مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۲، شماره ۶، بهمن و اسفند ۱۳۹۳
صفحه: ۱۶۸۱-۱۶۷۳

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 22, No.6, Jan-Feb 2015
Pages: 1673-1681

بررسی آثار کامپوزیت ژلاتین- کیتوسان بر کشت سلول‌های استرومایی مغز استخوان موش صحرایی

افسانه کرمی جویانی[۱]، مهدی صابری[*۲]، غلامرضا کاکا[۳]، سیدهمایون صدرایی[۴]، مهوش جعفری[۵]، فاطمه سالم[۶]، عسگر امامقلی[۷]

چکیده:

مقدمه: ژلاتین و کیتوسان به عنوان بیوپلیمرهای زیست سازگار و زیست تخریب‌پذیر شناخته شده‌اند. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات غشاء ژلاتین- کیتوسان بر روی زنده ماندن، تکثیر، مرگ و تمایز سلول‌های استرومایی مغز استخوان موش صحرایی می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه ابتدا فیلم کامپوزیتی ژلاتین- کیتوسان به وسیله قالب‌گیری مخلوط این دو پلیمر در اسیداستیک گلاسیال تهیه شد. پس از اینکه سلول‌های BMSC به مرحله پاساژ دوم رسید، سلول‌ها در چهار گروه کشت شامل: پلیت محیط کشت حاوی سلول و فاقد غشاء(شاهد)، پلیت محیط کشت حاوی سلول و غشاء ژلاتین، پلیت محیط کشت حاوی سلول و غشاء کیتوسان و پلیت محیط کشت حاوی سلول و غشاء ژلاتین-کیتوسان کشت داده شدند. زنده بودن سلول‌ها در روزهای دوم، چهارم و ششم توسط رنگ تریپان بلو، تکثیر سلولی از طریق شمارش سلول‌ها و مرگ سلولی توسط رنگ آمیزی آکریدین اورنج مورد بررسی قرار گرفت. همچنین با بررسی بیان پروتئین Fibronectin و CD44 به روش ایمونوسایتوشیمی تمایز سلولی در روزهای دوم، چهارم و ششم در گروه‌های مختلف بررسی شد.

نتایج: میزان تکثیر سلول‌ها در گروه کیتوسان در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری مشاهده شد($p<۰/۰۵$). اما گروه‌های ژلاتین و ژلاتین-کیتوسان مشابه گروه شاهد بوده و سلول‌ها تقریباً به یک اندازه افزایش یافته بود. همچنین عدم تمایز سلولی در تمام گروه‌ها مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد غشای ژلاتین-کیتوسان می‌تواند به عنوان مدلی مناسب از یک داربست زیست تخریب‌پذیر در مهندسی بافت و سلول درمانی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های استرومایی مغز استخوان، غشاء ژلاتین-کیتوسان، تکثیر و تمایز سلولی

۱- کارشناس ارشد سم شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ارتش جمهوری اسلامی، تهران، ایران
۲- استاد گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بقیه ا...(عج)، تهران، ایران
۳- استادیار گروه آناتومی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بقیه ا...(عج)، تهران، ایران
۴- استادیار گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بقیه ا...(عج)، تهران، ایران
۵- استادیار گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران
۶- کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران
۷- کارشناس ارشد نانوتکنولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بقیه ا...(عج)، تهران، ایران
* (نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۲۱۹۸۷۲۳۴، پست الکترونیکی: m_s_saber@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۲/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۷/۲۴

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-30]

مقدمه

سلول‌های بنیادی به دلیل توانایی در تولید انواع سلول‌های جدید و بازسازی و ترمیم بافت‌ها در زمینه مهندسی بافت مورد توجه بسیاری از دانشمندان قرار گرفته است(۱). ساخت داربست مناسب زیست تخریب‌پذیر برای کشت سلول یکی از مهمترین پارامترهای مهندسی بافت می‌باشد(۲).

داربست‌ها در مهندسی بافت باید دارای خصوصیات شیمیایی، مورفولوژیکی، بیولوژیکی و مکانیکی ویژه‌ای باشند تا عملکرد مطلوب داشته باشند. داربست‌های مناسب ضمن حفظ عملکردهای طبیعی سلول و تقویت چسبندگی آنها به عنوان یک الگو برای شکل‌گیری بافت جدید عمل می‌کنند(۳).

