk fibroin in the solid state by high-frequency carbon-13 cross polarization-magic angle spinning NMR, x-ray diffraction, and infrared spectroscopy. Macromolecules 1985; 18(10): 1841-5.
19. Min BM, Jeong L, Lee KY, Park WH. Regenerated silk fibroin nanofibers: water vapor-induced structural changes and their effects on the behavior of normal human cells. Macromol Biosci 2006; 6(4): 285-92.
20. Nazarov R, Jin HJ, Kaplan DL. Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin. Biomacromolecules 2004; 5(3): 718-26.
21. Bhardwaj N, Chakraborty S, Kundu SC. Freeze-gelled silk fibroin protein scaffolds for potential applications in soft tissue engineering. Int J Biol Macromol 2011; 49(3): 260-7.
22. Yan LP, Oliveira JM, Oliveira AL, Caridade SG, Mano JF, Reis RL. Macro/microporous silk fibroin scaffolds with potential for articular cartilage and meniscus tissue engineering applications. Acta Biomater 2012; 8(1): 289-301.
23. Cao Y, Wang B. Biodegradation of silk biomaterials. Int J Mol Sci 2009; 10(4): 1514-24.
24. Wang Y, Rudym DD, Walsh A, Abrahamsen L, Kim HJ, Kim HS, et al. In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds. Biomaterials 2008; 29(24-25): 3415-28.
25. Hardy JG, Scheibel TR. Composite materials based on silk proteins. Progress in Polymer Science 2010; 35(9): 1093-115.
26. Hu K, Cui F, Lv Q, Ma J, Feng Q, Xu L, et al. Preparation of fibroin/recombinant human-like collagen scaffold to promote fibroblasts compatibility. J Biomed Mater Res A 2008; 84(2): 483-90.
27. Gobin AS, Butler CE, Mathur AB. Repair and regeneration of the abdominal wall musculofascial defect using silk fibroin-chitosan blend. Tissue Eng 2006; 12(12): 3383-94.
28. Sionkowska A, Planecka A. Preparation and characterization of silk fibroin/chitosan composite sponges for tissue engineering. Journal of Molecular Liquids 2013; 178(0): 5-14.
29. Garcia-Fuentes M, Meinel AJ, Hilbe M, Meinel L, Merkle HP. Silk fibroin/hyaluronan scaffolds for human mesenchymal stem cell culture in tissue engineering. Biomaterials 2009; 30(28): 5068-76.
30. Yan SQ, Zhang Q, Wang JN, Li MZ. Characterization of silk fibroin/hyaluronic acid blend films cross-linked with EDC. Journal of Fiber Bioengineering and Informatics 2010;

3(2): 62-7.
31. Ming J, Zuo B. A novel silk fibroin/sodium alginate hybrid scaffolds. Polym Eng Sci 2014; 54(1): 129-36.
32. Shokrgozar MA, Bonakdar S, Dehghan MM, Emami SH, Montazeri L, Azari S, et al. Biological evaluation of polyvinyl alcohol hydrogel crosslinked by polyurethane chain for cartilage tissue engineering in rabbit model. J Mater Sci Mater Med 2013; 24(10): 2449-60.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 08.04.2014
Vol. 32, No. 286, 3rd Week, July 2014
Accepted: 14.06.2014

Comparing the Effect of Silk Fibroin-Based Scaffolds on Differentiation of Rabbit Chondrocytes

Mitra Naeimi MSc[1], Mohammadhossein Fathi PhD[2], Mohammad Rafienia PhD[3], Shahin Bonakdar PhD[4]

Original Article

Abstract

Background: Osteoarthritis is a degenerative disease caused by damage or trauma to articular cartilage, leading to pain, brittleness, limitation of joint motions and swelling of the tissue. Cartilage damage is common in older people and also athletes. Chondrocytes dedifferentiate in monolayer culture. Tissue engineering involves the use of scaffold to maintain the differentiation of the cells. In this study, maintaining chondrogenic differentiation of the chondrocytes within the pure silk fibroin (SF) and silk fibroin- chondroitin sulfate- alginate (SF-CHS-SA) was compared.

Methods: Pure SF and SF-CHS-SA scaffolds were prepared through lyophilization. The microstructures of the scaffolds were studied by scanning electron microscopy (SEM). Chondrocytes were isolated from the articular cartilage tissue of rabbit and were cultured within the prepared scaffolds for 14 days. The percentage of chondrocytes viability was measured using 3-(5,4-dimethythiazol-2-yl)-5,2-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, using extract of the scaffolds. Glycosaminoglycan (GAG) secretion and gene expression of collagen II were studied using alcian blue staining and real time polymerase chain reaction (real time-PCR), respectively.

Findings: SEM showed that the composite scaffold had higher interconnected pores and pure SF scaffold had mainly closed pores. Results of the MTT assay confirmed no cytotoxicity of the prepared scaffolds. GAG secretion and collagen II expression were significantly higher in the SF-CHS-SA scaffold than the pure SF scaffold ($P < 0.05$).

Conclusion: The SF-CHS-SA scaffold is a much more suitable substrate for maintaining differentiation of the chondrocytes than pure SF scaffold or monolayer culture of chondrocytes.

Keywords: Cartilage, Tissue engineering, Chondrocyte

Citation: Naeimi M, Fathi M, Rafienia M, Bonakdar Sh. **Comparing the Effect of Silk Fibroin-Based Scaffolds on Differentiation of Rabbit Chondrocytes.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(286): 740-51

1- PhD Student, Department of Biomaterials Research, School of Materials Engineering, Isfahan University of Technology AND Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Professor, Department of Biomaterials Research, School of Materials Engineering, Isfahan University of Technology AND Dental Materials Research Center, School of Dentistry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Associate Professor, Biosensor Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Assistant Professor, National Cell Bank of Iran, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
Corresponding Author: Mitra Naeimi MSc, Email: m.naeimi@ma.iut.ac.ir