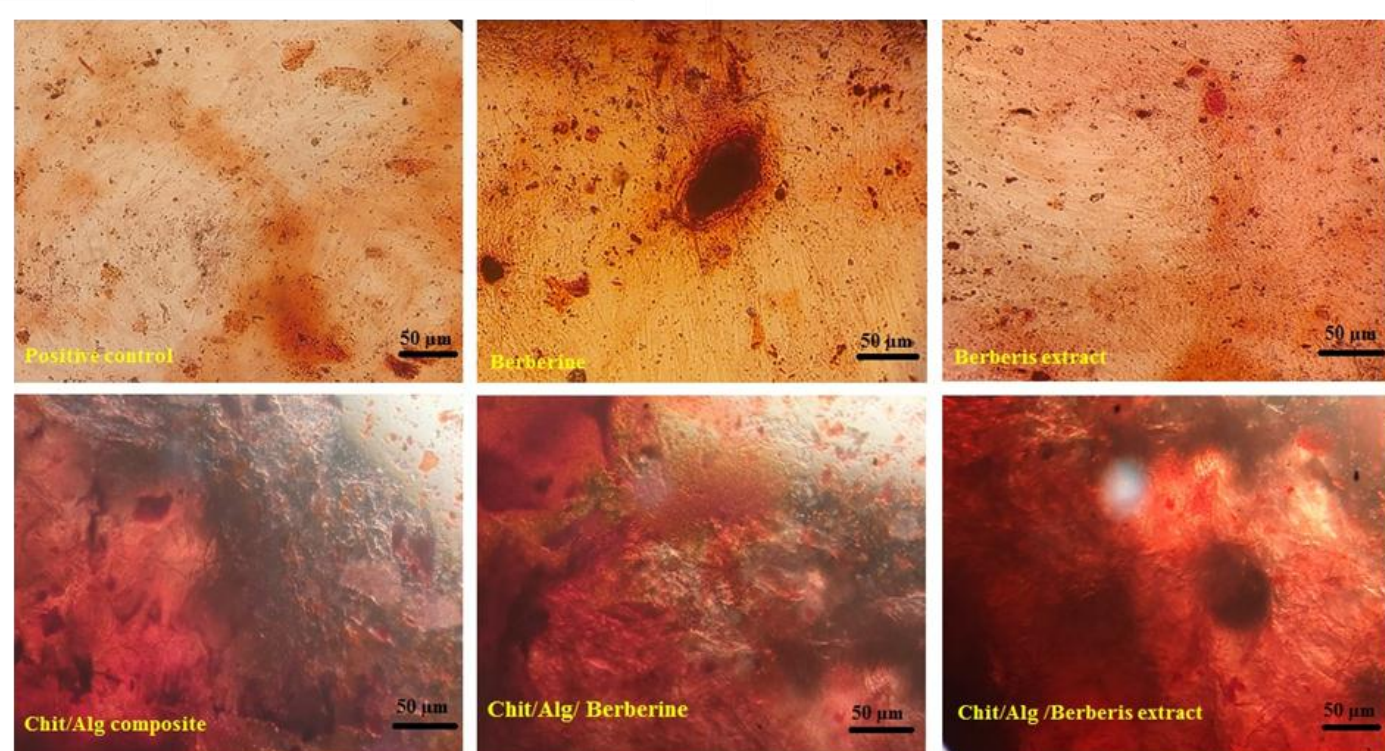
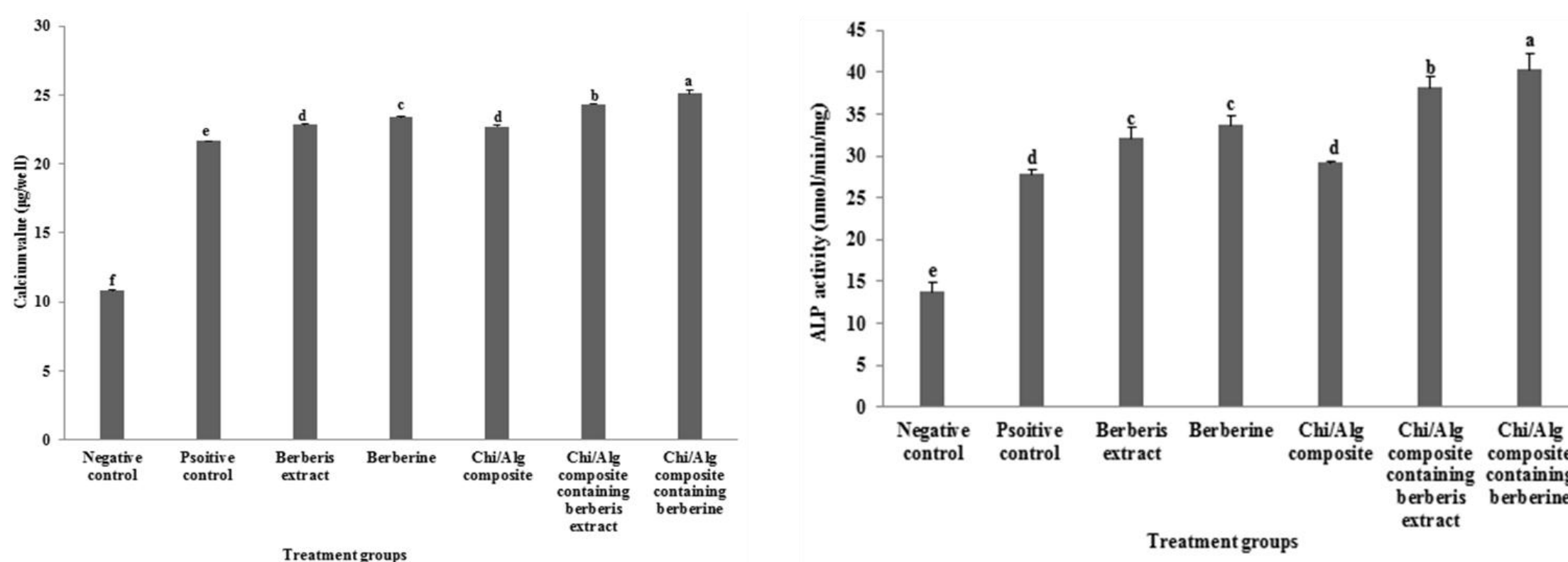