برای ساخت داربست‌ها در مهندسی بافت از مواد مختلفی استفاده می‌شود. یکی از این مواد، پلیمرها می‌باشند که خود به انواع مختلف زیست سازگار طبیعی و سنتزی دسته‌بندی می‌شوند. نتایج تحقیقات و تجربیات گوناگون نشان داده‌اند که پلیمرهای طبیعی دارای مزیت زیست سازگاری بیشتری نسبت به پلیمرهای سنتزی هستند(۴،۵). کیتوسان یک نوع پلیمر طبیعی است که به دلیل داشتن خواصی نظیر زیست سازگاری، زیست تخریب‌پذیری، داشتن گروه‌های عاملی فعال و داشتن ساختاری شبیه گلوکز آمینو گلیکان‌ها برای کاربرد در مهندسی بافت مناسب است(۶،۷). کیتوسان یک بیوپلیمری است که می‌تواند به سادگی به اشکالی نظیر غشاها، اسفنج‌ها و فیبرها درآید(۸،۹). ژلاتین نیز پلیمری طبیعی است که از کلاژن مشتق می‌شود و کاربردهای بسیاری در زمینه پزشکی و مهندسی پزشکی به خود اختصاص داده است(۱۰). یکی از ویژگی‌های مفید ژلاتین حلالیت خوب آن در آب است که می‌تواند با آب واکنش داده و ایجاد پیوند هیدروژنی نماید. از مزایای دیگر این پلیمر طبیعی، تخریب‌پذیری آن در محیط بدن است که میزان تخریب‌پذیری ژلاتین وابسته به باندهای کوالانس و یا هیدروژنی است که درون ساختارش وجود دارد(۱۱). مشکل اصلی در استفاده از ژلاتین در کاربردهای پزشکی عدم استحکام کافی این ماده است. همچنین ژلاتین در محیط بدن به تنهایی پایداری لازم را ندارد و به سرعت دچار تخریب می‌شود که به همین دلیل ترجیح داده می‌شود به صورت کامپوزیت با مواد دیگر مورد استفاده قرار بگیرد(۱۲). به نظر می‌رسد یکی از راهکارهای بهینه برای استفاده در سلول درمانی، کاربرد توام سلول‌های بنیادی به همراه مواد زیست تخریب‌پذیر می‌باشد. لذا مطالعه حاضر قصد دارد تا با ایجاد غشایی مرکب از ژلاتین-کیتوسان و کشت سلول‌های استرومایی مغز استخوان موش صحرایی داربستی مناسب را ارئه نماید.

روش بررسی

در این مطالعه از موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد Albino Wistar جهت استخراج سلول‌های BMSC استفاده شد که از آزمایشگاه حیوانات مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج) تهیه گردید.

مواد شیمیایی مورد استفاده شامل: پودر ژلاتین و کیتوسان (CS) (شرکت سیگما)، کتامین و زایلازین (شرکت آلفاسن هلند)، سرم و محیط کشت α-MEM (شرکت جیبکوی انگلیس)، تریپسین ۰/۰۲۵٪، و اتیلن‌دی‌تراآمین(EDTA) ۰/۰۴٪، تریپان بلو، آکریدین اورنج، هماتوکسیلین-ائوزین، آنتی‌بادی اولیه ضدفیبرونکتین موشی، آنتی‌بادی ثانویه ضدموشی گونژوگه به FITC و آنتی‌بادی ثانویه بیوتینیله شده و آنزیم avidin-biotin-peroxidase DAB. بود.

برای تهیه محلول کیتوسان، ابتدا CS با وزن ملکولی پایین (سیگما آلدریچ -آمریکا) با نسبت ۱٪ وزنی در آب دو بار تقطیر ۴۰ درجه سانتی‌گراد مخلوط شد. سپس میزان ۰/۵ میلی‌لیتر اسیداستیک گلاسیال به آن اضافه گردید و به مدت ۲ ساعت روی استیرر قرار داده شد تا کاملاً مخلوط گردد. برای از بین رفتن حباب‌های هوا، محلول به مدت ۱۰ دقیقه با ۲۵۰۰ دور بر ثانیه سانتریفیوژ گردید.

جهت آماده سازی محلول کامپوزیتی ژلاتین-کیتوسان حدود ۰/۵ گرم پودر ژلاتین (سیگما آلدریچ- آمریکا) به ۵۰ سی‌سی از محلول کیتوسان آماده شده در مرحله قبل اضافه گردید و مخلوط به مدت ۲ ساعت روی استیرر قرار گرفته تا کاملاً مخلوط گردید. برای از بین رفتن حباب‌های هوا، محلول

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-30]

به مدت ۱۰ دقیقه با ۲۵۰۰ دور بر ثانیه سانتریفیوژ شد.

به منظور تهیه فیلم کامپوزیتی ژلاتین-کیتوسان، از هر کدام از نمونه‌ها به میزان ۷/۵ میلی‌لیتر در پلیت‌هایی به قطر ۷۵ میلی‌متر ریخته شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا با تبخیر حلال، فیلم‌ها تشکیل شود. فیلم‌های حاصل از کف پلیت جدا و به مدت ۱۰ دقیقه در اتانول ۹۶٪ قرار گرفت. در پایان غشاء تثبیت شده با آب دو بار تقطیر شستشو و در دمای اتاق خشک شد(۱۰).

