

بررسی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی مشتق از مغز استخوان کشت‌داده‌شده روی داربست کربوکسی‌متیل سلولز بافته‌نشده به سلول‌های شبه غضروفی

نگار اسداللهی^۱، فروغ اعظم سیاح پور^۲، فریبا کریم زاده^۳، افضل کریمی^۴، ابوالفضل لطفی^۵، فائزه فقیهی^{۶، *}

^۱ گروه زیست‌شناسی تکوینی، دانشگاه علم و فرهنگ، تهران، ایران

^۲ گروه جراحی، کالج پزشکی ویسکانسین، میلواکی، ایالات متحده آمریکا

^۳ مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

^۴ گروه مهندسی بافت، دانشکده فناوری‌های پیشرفته پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

^۵ دانشکده کشاورزی دماوند، دانشگاه ملی مهارت، تهران، ایران

^۶ مرکز تحقیقات ژنتیک ایمنی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

* نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران. ایمیل: faghihi.f@iums.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۲۷ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۰۲

چکیده

مقدمه: تروما می‌تواند تاثیر قابل توجهی روی بافت غضروف و کیفیت زندگی انسان داشته باشد. قابلیت بازسازی محدود غضروف منجر به استفاده از مداخلات پزشکی برای درمان این بافت شده است. کربوکسی‌متیل سلولز (carboxymethylcellulose) یک ماده آبیونی سلولزی با قیمت و خواص مکانیکی مناسب است. کربوکسی‌متیل سلولز به‌عنوان ماده لوبریکانت در ساخت سازه‌های هیدروژل در کشت سلول استفاده می‌شود.

اهداف: از آنجا که سلول‌های غضروفی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان تمایز می‌یابند، در این مطالعه به بررسی قابلیت تمایز غضروفی این سلول‌ها روی داربست کربوکسی‌متیل سلولز بافته‌نشده در یک سیستم تک‌لایه، پرداختیم.

مواد و روش‌ها: کربوکسی‌متیل سلولز بافته‌نشده سنتز و با (SEM, FTIR (Fourier-transform infrared spectroscopy) میکروسکوپی الکترونی (scanning electron) و تست‌های مکانیکی ارزیابی شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان استخراج و با فلوسایتومتری شناسایی شد. پس از تحریک تمایز کندروژنیک، زیستایی سلول‌های متصل به داربست و بیان ژن‌های مرتبط با تمایز غضروفی با MTT (dimethyl thiazolyl diphenyl tetrazolium) و Q-PCR (Quantitative polymerase chain reaction) بررسی شد.

نتایج: MTT نشان داد که تفاوت معنی‌داری در زنده‌مانی سلول‌ها بین گروه کنترل (سلول‌های بدون داربست) و گروه آزمایش وجود نداشت. تصاویر SEM نشان داد که سلول‌ها قادر به چسبیدن و توزیع موفقیت‌آمیز روی غشا بودند. طیف‌های FTIR حضور گروه‌های کربونیل، متیل و هیدروکسیل را نشان داد. مقاومت کششی به‌ترتیب در شکل خشک 0.155 ± 0.224 و در شکل مرطوب 0.164 ± 0.306 ارزیابی شد که معنی‌دار نبود. مدول یانگ به‌ترتیب برابر با 0.077 و 0.079 مگاپاسکال در حالت خشک و مرطوب بود. پس از دو هفته کشت تمایزی، افزایش معنی‌داری در بیان ژن‌های تمایزی اولیه Sox-9 و Collagen II مشاهده شد ولی در بیان Collagen X و Aggrecan افزایش معنی‌داری مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان به داربست کربوکسی‌متیل سلولز بافته‌نشده چسبیده و در حضور عوامل القایی قادر به بیان ژن‌های ابتدایی مسیر تمایز به غضروف بوده‌اند؛ لیکن بیان ژن‌های اختصاصی تر غضروفی و نیز تغییر مورفولوژی سلول به سمت فنوتیپ غضروفی و تشکیل لاکونا مشاهده نشد.

واژگان کلیدی: کربوکسی‌متیل سلولز، غضروف، سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان

۱. مقدمه

در تلاش است بافت غضروف را با حفظ وظایف و خواص بیولوژیکی آن بازسازی کند (۱، ۲). این امر با تعامل اجزای داربست با سلول‌های کشت‌شده در جهت تنظیم بیان ژن و تولید پروتئین تسهیل می‌گردد (۳). کربوکسی‌متیل سلولز (CMC) پلیمری طبیعی و نخستین

غضروف نقش حیاتی در حفظ سلامت بدن در مقابله با تنش‌های مکانیکی و جذب شوک حرکتی ایفا می‌کند. به‌دلیل طبیعت بدون عروق بافت غضروفی، بازسازی آن، چالش‌برانگیز است؛ از این رو مهندسی بافت به‌عنوان رویکردی جایگزین با استفاده از ساختارهای مبتنی بر سلول،

مشق از مغزاستخوان انسان (hBM-MSCs: Human bone marrow mesenchymal stem cells) روی سطح غشای کربوکسی متیل سلولز بافته نشده در یک سیستم دوبعدی را مورد بررسی قرار دهیم.

۲. مواد و روش‌ها

تمامی مراحل این طرح اعم از سنتز داربست و تهیه سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان پس از اخذ مجوز از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی ایران با کد اخلاق IR.IJMS.REC.1398.1324 اجرا شد.

۱.۲ ساخت و توصیف سازه‌های کربوکسی متیل سلولز

۱.۱.۲ سنتز الیاف هیدروسلولز کربوکسی متیل شده

در مرحله اول واکنش، که با نام مرسریزاسیون یا قلیایی شدن شناخته می‌شود، ۱۰ گرم از پودر هیدروکسید سدیم (Sigma, USA) در ۳۰۰ میلی‌لیتر الکل (Pars, Iran) ۸۰ درصد حل شد. سپس این محلول به مدت یک ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد هم‌زده شد. هدف از این مرحله، تیمار الیاف سلولز (Sigma, USA) با محلول قلیایی است که باعث تورم و تغییرات ساختاری در آن می‌شود. پس از مرحله مرسریزاسیون، الیاف سلولزی با اتر فراوری می‌شوند. این فرآیند شامل تیمار الیاف با یک عامل اتری‌ساز برای وارد کردن گروه‌های اتر (Merck, Germany) به ساختار سلولز است. به‌طور کلی، این واکنش دو مرحله‌ای از مرسریزاسیون و سپس اتری‌سازی روی ۲۰ گرم الیاف سلولزی برای تهیه الیاف هیدروکسی سلولز کربوکسی متیل انجام شد. در مرحله بعدی، ۱۲/۵ گرم مونوکلرواستیک اسید (Merck, Germany) در ۵۰ میلی‌لیتر الکل ۸۰ درصد حل شد. سپس این محلول به مخلوط الیاف مرسریز شده سلولزی اضافه شد. واکنش به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد با تکان‌دهی دوره‌ای ادامه یافت. محصول حاصل دو بار با ۵۰۰ میلی‌لیتر الکل ۷۰ درصد و یک بار با الکل ۹۶ درصد شست‌وشو داده شد تا فرآورده‌های جانبی حذف شود و الیاف خشک شوند. سپس وب فیلتر شده در فر در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج ساعت خشک شد.