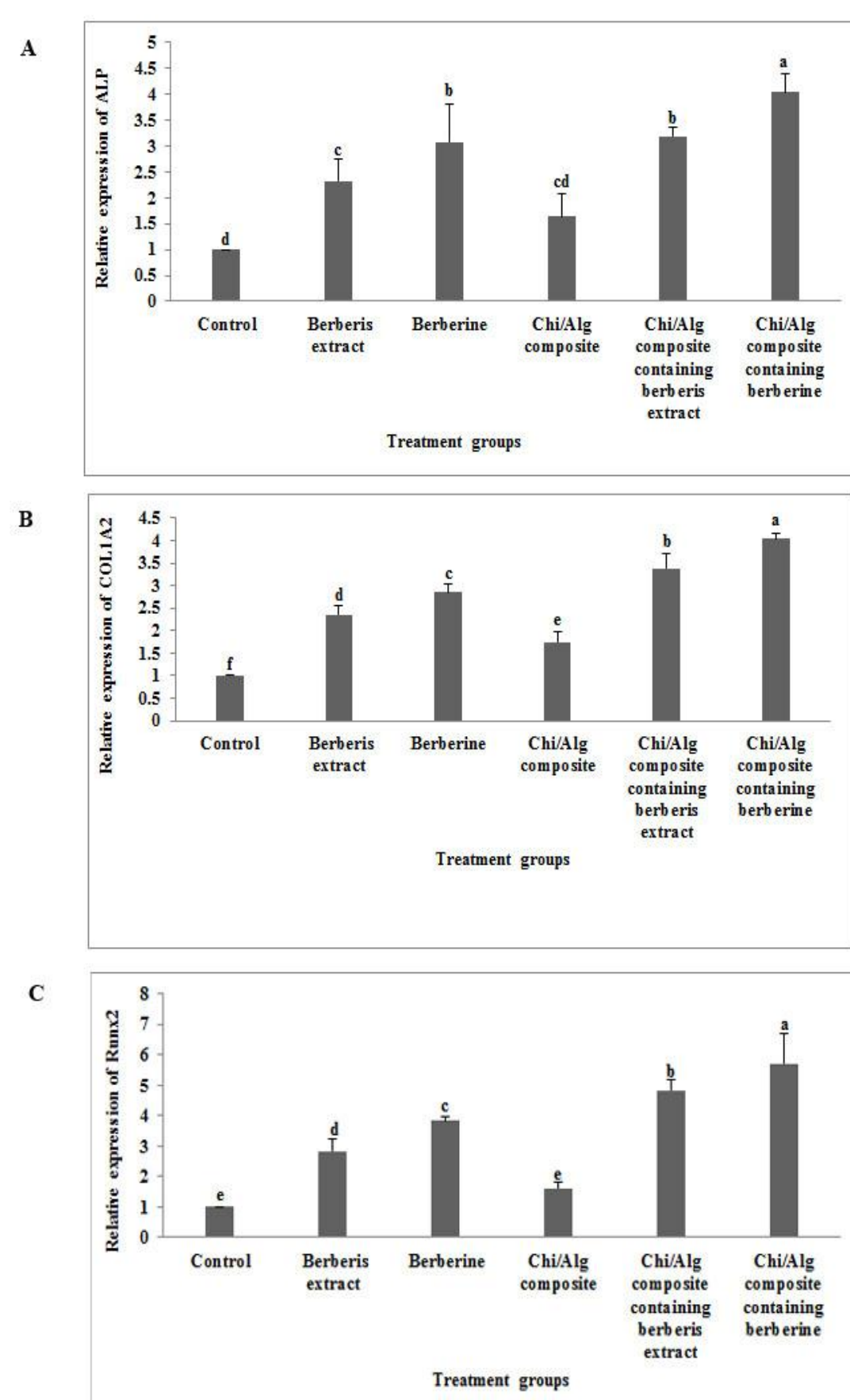