سلول‌های BMSC از استخوان‌های ران و درشت نی موش صحرایی بالغ نژاد ویستار استخراج گردید. بدین ترتیب که پس از بیهوش کردن حیوان با مخلوط ۵۰mg/kg کتامین و ۵mg/kg گزیلل(۱۳)، اندام خلفی و پشت حیوان توسط محلول بتادین و الکل ۷۰ درصد ضدعفونی گردید. سپس استخوان از وسط دو نیم شده و با استفاده از یک سرنگ ۵ml حاوی یک میلی‌لیتر محیط کشت Alpha Minimal Essential Medium (α-MEM) مغز استخوان از داخل کانال استخوان آسپیره شد. محتوی داخل سرنگ در زیر هود در فلاسک مخصوص کشت سلولی حاوی محیط کشت α-MEM حاوی یک درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین و (FBS: Fetal Bovine Serum) ۱۰٪ ریخته، و سپس در انکوباتور CO2 (MMM-انگلیس) قرار گرفت. پس از گذشت ۲۴ ساعت محیط کشت سلولی با محلول بافر فسفات(PBS: Phasphate Buffered Saline) استریل شستشو و با محیط تازه تعویض شد. هنگامی که تراکم سلول‌های چسبیده به کف فلاسک به ۷۰ تا ۸۰ درصد رسید، سلول‌ها توسط Trypsin ۰/۰۲۵٪ و EDTA ۰/۰۴٪ پاساژ داده شدند. این عمل تا دو پاساژ ادامه یافت، در این شرایط سلول‌ها از یک مورفولوژی دوکی شکل یکسانی برخوردار شدند.

جهت همکشتی سلول‌های BMSC با فیلم‌های کیتوسان و ژلاتین-کیتوسان، از سلول‌های BMSC پاساژ دوم مرحله قبل سوسپانسیون سلولی تهیه و پس از بررسی تعداد در واحد حجم و زنده و مرده بودن آنها توسط رنگ تریپان بلو، تعداد 5×10^{3} سلول به هر کدام از خانه‌های پلیت ۱۲ خانه‌ای مذکور اضافه شد و سپس در انکوباتور CO2 قرار داده شد. گروه‌های کاری پلیت شامل گروه اول یا شاهد بدون حضور غشاء، گروه دوم غشاء ژلاتین، گروه سوم غشاء کیتوسان و گروه چهارم غشاء ژلاتین-کیتوسان بود.

جهت بررسی خلوص سلول‌های استرومایی مغز استخوان، رنگ‌آمیزی ایمونوسایتوشیمی انجام شد و برای این منظور از آنتی‌بادی اولیه فیبرونکتین و CD44 استفاده گردید. ابتدا پلیت‌های مورد نظر با PBS به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شد، سپس سلول‌ها با محلول ۴٪ پارافرمالدئید به مدت نیم ساعت ثابت شده و پس از شستشوی مجدد با PBS و افزودن محلول بلاک‌کننده به مدت یکساعت در دمای اتاق و شستشوی مجدد، آنتی‌بادی اولیه به مدت یک شب بر روی سلول‌ها ریخته شد. پس از شستشو آنتی‌بادی ثانویه بیوتین اویدین متصل به آنزیم Peroxidase و رنگ DAB برای رنگ‌آمیزی سلول‌ها استفاده و در انتها، شستشو با PBS انجام شد. نمونه‌ها جهت تعیین درصد مثبت بودن پاسخ ایمنی توسط میکروسکوپ اینورت با بزرگنمایی ۴۰۰ توسط نرم‌افزار Infinity capture مورد بررسی قرار گرفت. نحوه شمارش به این ترتیب بود که از هر ۱۰۰ سلول شمارش شده به طور تصادفی در مناطق مختلف تعداد سلول‌های ایمونوپوزیتیو مشخص و در هر گروه ثبت شد.

برای بررسی میزان رشد و تکثیر سلول‌های زنده، هر کدام از خانه‌ها در روزهای دوم، چهارم و ششم با میکروسکوپ اینورت مشاهده و توسط دوربین دیجیتال متصل به میکروسکوپ با بزرگنمایی‌های مختلف عکس گرفته شد. جهت شمارش سلول‌ها، ۵ میدان میکروسکوپی با شی ۱۰x به صورت تصادفی انتخاب و تعداد سلول‌ها در هر میدان شمارش شد و میانگین آن محاسبه شد.