۲.۱.۲ FTIR

برای تجزیه و تحلیل ابتدا نمونه به قطعات کوچک خرد شد. سپس با نمک KBr (Potassium Bromide) مخلوط شد و مخلوط به‌صورت قرص فشرده شد. سپس این قرص در یک اسپکتروفتومتر FT-IR NEXUS 670 (Thermo Nicolet, USA) قرار گرفت. طیف FTIR به‌صورت انتقالی ثبت شد و محدوده

مشق آنیونی سلولزی قابل حل در آب است (۴) که توسط سازمان غذا و دارو آمریکا تأیید شده است (۵)، فرآیند سنتز کم‌هزینه، ویژگی‌های سطحی، قابلیت شکل‌پذیری و هیدروفیلی قابل تنظیم، آن را به یک ماده محبوب در حوزه زیست‌پزشکی تبدیل کرده است (۲، ۷-۹). کربوکسی متیل سلولز و مشتقات آن به دلیل استحکام مکانیکی، ویژگی‌های رئولوژیکی و سازگاری بیولوژیکی عالی، به‌طور گسترده در مهندسی بافت، زخم‌پوش‌ها و نیز ایمپلنت‌های زیست‌سازگار استفاده می‌شوند (۱۳-۱۰). در پزشکی از این ماده مانند گلوکز آمین (۱۴) به‌عنوان یک ماده ضدسایش در مفصل استفاده شده است (۱۳). علاوه بر این، به‌صورت هیدروژل و به‌عنوان حامل برای انتقال سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان در ایمپلنت‌های ارتوپدی و نیز انتقال سلول‌های غضروف مفصلی به‌منظور بازسازی غضروف کاربرد دارد. این سیستم هیدروژلی محیط مناسبی برای رشد و حفظ تمایز سلول‌ها فراهم کرده، در بازسازی و تعمیر بافت‌های آسیب دیده کمک می‌کند (۱۵).

تاکنون انواع مختلفی از سلول‌ها اعم از سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای بازسازی غضروف، سلول‌های بنیادی مشتق از چربی (۱۶) برای بازسازی بافت چربی و هیپاتوسیت‌ها و برای کاربردهای غربالگری دارو، به‌منظور بررسی ویژگی‌های فیزیولوژیکی کربوکسی متیل سلولز ها، به‌ویژه به‌صورت هیدروژل مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در واقع کپسوله کردن سلول‌ها داخل هیدروژل امکان آزادسازی کنترل شده و پایدار سلول‌ها را فراهم کرده، به بقا و تمایزشان کمک می‌کند (۱۱، ۱۷، ۱۸).

علاوه بر ویژگی هیدروژلی، ساخت غشای کربوکسی متیل سلولز در یک سیستم کشت سلول دوبعدی، سطح مناسبی برای چسبندگی و رشد سلول فراهم می‌کند. سیستم کشت دوبعدی می‌تواند برای کاربردهای مختلفی مانند مطالعه رفتار سلولی، غربالگری دارو و مهندسی بافت استفاده شود و یک پلتفرم چندمنظوره برای تحقیقات مبتنی بر سلول را فراهم کند (۱۸). از آنجا که غشاهای کربوکسی متیل سلولز بافته نشده ارزان‌تر (۱۹) و دارای استحکام کششی بالاتری در مقایسه با هیدروژل‌ها هستند (۲۰)، می‌توانند برای حمایت ساختاری بافت‌های غضروبی مناسب‌تر باشند. این غشاها دارای تخلخل بالاتری نسبت به فرم هیدروژلی هستند (۲۱) از این رو می‌توانند انتشار مواد مغذی و اکسیژن را برای حمایت از رشد سلولی و بازسازی بافت افزایش دهند؛ به‌علاوه نسبت به حالت هیدروژل به راحتی قابل دست‌ورزی و جابه‌جایی بوده، امکان قرارگیری و ادغام دقیق در بافت هدف را فراهم می‌کنند. موارد فوق‌تر را بر آن داشت تا فرآیند تمایز به غضروف سلول‌های بنیادی مزانشیمی

موج ۱۰۰۰ تا ۴۰۰۰ سانتی متر^{-۱} را پوشش داد. برای هر نمونه، ۴۰ اسکن انجام شد.

۳.۱.۲. میکروسکوپ الکترونی

جهت آماده سازی نمونه ها برای مشاهده با میکروسکوپ الکترونی روبشی، ابتدا داربست ها (با سلول یا بدون سلول) در PBS (Phosphate Buffered Saline; Gibco, USA) شست و شو داده شدند تا هر گونه آلاینده یا ذرات از بین برود. سپس در محلول ۲/۵ درصد گلو تارالدهید (Sigma, USA) به مدت دو ساعت فیکس شدند. پس از شست و شو با آب مقطر به ترتیب در غلظت های اتانول (۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد) هر یک به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. پس از اتمام فرآیند آگیری و خشک شدن نمونه در زیر هود، با طلا پوشش داده شده و برای مشاهده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM؛ مدل AIS2100؛ Seron Technology, South Korea) مورد بررسی قرار گرفت.

۴.۱.۲. تست مکانیکی

تست مکانیکی روی فیلم کربوکسی متیل سلولز به ابعاد $۲۹/۶۲ \times ۱۲/۹۹ \times ۰/۸$ میلی متر با استفاده از آنالیزور بافتی (Santam, Iran) انجام شد. مقاومت کششی فیلم با کشیدن آن با سرعت ۱۰ میلی متر در دقیقه تحت رطوبت نسبی ۳۵-۴۰ درصد اندازه گیری شد. برای هر آزمایش، یک منطقه فیلم به مساحت یک سانتی متر مربع استفاده شد. بیشینه تنش مشاهده شده در طول آزمایش به عنوان مقاومت کششی (TS) ثبت شد. شیب اولیه منحنی های تنش- کرنش در قسمت خطی به عنوان مدول یانگ (E) محاسبه شد. همچنین، کشش در نقطه شکست، جایی که فیلم پاره شد، نیز تعیین شد. آزمون کششی روی سازه به صورت خشک و مرطوب با طول ۹/۲۱ میلی متر انجام شد. سازه با استفاده از یک دستگاه آزمایش با یک سلول بار ۰/۳۱ نیوتن با سرعت ۱۰ میلی متر در دقیقه تا پاره شدن، کشیده شد. سه نمونه از سازه آزمایش شد و کرنش و تنش هر نمونه ثبت شد.