تصاویر مربوط به FTIR، EDS، FE-SEM، هیدروژل‌های سنتزی



تصاویر مربوط به درصد رسوب کلسیم و تولید آلکالین فسفاتاز



شکل: آنالیز بیان ژنهای ویژه استخوان سازی

به نظر می‌رسد حضور بربرین در داربست کیتوزان/آلژینات سبب بهبود روند استخوان سازی سلولهای بنیادی مزانشیمی در شرایط آزمایشگاهی شده است.

مقدمه

استخوان دومین بافت بدن است که به وفور پیوند داده می‌شود، و تقاضای زیادی برای جایگزینی و پیوند آن وجود دارد (Di Martino et al., 2005; Havens et al., 2006). اکثریت قریب به اتفاق شکستگی‌ها، بطور موقتی در صورتی که از نظر آناتومیکی بدون حرکت و ثابت باشند ترمیم می‌شوند. حدود ۱۰ درصد از شکستگی‌ها حتی تحت شرایط ایده‌آل مکانیکی و بیولوژیکی ترمیم نمی‌شوند به همین خاطر برای ترمیم استخوان نیاز به بررسی‌ها و توجهات بیشتری است (Khatkar and See., 2021). سلولهای بنیادی مزانشیمی از بافت مغز استخوان جداسازی شده که ظرفیت تمایز به سلولهای منتسب به بافت پیوندی مانند سلولهای استخوانی، سلولهای غضروفی و چربی و غیره را دارند (Friedenstein et al., 1974; Owen 1988; Bianco and Robey, 2000; Bianco and Robey, 2001). در مهندسی بافت استخوان داربست‌های تجزیه‌پذیر بعنوان یک اسکلت موقت در محل استخوان معیوب یا از بین رفته برای حمایت و تحریک بازسازی بافت استخوان قرار می‌گیرد درحالی‌که به تدریج تخریب می‌شود و با بافت استخوانی جدید جایگزین می‌شود (Persidis, 1999; Service, 2000; Petite et al., 2000). امروزه هیدروژل‌ها به طور وسیعی برای اهداف مهندسی بافت و بیومدیکال مورد استفاده قرار می‌گیرند. کیتوزان یک بیومتریالی است که کاندید بالقوه‌ی برای استفاده در مهندسی بافت می‌باشد (Wang et al., 2010; Li et al., 2009; Wang et al., 2007; Lu et al., 2009). این ترکیب به دلیل زیست‌سازگاری خوب، زیست تخریب‌پذیری، سمیت کم و توانایی ساخت به اشکال مختلف در مهندسی بافت، مانند فیلم‌ها (Cheng et al., 2003)، داربست‌های متخلخل (Li et al., 2005)، هیدروژل‌ها (Fukuda et al., 2006)، و لوله‌ها (Wang et al., 2010; Itoh et al., 2003; Li et al., 2009) مورد توجه بسیار است. یکی دیگر از موادی که برای پانسمان به عنوان یک ماده ارجح در نظر گرفته می‌شود نوعی پلی‌ساکارید آبیونی خطی از مشتقات جلبک سبز به آلژینات است (Varaprasad et al., 2020; Zhang & Zhao, 2020). این ترکیب دارای خواص زیست‌سازگاری، ایمنی‌زایی کم، خاصیت حفظ آب و تجزیه‌پذیری می‌باشد (Varaprasad et al., 2020; Zhang & Zhao, 2020).