برای بررسی میزان سلول‌های زنده در پایان روز ششم، به هر کدام از پلیت‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از تریپان بلو اضافه شد و در زیر میکروسکوپ، ۱۰۰ عدد از سلول‌ها شمارش شدند و تعداد سلول‌های مرده و زنده، در روزهای مورد نظر مشخص شد. در این روش رنگ به داخل سلول‌های مرده نفوذ می‌کند و به رنگ آبی در می‌آیند و سلول‌های رنگ نشده معرف سلول‌های زنده هستند که با شمارش کل سلول‌ها و سلول‌های رنگ شده درصد

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-30]

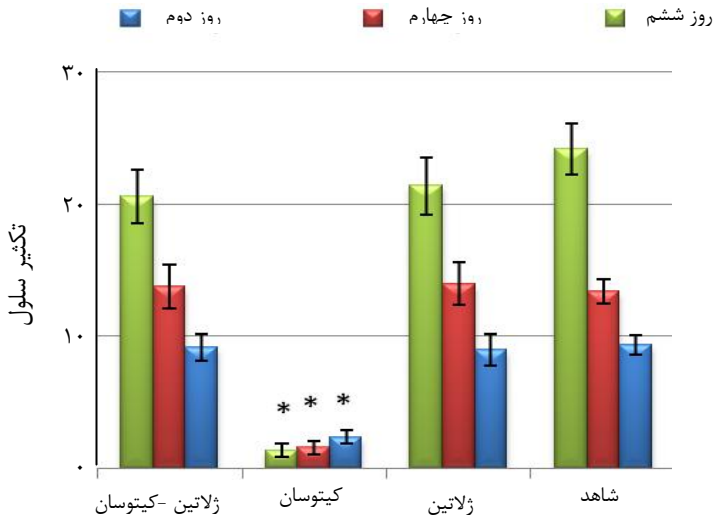
سلول‌های زنده به دست آمد.

در پایان روز ششم جهت تعیین مرگ سلولی از ماده فلورسنت آکریدین اورنج استفاده شد. برای این منظور، ۱۰۰ میکرولیتر از رنگ آکریدین اورنج در روز ششم، به هر کدام از خانه‌های مورد نظر اضافه شد و در زیر میکروسکوپ فلوروسنت، ۱۰۰ عدد از سلول‌ها شمارش شدند و با میکروسکوپ فلوروسنت عکس گرفته شد. سلول‌های با هسته نارنجی و سیتوپلاسم قرمز به عنوان سلول‌های در حال مرگ و سلول‌های با هسته و سیتوپلاسم سبز به عنوان سلول‌های زنده در نظر گرفته شد.

داده‌های به دست آمده با استفاده از روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون Tukey تجزیه و تحلیل و سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

تکثیر سلول‌های BMSC بر روی غشاء کیتوسان در تمام روزهای کشت سلولی کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشت. تکثیر سلول‌های BMSC در گروه‌های ژلاتین و ژلاتین-کیتوسان در تمام روزها مشابه گروه کنترل بود و اختلاف معنی‌داری نداشت (نمودار ۱).



نمودار ۱: تکثیر سلول‌های BMSC در روزهای دوم، چهارم و ششم در گروه‌های مورد مطالعه

* نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی دار با تمامی گروه‌ها $p<0/05$

بر اساس Viability test درصد سلول‌های مرده و زنده در انتهای مراحل نشان‌دهنده این واقعیت بود که در پایان روزهای دوم، چهارم و ششم پس از رنگ‌آمیزی سلول‌ها با تریپان بلو به جز گروه کیتوسان، در بقیه گروه‌ها بیش از ۹۰٪ سلول‌ها زنده بودند. درصد سلول‌های زنده در گروه کیتوسان نسبت به سه گروه دیگر کاهش معنی‌داری داشت (جدول ۱).

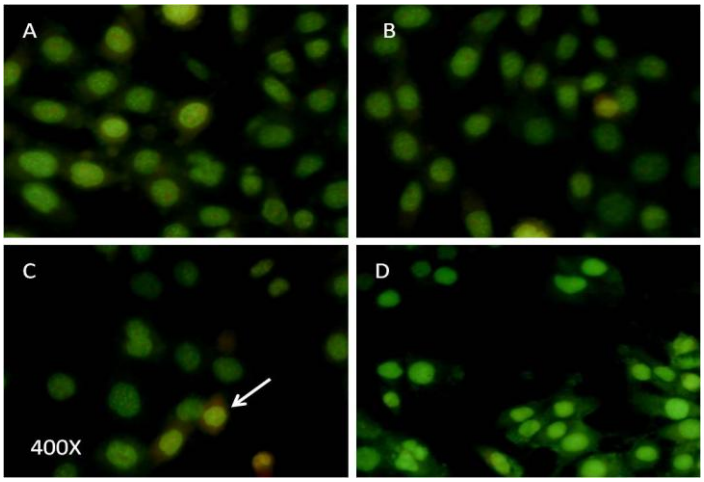
جدول ۱: درصد سلول‌های زنده در روز های دوم، چهارم و ششم (پس از سه بار تکرار).