۲.۲. جداسازی و توصیف سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان

۱.۲.۲. جداسازی سلول های بنیادی سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان (BM-MSCs)

در این مطالعه، سلول های بنیادی مزانشیمال استخوانی نخاع انسان (BM-MSCs) با استفاده از روش هایی که در مقالات قبلی (۲۵-۲۲) شرح داده شده بود، جداسازی و توصیف شدند.

به طور خلاصه، نمونه مغز استخوان با محلول PBS مخلوط شد و روی فایکول قرار گرفت و سلول های تک هسته ای با استفاده از سانتریفیوژ جدا شدند. سپس این سلول ها با غلظت ۱۰۶ سلول به ازای هر سانتی متر مربع در یک فلاسک کشت شدند. سلول ها در محیط کشت خاصی که شامل محیط Dulbecco's modified Eagle's medium-F12 (DMEM)-F12 با سرم جنینی گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS, 10%)، پنی سیلین و استرپتومایسین (۱ درصد) بود، کشت شدند (All from Gibco, USA). سلول ها در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سلسیوس با ۵٪ CO₂ انکوبه شدند. در طول فرآیند کشت، محیط کشت هر ۴۸ ساعت یکبار تعویض شد. هنگامی که سلول ها به تراکم ۸۰-۷۰ درصد رسیدند، به سه فلاسک جدید منتقل شدند. برای آزمایشات بعدی، سلول ها در پاساژ سوم مورد استفاده قرار گرفتند.

۲.۲.۲. شناسایی سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان (BM-MSCs)

سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان با استفاده از فلوسایتومتری (Becton-Dickinson, USA)، طبق پروتکل راه اندازی شده قبلی ما شناسایی شدند (۲۰). به طور خلاصه، برای شناسایی سلول های بنیادی مزانشیمی، 2×10^5 سلول در دمای ۴ درجه سلسیوس با سرم بز ۱۰ درصد انکوبه شدند. پس از یک ساعت، سرم حذف شد و سلول ها با آنتی بادی های مونوکلونال متصل به فلوروکروم علیه آنتی ژن های CD34، CD45، CD44، CD73 و CD90 انسان (561970, 561014, 347943 347463, 348057، All from Bioscience, Cat numbers: در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ دقیقه انکوبه شدند. آنتی بادی های ایزوتایپ با آنتی ژن های استفاده شده به عنوان کنترل استفاده شدند. بیان آنتی ژن ها با استفاده از فلوسایتومتری اندازه گیری شد و تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار فلوجو انجام شد.

۳.۲. کشت سلول و ارزیابی اتصال سلولی به داربست

برای آماده سازی داربست ها برای کشت سلول، اشکال دایره ای از غشاهای کربوکسی متیل سلولز با ضخامت یک سانتی متر برای جاگذاری در چاهک های ۲۴ خانه برش داده شد. ساختارها با استفاده از نور UV به مدت یک ساعت از هر طرف استریل شدند. بعد از آن، هر چاهک با محیط DMEM-F12 که حاوی ۱۰٪ FBS و دو درصد پنی سیلین/استرپتومایسین بود، پر شد. سپس ظروف کشت به انکوباتور منتقل شد. پس از یک شب، محیط اضافی برداشته

۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر BMP-6، ۵۰ میکروگرم آلبومین سرم گاوی، ۰/۱ میکرومول دگزامتازون، ۰/۵ میلی‌مول اسیدآسکوربیک (All from Sigma, USA) و ۱٪ FBS به هر چاهک اضافه شد. سپس نمونه‌ها در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO₂ به مدت دو هفته نگهداری شدند و محیط کشت هر سه روز یکبار تعویض شد.

۵.۲. بررسی بیان ژن

برای ارزیابی بیان ژن‌های مرتبط با غضروف، Q-PCR (Quantitative polymerase chain reaction) انجام شد. برای این منظور، از ماده TRIZOL (اینویترژن، آمریکا) برای استخراج RNA از نمونه‌های تیمار شده در روز ۲۰ پس از شروع تمایز غضروفی استفاده شد. پس از سنتز DNA مکمل با استفاده از کیت سنتز RevertAid H Minus استفاده شد. عمل PCR با استفاده از SYBR Green و پرایمرهای مخصوص (جدول ۱) در حضور ۱۲ نانوگرم cDNA در دستگاه ریل تایم PCR ۷۵۰۰ (Applied Biosystems، آمریکا) انجام شد. سطح بیان ژن‌های هدف با سطح بیان GAPDH که به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد، نرمال گردید. سپس سطح بیان نرمال شده با بیان همان ژن هدف در hBM-MSC تیمار نشده در پاساژ ۳ (گروه کنترل) مقایسه شد.

شد و تعداد 2×10^5 سلول بنیادی مزانشیمی در هر چاهک و در حجم کل ۵۰۰ میکرولیتر کشت شد. سپس ظروف کشت مجدداً به مدت یک ساعت در انکوباتور، انکوبه شدند. پس از انکوبه، محیط کشت اضافی به هر چاهک اضافه شد و حجم کل به یک میلی‌لیتر رسید. برای ارزیابی زیستایی سلول‌های متصل به داربست آزمون MTT (Sigma, USA) انجام شد (۲۶).

آزمون MTT در ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت پس از کشت سلول انجام گرفت. به این ترتیب که ابتدا محیط کشت از هر چاهک خارج شد و محلول MTT به آن اضافه شد. پس از چهار ساعت انکوباسیون، محیط کشت حاوی MTT تخلیه شد و ایزوپروپانول اسیدی برای حل کریستال‌های فرمازان اضافه شد. محلول فرمازان حل شده به یک چاهک ۹۶ تایی منتقل شد و جذب نور در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانش شد. غشای CMC بدون سلول به‌عنوان نمونه بلانک جهت اصلاح پس زمینه استفاده شد.