بربرین نوعی آلکالوئید بنزیلیزوکینولین است که جزئی ترکیبات موجود در زرشک می‌باشد. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که بربرین تمایز به سمت سلولهای استئوکلاستی (سلولهای تجزیه‌کننده بافت استخوان) را در شرایط آزمایشگاهی مهار کرده، و در یک آزمایش حیوانی نشان داده شده که بربرین می‌تواند به طور موثری استئوپروز را در موش‌های صحرایی مهار کند (Dinesh, 2018; Zhou, 2015; Xu, 2010). در این مطالعه تلاش شده هیدروژل کیتوزان-آلژینات حاوی عصاره هیدروالکلی میوه زرشک و ماده‌ی موثره آن یعنی بربرین ساخته شده و اثرات آنها بر تکثیر و تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان جنین گوسفند مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روشها

در مطالعه‌ی حاضر، نخست، به بررسی ساخت و شناسایی داربست کیتوزان/آلژینات با یا با حضور بربرین و عصاره میوه زرشک پرداخته شد. دوم، پس از استخراج سلولهای بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان و تایید آنها با تمایز به استخوان و چربی، روند تکثیر و تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان گوسفند بر روی این داربست‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. برای بررسی تمایز، گروه‌های تیماری شامل: (۱) کشت سلولهای بنیادی مزانشیمی در محیط کشت DMEM با گلوکز بالا حاوی ۱۰ درصد FBS و آنتی بیوتیک (کنترل منفی)، (۲) کشت سلولهای بنیادی در محیط تمایز به استخوان (گروه شاهد مثبت)؛ (۳) گروه شاهد مثبت + عصاره هیدروالکلی زرشک، (۴) گروه شاهد مثبت + بربرین، (۵) کشت سلولهای بنیادی مزانشیمی در محیط تمایز به استخوان بر روی داربست کیتوزان/آلژینات (گروه هیدروژل)، (۶) کشت سلولهای بنیادی مزانشیمی در محیط تمایز به استخوان بر روی داربست کیتوزان/آلژینات/عصاره میوه زرشک (گروه هیدروژل حاوی عصاره زرشک)، و (۷) کشت سلولهای بنیادی مزانشیمی در محیط تمایز به استخوان بر روی داربست کیتوزان/آلژینات/بربرین (گروه هیدروژل حاوی بربرین)، بودند. پس از طی ۲۱ روز از کشت، میزان سطح آنزیم آلکالین فسفاتاز، میزان مینراله شدن با کیت کلسیم و سنجهش مینراله شدن با استفاده از کمی‌سازی رنگ آمیزی آلزیرین رد صورت گرفت علاوه بر این، بیان ژنهای ALP، Runx2 و ColA در سطح qRT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

سنتز داربست‌های هیدروژلی کیتوزان/آلژینات با و بدون عصاره زرشک یا بربرین توسط آزمونهای FE-SEM، XRD، FTIR، EDS مورد تایید قرار گرفت. کمترین میزان جذب آب توسط داربست هیدروژلی حاوی عصاره زرشک در روزهای ۵ و ۷ صورت گرفت که با سایر گروهها این اختلاف معنی دار بود ($p < 0.05$). داربست حاوی عصاره زرشک کمترین میزان استحکام کششی را در میان داربست‌های هیدروژلی مورد مطالعه داشت که این اختلاف معنی‌دار بود ($p < 0.05$). در این میان بیشترین میزان استحکام کششی مربوط به هیدروژل کیتوزان/آلژینات بود. حضور بربرین در هیدروژل کیتوزان/آلژینات سبب افزایش معنی‌داری در بیان ژنهای ALP، Runx2 و ColA در مقایسه با شاهد و سایر گروه‌های تیماری شد ($p < 0.05$).