گروه ها	درصد سلول‌های زنده در روز دوم (میانگین ± انحراف استاندارد)	درصد سلول‌های زنده در روز چهارم (میانگین ± انحراف استاندارد)	درصد سلول‌های زنده در روز ششم (میانگین ± انحراف استاندارد)
کنترل	۹۱±۱/۴	۹۲±۰/۸۳	۹۶±۱/۳
ژلاتین	۹۱±۰/۴	۹۲±۰/۸	۹۵±۰/۸
کیتوسان	*۳۶±۸	*۴۴±۳	*۶۵±۷/۴
ژلاتین-کیتوسان	۹۰±۱/۹	۹۱±۰/۷	۹۳±۲/۳

* نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار با تمامی گروه‌ها $p<0/05$

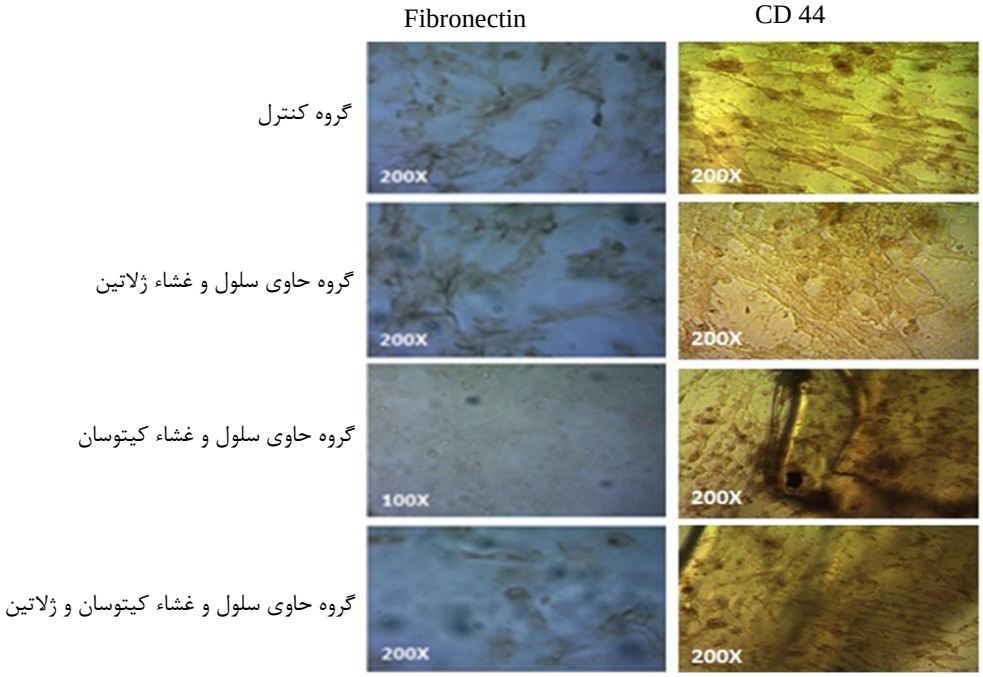
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-30]

نتایج مربوط به رنگ‌آمیزی با آکریدین اورنج نشان داد که سلول‌هایی با هسته و سیتوپلاسم قرمز تا نارنجی، سلول‌های در حال مرگ و سلول‌هایی با هسته و سیتوپلاسم سبز، سلول‌های زنده می باشد. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است اکثریت سلول‌ها در گروه‌های کنترل، ژلاتین و ژلاتین-کیتوسان پس از شش روز زنده بودند و میزان بسیار کمی از سلول‌ها دچار مرگ سلولی شده‌اند در حالی که مقدار مرگ سلولی در گروه کیتوسان نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری داشت.



شکل ۱: تصاویر رنگ آمیزی آکریدین اورنج از سلول‌های BMSC در روز ششم پس از پاساژ دوم
(A) گروه کنترل، (B) گروه ژلاتین، (C) گروه کیتوسان و (D) گروه ژلاتین-کیتوسان می باشد. نوک پیکان یک سلول در حال مرگ را نشان می‌دهد.

برای اثبات استرومائی بودن و خالص بودن BMSC به ترتیب از آنتی‌بادی‌های فیبرونکتین و CD44 استفاده گردید. شکل ۲ سلول‌ها را به رنگ قهوه‌ای نشان داد که تأییدی بر بنیادی بودن و خالص بودن سلول‌ها و عدم تمایز آنها به سلول‌های دیگر است.