۴.۲. القای تمایز به غضروف

برای القای تمایز به غضروف، ۲۴ ساعت پس از کشت سلول‌ها، محیط غضروف شامل محیط کشت DMEM (Gibco, USA)، ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر TGF- β ، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ترانسفرین-سلنیوم-اینسولین (سیگما، آمریکا)،

جدول ۱. لیست پرایمرهای مورد استفاده در ریل تایم-PCR

نام ژن‌ها	توالی پرایمرها
GAPDH	F: CTCATTTCCTGGTATGACAAC; R: CTCCTCTTGTGCTCTTGCT
Sox 9	F: CCCTTCAACCTCCCACTAC; R: GCTGTGTGTAGACGGGTGTGTT
Collagen 2A1	F: CAAGTCCCTCAACAACCAG; R: TATCCAGTAGTCACCGCTC
Aggrecan	F: CTGGACAAGTGCTATGCCG; R: GAAGGAACCGCTGAAATGC
Collagen 10A1	F: ACCATCTCCAGGAAGTCCCA; R: GCAAGCCTGGTTTCCCAAAG

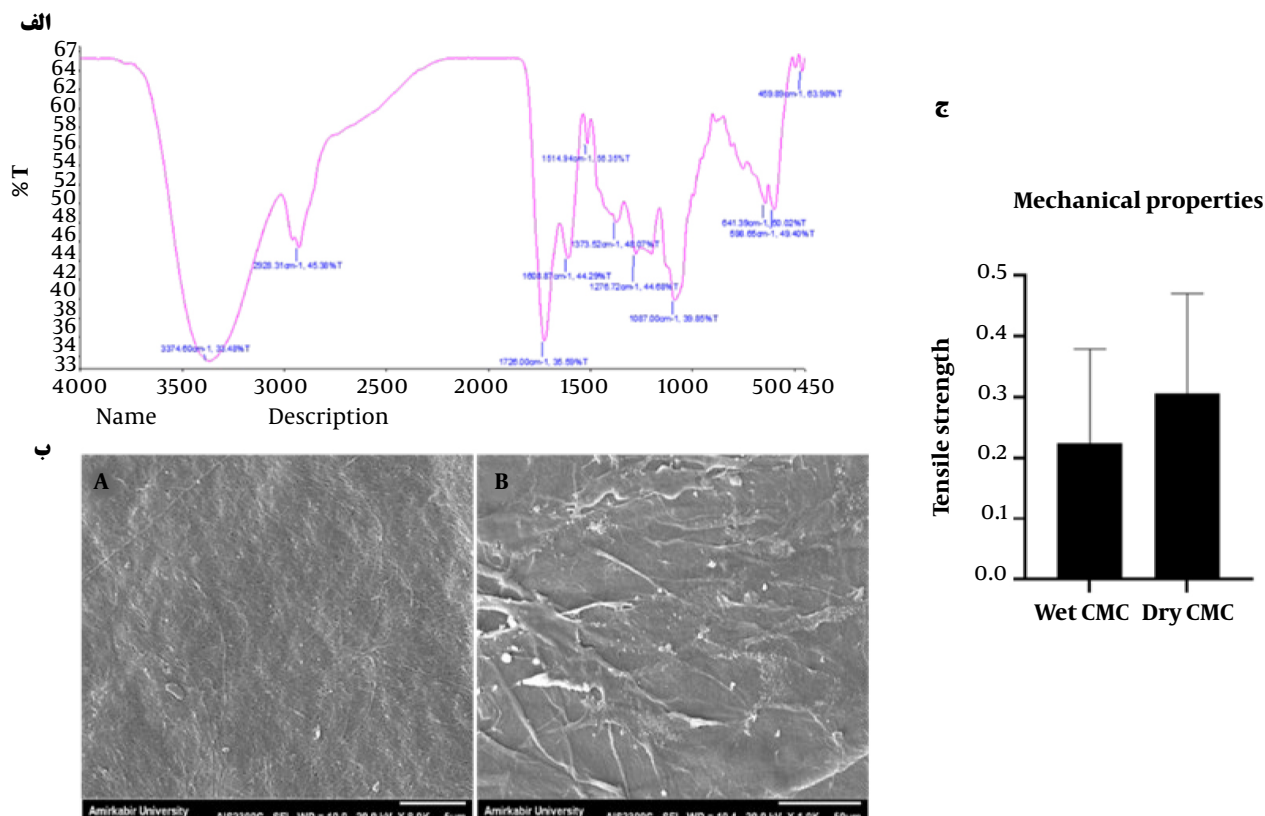
۱.۱.۳. FTIR

طیف FTIR در بازه ۴۰۰۰-۱۰۰۰ سانتی‌متر^{-۱} ثبت شد. این طیف‌ها نشانگر ارتعاشات مشخصی در ۱۷۲۶ سانتی‌متر^{-۱} بودند که به کشش کاربونیل (C=O) مربوط می‌شود. به‌علاوه، ارتعاشات در ۱۳۷۶ سانتی‌متر^{-۱} و ۱۴۳۰ سانتی‌متر^{-۱} مشاهده شد که به انحراف متقارن و غیرمتقارن متیل (C-CH₃) مربوط می‌شود. ارتعاشی در ۲۹۲۸ سانتی‌متر^{-۱} نیز وجود داشت که به کشش C-H مربوط می‌شود. این پیک‌ها در طیف سلولز حضور نداشتند و به‌جای آن، یک باند جذب گسترده در ۳۳۷۴ سانتی‌متر^{-۱} که به‌حالت‌های ارتعاشی گروه O-H مربوط می‌شود، مشاهده شد. این مشاهده نشان می‌دهد که گروه‌های هیدروکسیل در سلولز بازسازی شده به‌طور بیشتری وجود دارند (تصویر ۱-الف).

داده‌ها به‌صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین بیان شدند. تفاوت بین گروه‌ها ($n = 3$) با استفاده از آزمون نان-پارامتریک، آزمون Mann-Whitney بررسی شدند. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ به‌عنوان معنی‌دار از نظر آماری در نظر گرفته شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۸ تحلیل شدند.

۳. نتایج

۱.۳. شناسایی ساختار غشای کربوکسی‌متیل سلولز بافته نشده



تصویر ۱. شناسایی ساختار غشای کربوکسی متیل سلولز بافته نشده. طیف‌های FTIR حضور گروه‌های کربونیل، متیل و هیدروکسیل در سلولز کربوکسی متیل شده را نشان می‌دهد (الف)؛ تصاویر SEM سطح ساختار را نشان داد که سلول‌ها قادر به چسبیدن به ساختار سازه بودند (تصویر ۱-ب). پس از گذشت سه هفته از تیمار سلول‌ها با محیط کشت غضروفی، نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد عکسبرداری قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تغییری در مورفولوژی سلول‌ها به سمت سلول‌های غضروفی یا تشکیل لاکونا مشاهده نشد (ضمیمه ۱).

۲.۱.۳. میکروسکوپ الکترونی روبشی

تصاویر حاصل شده از غشای بافته نشده کربوکسی متیل سلولز نشان داد که سلول‌ها قادر به چسبیدن به ساختار سازه بودند (تصویر ۱-ب). پس از گذشت سه هفته از تیمار سلول‌ها با محیط کشت غضروفی، نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد عکسبرداری قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تغییری در مورفولوژی سلول‌ها به سمت سلول‌های غضروفی یا تشکیل لاکونا مشاهده نشد (ضمیمه ۱).

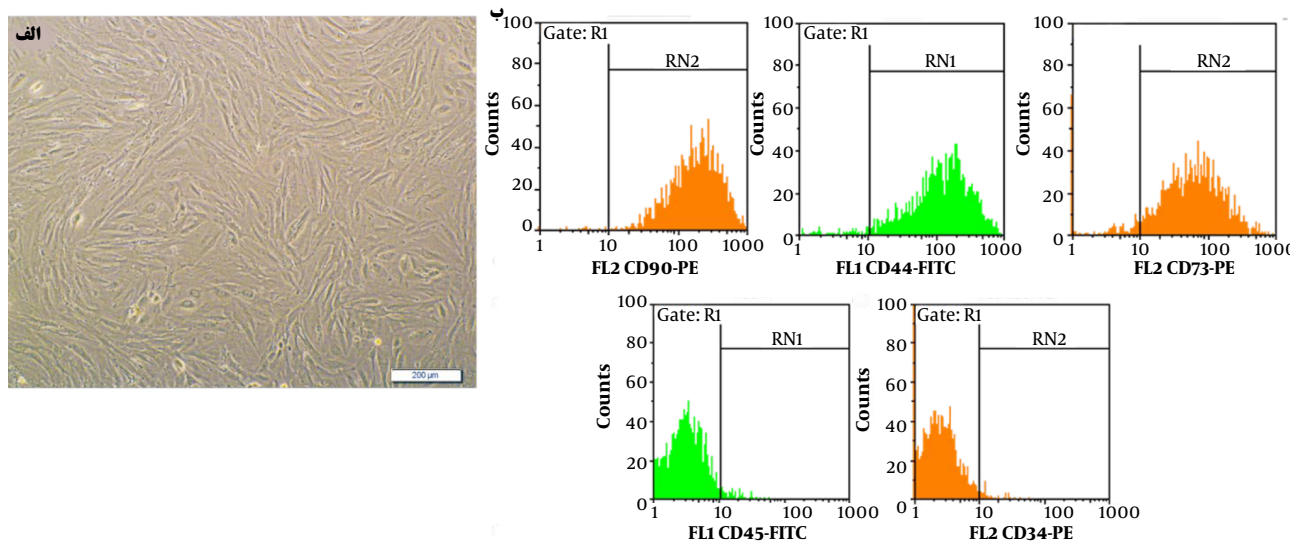
۳.۱.۳. تست مکانیکی

مقاومت کششی و مدول یانگ ساختارهای کربوکسی متیل سلولز به صورت خشک و مرطوب ارزیابی شد. نتایج نشان داد که ساختار کربوکسی متیل سلولز در حالت خشک میانگین مقاومت کششی 0.224 ± 0.155 مگاپاسکال

و در حالت مرطوب 0.306 ± 0.164 مگاپاسکال داشت. به طور مشابه، مدول یانگ به ترتیب برابر با 0.077 و 0.079 مگاپاسکال در حالت خشک و مرطوب بود. مشاهده شد که مقاومت کششی پس از مرطوب کردن ساختار افزایش یافت؛ با این حال، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (تصویر ۱-ج و ضمیمه ۲).

۲.۳. جداسازی و شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان در پاساژ سه دوکی شکل بوده و نشانگرهای هماتوپوئیتیک، به ویژه CD34 و CD45 را بیان نمی‌کردند؛ در حالی که نسبت به نشانگرهای مزانشیمال مانند CD70، CD90 و CD44 مثبت بودند (تصویر ۲).

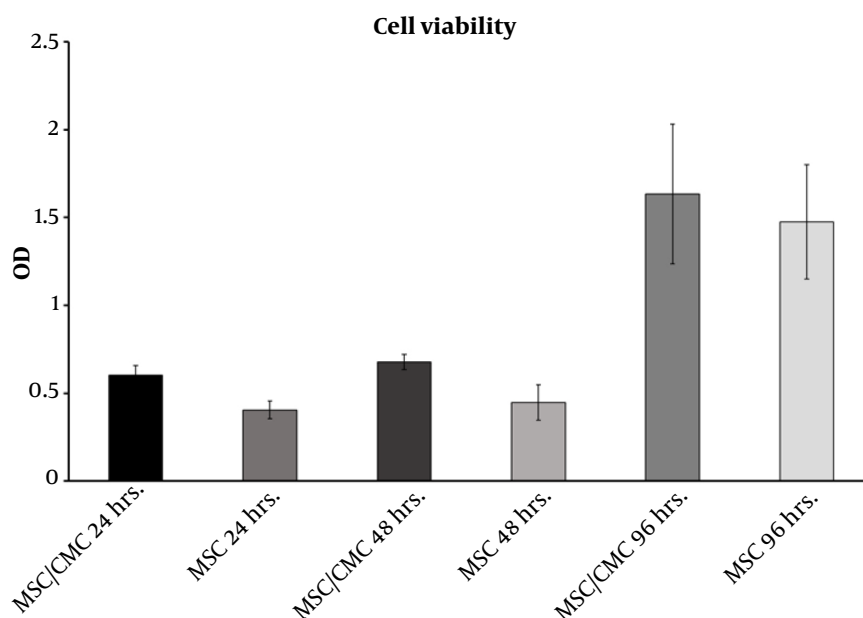


تصویر ۲. جداسازی و شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان. تصویر سلول‌های شبه فیبروبلاستی در پاساژ ۳ (الف)؛ بیان نشانگرهای هماتوپوئیتیک (CD34) و (CD45) در پاساژ ۳ (ب). این سلول‌ها قادر به بیان نشانگرهای مزانشیمی مانند CD73، CD90 و CD44 هستند.

۳.۳. ارزیابی زیستایی سلول‌های متصل به داربست

بافته‌نشده متصل شدند. علاوه بر این، هیچ تفاوت معنی‌داری در تعداد سلول‌ها نسبت به گروه کنترل که شامل سلول‌های مزانشیمی کشت‌داده‌شده در کف ظرف کشت بدون داربست بودند، مشاهده نشد (تصویر ۳).