شکل ۲: رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی توسط آنتی بادی اولیه آنتی Fibronectin و آنتی بادی CD44 از سلول‌های BMSC در پایان روز ششم در گروه‌های مختلف
تصاویر سمت چپ آشکار سازی آنتی بادی اولیه آنتی Fibronectin و تصاویر سمت راست آنتی بادی اولیه آنتی CD44 توسط آنتی بادی ثانویه avidin-biotin-peroxidase و رنگ DAB است که سلول‌ها به رنگ قهوه ای دیده می شود.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-30]

بحث و نتیجه‌گیری

بررسی کشت سلول‌های استرومایی مغز استخوان نشان داد که غشاء کیتوسان کاهش معنی‌داری در میزان رشد و تکثیر در مقایسه با سایر گروه‌ها دارد، در حالی که این اختلاف برای ژلاتین و ژلاتین-کیتوسان در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار نبود و این نشان‌دهنده تأثیر مثبت غشاء ژلاتین و ژلاتین-کیتوسان در رشد و تکثیر سلول‌ها می‌باشد. از طرف دیگر میانگین مرگ سلولی در گروه ژلاتین- کیتوسان و همچنین گروه ژلاتین در پایان روز ششم بسیار پایین بوده اما در مقایسه با روز دوم و چهارم این میزان افزایش یافته است در حالی که میانگین مرگ سلولی برای گروه کیتوسان در تمامی زمان‌های مربوطه نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشته است.

نتایج بررسی‌ها نشان داد، میزان رشد، تکثیر و Viability سلول‌ها در گروه ژلاتین بسیار بالا و مشابه گروه کنترل بوده است. ضمن این که سلول‌ها روی غشاء ژلاتین از چسبندگی خوبی برخوردار بودند، درصد مرگ سلولی هم پس از شش روز بسیار پایین و ناچیز بوده است. این احتمال وجود دارد که غشاء ژلاتین به دلیل داشتن اسید آمینه‌هایی مانند آرژنین، گلایسین و آسپارژین چسبندگی سلولی را افزایش داده و در نتیجه امکان رشد و تکثیر سلولی را فراهم کرده است.

با افزودن ژلاتین به کیتوسان، میزان چسبندگی سلول‌ها به غشای ژلاتین-کیتوسان افزایش یافت و به دنبال آن میزان رشد، تکثیر و Viability سلول‌ها نیز بالا رفت. این احتمال وجود دارد که موقع تشکیل غشاء، ژلاتین در سطح تماس با سلول‌ها قرار گرفته و کیتوسان را بپوشاند در نتیجه باعث افزایش مقادیر رشد، تکثیر و Viability سلول‌ها روی غشاء ژلاتین-کیتوسان گشته است که با توجه به هدف این تحقیق جهت کاربرد به عنوان داربست برای اتصال سلول‌ها در بافت هدف مناسب می‌باشد. به نظر می‌رسد پایین بودن میزان رشد و تکثیر سلول‌های BMSC بر روی غشاء کیتوسان و همچنین بالا بودن میزان مرگ سلول‌ها نسبت به غشاء ژلاتین و غشاء ژلاتین- کیتوسان به دلیل عدم تمایل سلول‌ها به چسبیدن به غشاء کیتوسان می‌باشد. تنها علت عدم تمایل سلول‌ها به چسبیدن روی غشاء کیتوسانی را باید در ساختار و نیز درجه دی‌استیله (DDA) شدن آن جستجو نمود که در مطالعه حاضر DDA در کیتوسان کم و در حدود ۳۳ درصد می‌باشد. DDA در کیتوسان استفاده شده در تحقیق Shahram و همکاران نیز کم و حدود ۳۰ درصد بوده است که از این نظر با مطالعه حاضر همخوانی دارد زیرا پایین بودن درجه دی استیله و در نتیجه حضور بالای واحدهای استیله مانع چسبندگی سلول ها به غشاء شده است(۱۲).

سلول‌های BMSCs به راحتی می توانند بر روی غشاء ژلاتین- کیتوسان و همچنین غشای ژلاتین، رشد و تکثیر طبیعی داشته و از این نظر با گروه شاهد مشابهت فراوانی داشتند. در تحقیقی که Bazargan و همکاران انجام داده‌اند، سلول‌های فیبروبلاست جنین انسان را روی فیلم کیتوسان و کامپوزیت کراتین- کیتوسان- ژلاتین کشت داده و تکثیر و چسبندگی سلول‌ها را پس از ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار دادند. آنها اختلاف معنی‌داری بین رشد، تکثیر و چسبندگی سلول‌ها در گروه کیتوسان با گروه شاهد و گروه کراتین- کیتوسان- ژلاتین گزارش کرده و به این نتیجه رسیدند که چسبندگی و تکثیر سلول‌ها در مجاورت فیلم کیتوسان نسبت به گروه شاهد بسیار کم و این میزان در گروه کراتین- کیتوسان- ژلاتین بالا و مشابه گروه شاهد بوده است که از این نظر نتیجه تحقیق حاضر بسیار شبیه نتایج کار ایشان است(۱۴).