براساس نتایج آزمون MTT، سلول‌های بنیادی مزانشیمال حاصل‌شده به‌خوبی به غشای کربوکسی‌متیل‌سلولز

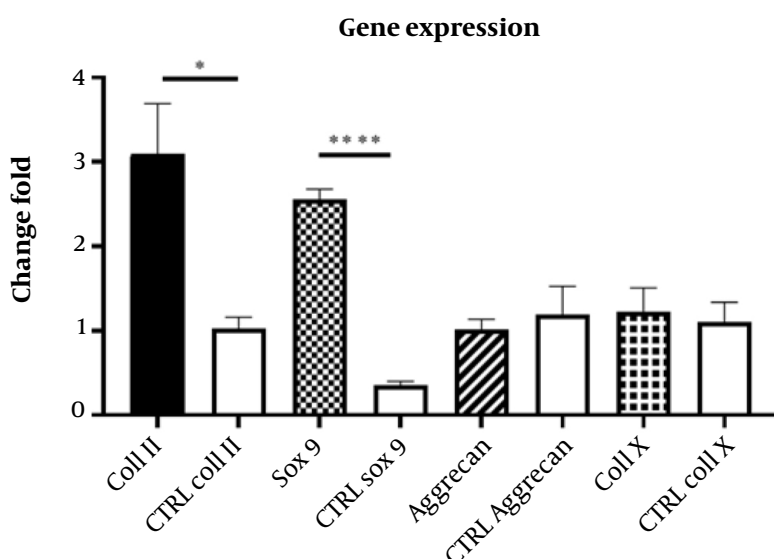


تصویر ۳. ارزیابی زیستایی سلول‌های متصل به داربست. نتایج آزمایش MTT ما نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان قادر به چسبیدن به غشای کربوکسی‌متیل‌سلولز بافته‌نشده بودند. تفاوت معنی‌داری در تعداد سلول‌ها نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد.

۴.۳. بیان ژن

و کلاژن II را نسبت به گروه کنترل (همان سلول‌ها روی داربست بدون القای محیط تمایزی) نشان داد ($P \leq 0.05$) (تصویر ۴). با این حال، تفاوت معنی‌داری در بیان کلاژن X و آگرکان بین دو گروه تیمار و کنترل مشاهده نشد.

تجزیه و تحلیل بیان ژن نشان داد که گروه سلول‌های کشت‌داده‌شده روی داربست که با محیط کشت غضروف تیمار شده بودند، افزایش بیان Sox-9 ($P < 0.0001 = ****$)



تصویر ۴. ارزیابی کمی بیان ژن‌های مرتبط با تمایز به غضروف. افزایش قابل توجه بیان ژن Sox-9 و Coll II در سلول‌های کشت‌شده روی غشای کربوکسی‌متیل سلولز بافته‌نشده در مقایسه با گروه کنترل مقایسه شد ($P \geq 0.05$ ، $P < 0.001$ = ****). تفاوت معنی‌داری در بیان Coll X (10A1) و aggrecan بین دو گروه مشاهده نشد. بیان همان ژن در سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان تیمارنشده با محیط غضروف به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد.

۴. بحث

به‌طور معمول در روش سه‌بعدی میکروممس در حین تمایز به غضروف تشکیل می‌شود، مشاهده نشد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان در حین تمایز به غضروف در سیستم کشت دوبعدی روی کربوکسی‌متیل سلولز بافته‌نشده محدودیت‌هایی در تکمیل تمایز خود روبه‌رو است. در واقع، تعداد محدودی از مطالعات به استفاده از کربوکسی‌متیل سلولز در مهندسی بافت غضروف، به‌عنوان یک ماده مستقل و همچنین در ترکیب با سایر مواد، تمرکز کرده‌اند (۴).

همچنین ما توانستیم بیان Sox9 را که ژن ابتدایی تمایز غضروفی به حساب می‌آید را شناسایی کنیم. Sox9 نقش حیاتی در فعال‌سازی تقویت‌کننده ژن کلاژن pro alpha1 (II) مخصوص کندروسیت دارد (۲۸، ۲۹). این ژن در فرآیند تمایز کندروسیت فعال است و در کندروسیت‌های موجود در غضروف مفصل سالم به‌طور مداوم بیان می‌شود. شناسایی بیان Sox9 نشان می‌دهد که سیستم آزمایشی ما القای تمایز کندروژنیک و شکل‌گیری ابتدایی بافتی شبیه به غضروف را حمایت می‌کند. در واقع، Sox9 نقش بسیار حیاتی در کندروژنز، القای تمایز به سلول غضروفی، بقای سلولی و فعال‌سازی ژن‌های مسئول ساختاری و تنظیمی خاص غضروفی دارد. مطالعه ما همچنین نشان داد که در حضور محیط کندروژنیک بیان ژن کلاژن II (Coll II) افزایش می‌یابد. کلاژن II خود یک مؤلفه مهم از ماتریکس غضروف است و همراه با سایر پروتئین‌ها و پروتئوگلیکان‌ها، ساختارهای خارج‌سلولی پیچیده‌ای را تشکیل می‌دهد که به حمل نیروهای مکانیکی، حفظ هومئوستاز

هدف تحقیق ما، بررسی پتانسیل تمایزی سلول‌های بنیادی بنیادی مزانشیمی انسان (hBM-MSCs) کشت‌داده‌شده روی غشای کربوکسی‌متیل سلولز بافته‌نشده در یک سیستم کشت دوبعدی بود. در این مطالعه مشاهده شد که سلول‌های hBM-MSCs به‌خوبی بر سطح کربوکسی‌متیل سلولز بافته‌نشده اتصال یافت. در مطالعه حاضر، بررسی تنش کششی و مدول یانگ غشاهای کربوکسی‌متیل سلولزی بافته‌نشده در حالت‌های خشک و مرطوب نشان داد که تفاوت کمی در مدول کوتاه بین حالت خشک و مرطوب کربوکسی‌متیل سلولز ما وجود داشت، زیرا آب می‌تواند مواد را نرم کند و سفتی و مدول الاستیک آن را کاهش دهد. به‌علاوه میزان غلظت کربوکسی‌متیل سلولز و نیز کراس لینکر مورد استفاده نیز در این میان نقش دارد (۲۷). علاوه بر این، حضور مولکول‌های آب در شبکه پلیمری می‌تواند بر فعل و انفعالات زنجیره پلیمری و خواص مکانیکی کلی مواد تأثیر بگذارد. در ضمن تحلیل و توصیف دقیق تر غشاهای کربوکسی‌متیل سلولز در شرایط محیطی مختلف، می‌تواند بینش بیشتری درباره رفتار مکانیکی این ماده ارائه دهد. در این مطالعه بیان نشانگرهای ابتدایی تمایز به غضروف مانند Sox-9 و کلاژن II پس از تیمار با محیط غضروفی مشهود بود. با این حال، بررسی مورفولوژی سلول‌ها با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نشان داد که تغییراتی در شکل سلول‌ها به سمت فنوتیپ غضروفی مشاهده نمی‌گردد (ضمیمه ۱). به‌عنوان مثال تشکیل لاکونا که

ترکیبی از فشار و برش قرار گرفتند. بررسی هیستولوژیک نشان داد که حضور گلیکوزآمین گلیکان‌های سولفاته و کلاژن II فقط در نمونه‌های بارگذاری شده مشاهده شد که نشان می‌دهد تحریک بار برای بیان گلیکوزامینوگلیکان‌ها در هیدروژل‌های متیل سلولوزی در طول تمایز کندروژنیک MSC بسیار حائز اهمیت است (۳۷).