سلول‌های BMSC بر روی غشاء ژلاتین-کیتوسان و همچنین غشای ژلاتین و کیتوسان پس از شش روز دچار تمایز نشدند و همچنان بنیادی بودن خودشان را حفظ کرده بودند. در تحقیق حاضر برای تعیین درصد خلوص سلول‌های استرومایی به دلیل وجود گلیکوپروتئین فیبرونکتین در سلول‌های با منشأ مزانشیمی، سلول‌های BMSC بر علیه این گلیکوپروتئین به روش ایمونوسایتوشیمی رنگ شدند، بیان بالای این پروتئین در سلول‌ها مؤید بنیادی بودن آنها بود. این روش توسط سایر محققین نیز به کار گرفته شده است(۱۵،۱۶).

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-30]

در تأیید خلوص سلول‌های BMSC از آنتی‌بادی CD44 نیز استفاده شد که نتایج مانند آنتی‌بادی فیبرونکتین درصد بالایی از سلول‌ها مثبت بودند و بیان آنتی‌بادی CD45 بسیار ناچیز بود. این نتایج بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی توسط دیگران نیز نشان داده شده است(۱۷). Lamoury و همکاران سلول‌های BMSC حیوان و انسان را در دو محیط جداگانه کشت داده و با استفاده از آنتی‌بادی ضدفیبرونکتین و بیان mRNA ژن Oct-4 هویت بنیادی بودن آنها را تأیید کردند(۱۸). همچنین Chen و همکاران در مطالعه‌ای هویت بنیادی بودن سلول‌های جنینی را توسط بیان پروتئین Oct-4 ارزیابی کردند(۱۹).

با بررسی تکثیر سلول‌های BMSC، پایین بودن میزان مرگ سلولی و عدم تمایز سلول‌ها بر روی غشاء ژلاتین-کیتوسان و غشاء ژلاتین، این غشاها می‌تواند در مهندسی بافت به عنوان مدلی کاربردی مورد استفاده قرار گیرند(۲۰،۲۱). از طرف دیگر با توجه به اینکه غشاء ژلاتین در محیط بدن به تنهایی پایداری لازم را ندارد و به سرعت دچار تخریب می‌گردد، بنابراین غشاء ژلاتین-کیتوسان جهت استفاده در مهندسی بافت بهترین کاندید می‌باشد.

References:

1- Barry FP, Murphy JM. ***Mesenchymal stem cells:clinical applications and biological Characterization.*** Int J Biochem Cell Biol 2004; 36(4): 568-84.

2- Subramanian A, Krishnan UM, Sethuraman S. ***Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration.*** J Biomed Sci 2009;16: 108.

3- Mao J, Zhao L, Yin YJ, Yao KD. ***Structure and properties of bilayer chitosan- gelatin scaffolds.*** Biomaterials 2003; 24(6): 1067-74.

4- Kim S, Nimni ME, Yang Z, Han B. ***Chitosan/gelatin-based films crosslinked by proanthocyanidin.*** J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2005; 75(2): 442-50.

5- Zhang Z, Cui H. ***Biodegradability and biocompatibility study of poly (chitosan-g-lactic acid) scaffolds.*** Journal of Molecules 2012; 17(3): 3243-58.

6- Cho Y, Shi R, Borgens RB. ***Chitosan produces potent neuroprotection and physiological recovery following traumatic spinal cord injury.*** J Exp Biol 2010; 213(Pt 9): 1513-20.

7- Muzzarelli RA, Mattioli-Belmonte M, Pugnaloni A, Biagini G. ***Biochemistry, histology and clinical uses of chitins and chitosans in wound healing.*** EXS 1999; 87: 251-64.

8- Dhandayuthapani B, Krishnan UM, Sethuraman S. ***Fabrication and characterization of chitosan-gelatin blend nanofibers for skin tissue engineering.*** J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2010; 94(1): 264-72.

9- Zheng L, Cui FH. ***Use of chitosan conduit combined with bone marrow mesenchymal stem cells for promoting peripheral nerve regeneration.*** J Mater Sci Mater Med 2010; 21(5): 1713-20.

10- Cheng M, Deng J, Yang F, Gong Y, Zhao N, Zhang X. ***Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions.*** J Biomaterials 2003; 24(17): 2871-80.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-30]

11- Chen H, Zhao Z, Zhao Y, Yang Y. ***Fabrication and evaluation of chitosan–gelatin based buckling implant for retinal detachment surgery.*** J Mater Sci Mater Med 2010; 21(10): 2887-95.

12- Shahram E, Sadraie SH, Kaka G, Khoshmohabat H, Hosseinalipour M, Panahi F, et al. ***Evaluation of chitosan – gelatin films for use as postoperative adhesion barrier in rat cecum model.*** Int J Surg 2013; 11(10): 1097-102.

13- Yeu IS, Lee HJ, Yi JS, Yang JH, Lee IW, Lee HK. ***The survival and migration pattern of the bone marrow stromal cells after intracerebral transplantation in rats.*** J Korean Neurosurgery 2004; 36: 400-4.

14- Bazargan R, Bahrololoom ME, Nemati A. ***Preparation and Mechanical Evaluations of a Novel Keratin-Chitosan-Gelatin Composite Film.*** World App Sci J 2009; 7(6): 763-68.

15- Li M, Guo Y, Wei Y, MacDiarmid AG, Leikes PI. ***Electrospinning polyaniline-contained gelatin nanofibers for tissue engineering applications.*** Biomaterials 2006; 27(13): 2705-15.

16- Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfallie CM, Low WC. ***Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats.*** J Exp Neurol 2002; 174(1): 11-20.

17- Bossolasco P, Cova L, Calzarossa C, Rimoldi SG, Borsotti C, Deliliers GL, et al. ***Neuro-glial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro***. J Exp Neurol 2005; 193(2): 312-25.

18- Lamoury FM, Croitoru-Lamoury J, Brew BJ. ***Undifferentiated mouse mesenchymal stem cells spontaneously express neural and stem cell markers Oct-4 and Rex-1.*** J Cytotherapy 2006; 8(3): 228-42.

19- Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, et al. ***Therapeutic of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats.*** J Stroke 2001; 32(4): 1005-11.

20- Chen X, Yang Y, Yao J, Lin W, Li Y, Chen Y, et al. ***Bone marrow stromal cells-loaded chitosan conduits promote repair of complete transection injury in rat spinal cord.*** J Mater Sci Mater Med Biomaterials 2011; 22(10): 2347-56.

21- Chen KY, Dong GC, Hsu CY, Chen YS, Yao CH***. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous gelatin scaffolds containing Drynaria fortunei extract for bone repair.*** J Biomed Mater Res A 2013; 101(4): 954-62.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-30]

Investigating Effects of Gelatin-Chitosan Film on Culture of Bone Marrow Stromal Cells in Rat

Karami Joyani A(MSc)[1], Saberi M(PhD)[2], Kaka Gh(PhD)[3], Sadrai SH(PhD)*[4], Jafari M(PhD)[5], Salem F(MSc)[6], Emamgholi A(MSc)[7]

[1]*Department of Pharmacology, Aja University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[2]*Department of Pharmacology, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[3]*Department of Anatomy, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[4]*Department of Anatomy, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[5,6]*Department of Biochemistry, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[7]*Department of Nanotechnology, Neuro Science Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

Received: 18 May 2014 ***Accepted:*** 16 Oct 2014

Abstract

Introduction: Gelatin and Chitosan are known as biodegradable and biocompatible biopolymers. These biopolymers have recently received increasingly more attention for tissue engineering. The aim of this study was to survey of effects of Gelatin-Chitosan film in viability, proliferation, apoptosis and differentiation on bone marrow stromal cell (BMSCs) culture in rat.

Methods: Fist, gelatin- chitosan composites film were prepared by solution mixing , of both biopolymer in %75 acetic acid. After two passage of BMSCs culture, cells in the four groups including control, gelatin, chitosan and chitosan-gelatin were grown. The cells viability during the second, fourth and sixth days by tripanblue, proliferation by cell account and cell apoptosis by Acridin Orange were examined. Also cell differentiation during the second, fourth and sixth day were evaluated by immunocytochemistry .

Results: The results showed significant reduction in cell proliferation in chitosan alone group ($P<0.05$). But the gelatin and chitosan-gelatin groups were similar to the control group as the cell proliferation was increased. Also all groups had no cell differentiation.

Conclusion: Results of proliferation,differentiation and apoptosis cultured BMSCs on a gelatin-chitosan film showed that gelatin-chitosan film can be used as a good model of a biodegradable scaffold in tissue engineering and cell therapy.

Keywords: Bone Marrow Stromal Cell, Gelatin- Chitosan- Film, Cell Proliferation and Differentiation

This paper should be cited as:
Karami Joyani A, Saberi M, Kaka Gh, Sadrai SH, Jafari M, Salem F, et al. ***Investigating effects of gelatin-chitosan film on culture of bone marrow stromal cells in rat***. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2015; 22(6): 1673-81.

Corresponding author: Tel: +98 09121987234, Email: m_s_saber@yahoo.com

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-30]