در مطالعه حاضر بیان مارکرهای غضروفی در سطح رونویسی مورد بررسی قرار گرفت که حاکی از بیان ژن‌های ابتدایی تمایز غضروفی بود؛ لذا بررسی بیان ژن‌های مذکور در سطح پروتئین با استفاده از ایمونوسیتوشیمی در جهت تکمیل بررسی روند بلوغ تمایزی سلول‌های بنیادی به سلول‌های شبه غضروفی، در حضور غشای کربوکسی متیل سلولوز دوبعدی و مقایسه آن با کشت سه‌بعدی حائز اهمیت است. از طرفی تمایز غضروفی فرآیندی است که در کنار عوامل شیمیایی و اثرات توپوگرافی (۳۸)، اعمال نیروهای مکانیکی مناسب نیز به شدت بر روند آن تأثیرگذار است.

۱.۴. نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان (hBM-MSCs) می‌توانند به‌خوبی به سطح غشای کربوکسی متیل سلولوز بافته‌نشده متصل شده و در حضور عوامل القایی کندروژن، ژن‌های مرتبط با تمایز ابتدایی غضروف مانند Sox-9 و Collagen II را بیان نماید. با این حال، تغییراتی در مورفولوژی سلول به سمت فنوتیپ غضروف و نیز بیان مارکرهای غضروفی بالغ اعم از آگرکان و کلاژن ۱۰ مشاهده نشد.

فایل ضمیمه:

فایل ضمیمه از طریق این لینک در دسترس است (برای دسترسی به این فایل می‌توانید به سایت مجله مراجعه کرده و لینک مقاله را در اینجا باز کنید).

تشکر و قدردانی

این مطالعه توسط دانشگاه علوم پزشکی ایران حمایت مالی شد (شماره گرنت: ۹۸۰۴-۲۰۱۶۷۹۳).

مشارکت نویسندگان:

ن.ا. و ف.س.: ایده مطالعه، جمع‌آوری داده‌ها، ف.ک.، ا.ک. و ا.ل.: آنالیز و تفسیر نتایج، ف.ف.: ایده و طراحی مطالعه، تفسیر نتایج و نگارش مقاله.

حمایت مالی/معنوی:

این مطالعه توسط دانشگاه علوم پزشکی ایران حمایت

فیزیولوژیکی و ارائه محل‌های اتصال برای کندروسیت‌ها، مولکول‌های ماتریس خارج سلولی و عوامل رشد کمک می‌کند (۳۰). گروه هیدروکسیل سلول‌ها می‌تواند از طریق پیوند هیدروژنی با گروه‌های کربوکسیل و هیدروکسیل کلاژن تعامل کند که این خود می‌تواند تشکیل فیبریل کلاژن در محیط آزمایشگاهی را تحت تأثیر قرار دهد. بنابراین، سلولز و مشتقات آن مانند سدیم کربوکسی متیل سلولز یا متیل سلولز می‌توانند به‌عنوان عامل نیمه جامد در تنظیمات کشت سلولی استفاده شوند (۳۱). هر چند بیان کلاژن II در مطالعه ما در سطح mRNA تشخیص داده شد، اما تغییرات در مورفولوژی سلولی در سلول‌های تیمار شده حضور کربوکسی متیل سلولز نسبت به کشت سه‌بعدی میکرومس که در مطالعات قبلی انجام داده بودیم (۲۴)، مشاهده نشد. علاوه بر این، عدم افزایش بیان کلاژن X و آگرکان در سلول‌های تیمار شده، نشان می‌دهد که سلول‌های کشت شده روی کربوکسی متیل سلولز قادر به بلوغ و تکمیل فرآیند تمایز کندروژنیک در شرایط دوبعدی موجود نبودند. مطالعات مشابهی بیان مارکرهای غضروفی در حضور کربوکسی متیل سلولز به‌خصوص در حالت هیدروژل را نشان می‌دهند (۳۲، ۳۳). بر خلاف مطالعه ما، در این مطالعات بیان مارکرهای بالغ غضروفی و تغییر مورفولوژی سلولی مشاهده می‌شود که می‌تواند به دلیل خاصیت سه‌بعدی محیط این سلول‌ها به واسطه کشت در محیط هیدروژلی باشد. بیان پروتئین‌های اختصاصی ماتریکس غضروفی به بلوغ سلول‌های کشت شده بستگی دارد؛ به‌طوری که مطالعات نشان داده‌اند که کشت غضروف مفصل انسان‌ها و حیوانات به‌همراه مشتقات کربوکسی متیل سلولز در ابعاد نانو، به‌خصوص در قالب هیدروژل سه‌بعدی منجر به بیان پروتئین‌های اختصاصی ماتریکس غضروف در محیط آزمایشگاهی می‌شود (۳۴). به‌عنوان مثال، بر اساس تحقیقات Cordeiro و همکاران، سازه‌های تولید شده با استفاده از متیل سلولز همراه با پلی کاپرولاکتون به نسبت دو و سه درصد ظرفیت بیشتری برای پیشرفت در تحقیقات مربوط به ترمیم غضروف دارند تا متیل سلولز به تنهایی. چنین سازه‌هایی از نظر بیولوژیکی شبیه به غضروف طبیعی بوده چسبندگی و انبساط سلول‌ها به‌خوبی در چنین هیدروژل‌هایی صورت می‌گیرد (۳۳) خصوصاً اینکه معمولاً رهایش یک عامل القایی شیمیایی در داخل هیدروژل خود به روند تکمیل تمایز کمک می‌کند (۳۵). از طرف دیگر در اکثر این مطالعات بر خلاف مطالعه حاضر، برای تشابه بیشتر ساختار محیط سلولی از نظر فیزیکی و مکانیکی، از کربوکسی متیل سلولز با دیگر مواد به‌صورت کامپوزیت استفاده شد که می‌تواند در تکمیل تمایز سلولی و بلوغ نهایی این سلول‌ها نقش داشته باشد (۳۶). به‌عنوان مثال در مطالعه انجام شده توسط Coshis و همکاران، کامپوزیت‌های پلی‌یورتان/متیل سلولز با hBM-MSCs تحت

References

مالی شد (شماره گزنت: ۱۶۷۹۳-۲۰-۴-۹۸).

بازیابی داده‌ها:

مجموعه داده ارائه شده در مطالعه به درخواست نویسنده مربوطه در حین ارسال یا پس از انتشار در دسترس است. داده‌ها به دلیل حفظ حریم خصوصی در دسترس عموم نیستند.

تضاد منافع:

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافع وجود ندارد.

1. Chuah YJ, Peck Y, Lau JE, Hee HT, Wang DA. Hydrogel based cartilaginous tissue regeneration: recent insights and technologies. *Biomater Sci.* 2017;**5**(4):613-31. [PubMed ID:28233881]. <https://doi.org/10.1039/c6bm00863a>.
2. Roy S, Rhim JW. Carboxymethyl cellulose-based antioxidant and antimicrobial active packaging film incorporated with curcumin and zinc oxide. *Int J Biol Macromol.* 2020;**148**:666-76. [PubMed ID:31978467]. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.204>.
3. Place ES, Evans ND, Stevens MM. Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nat Mater.* 2009;**8**(6):457-70. [PubMed ID:19458646]. <https://doi.org/10.1038/nmat2441>.
4. Balakrishnan B, Banerjee R. Biopolymer-based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Chem Rev.* 2011;**111**(8):4453-74. [PubMed ID:21417222]. <https://doi.org/10.1021/cr100123h>.
5. Rahman MS, Hasan MS, Nitai AS, Nam S, Karmakar AK, Ahsan MS, et al. Recent Developments of Carboxymethyl Cellulose. *Polymers (Basel).* 2021;**13**(8). [PubMed ID:33924089]. [PubMed Central ID:PMC8074295]. <https://doi.org/10.3390/polym13081345>.
6. Zennifer A, Senthilvelan P, Sethuraman S, Sundaramurthi D. Key advances of carboxymethyl cellulose in tissue engineering & 3D bioprinting applications. *Carbohydr Polym.* 2021;**256**:117561. [PubMed ID:33483063]. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117561>.
7. Rosilio V, Albrecht G, Baszkin A, Merle L. Surface properties of hydrophobically modified carboxymethylcellulose derivatives. Effect of salt and proteins. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces.* 2000;**19**(2):163-72. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(00\)00151-x](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(00)00151-x).
8. Ali M, Khan NR, Basit HM, Mahmood S. Physico-chemical based mechanistic insight into surfactant modulated sodium Carboxymethylcellulose film for skin tissue regeneration applications. *J Polymer Res.* 2019;**27**(1). <https://doi.org/10.1007/s10965-019-1987-y>.
9. Gregorova A, Saha N, Kitano T, Saha P. Hydrothermal effect and mechanical stress properties of carboxymethylcellulose based hydrogel food packaging. *Carbohydr Polym.* 2015;**117**:559-68. [PubMed ID:25498671]. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.009>.
10. Cadena-Velandia ZG, Montenegro-Alarcón JC, Marquín-Casas X, Mora-Huertas CE. Quercetin-loaded alginate microparticles: A contribution on the particle structure. *J Drug Delivery Sci Technol.* 2020;**56**. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101558>.
11. Arora A, Mahajan A, Katti DS. TGF-beta1 presenting enzymatically cross-linked injectable hydrogels for improved chondrogenesis. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2017;**159**:838-48. [PubMed ID:28888201]. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.08.035>.
12. Singh BN, Panda NN, Mund R, Pramanik K. Carboxymethyl cellulose enables silk fibroin nanofibrous scaffold with enhanced biomimetic potential for bone tissue engineering application. *Carbohydr Polym.* 2016;**151**:335-47. [PubMed ID:27474575]. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.088>.
13. Kulikowska A, Wasiak I, Ciach T. Carboxymethyl Cellulose Oxidation to Form Aldehyde Groups. *Challenges Mod Technol.* 2013;**4**.
14. Hedayati R, Aminianfar A, Darbani M, Dadbakhsh M, Ehsani F. [Efficacy of glucosamine compounds phonophoresis in knee osteoarthritis]. *Koomesh.* 2016;**18**(2):e151136. Persian.
15. Leone G, Delfini M, Di Cocco ME, Borioni A, Barbucci R. The applicability of an amidated polysaccharide hydrogel as a cartilage substitute: structural and rheological characterization. *Carbohydr Res.* 2008;**343**(2):317-27. [PubMed ID:18039540]. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.10.017>.
16. Solali S, Kaviani jebeli S, Soleimani M, Zonoubi Z. [Isolation and characterization of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue]. *Koomesh.* 2015;**16**(4):e151234. Persian.
17. Ogushi Y, Sakai S, Kawakami K. Hepatocytes exhibit constant metabolic activity on carboxymethylcellulose-based hydrogel with high phenolic hydroxy group content. *Biochem Engin J.* 2010;**51**(3):147-52. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.06.008>.
18. Sakai S, Ogushi Y, Kawakami K. Enzymatically cross-linked carboxymethylcellulose-tyramine conjugate hydrogel: cellular adhesiveness and feasibility for cell sheet technology. *Acta Biomater.* 2009;**5**(2):554-9. [PubMed ID:19010747]. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.10.010>.
19. Song X, Melro L, Padrão J, Ribeiro AI, Yu L, Zille A. 20 - Nonwoven materials and technologies for medical applications. In: Mondal MIH, editor. *Medical Textiles from Natural Resources*. Sawston, Cambridge: Woodhead Publishing; 2022. p. 605-61.
20. Wang Q, Du H, Zhang F, Zhang Y, Wu M, Yu G, et al. Flexible cellulose nanopaper with high wet tensile strength, high toughness and tunable ultraviolet blocking ability fabricated from tobacco stalk via a sustainable method. *J Materials Chem A.* 2018;**6**(27):13021-30. <https://doi.org/10.1039/C8TA01021A>.

- org/10.1039/c8ta01986j.
21. Pitpisutkul V, Prachayawarakorn J. Hydroxypropyl methylcellulose/carboxymethyl starch/zinc oxide porous nanocomposite films for wound dressing application. *Carbohydr Polym.* 2022;**298**:120082. [PubMed ID:36241320]. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120082>.
 22. Baghaei K, Hashemi SM, Tokhanbigli S, Asadi Rad A, Asadzadeh-Aghdaei H, Sharifian A, et al. Isolation, differentiation, and characterization of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2017;**10**(3):208-13. [PubMed ID:29118937]. [PubMed Central ID:PMC5660271].
 23. Bhat S, Viswanathan P, Chandanala S, Jyothi Prasanna S, Raviraja N. Expansion and characterization of bone marrow derived human mesenchymal stromal cells in serum-free conditions. *Sci Rep.* 2021;**11**:3403. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83088-1>.
 24. Gardner OF, Alini M, Stoddart MJ. Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Bone Marrow. *Methods Mol Biol.* 2015;**1340**:41-52. [PubMed ID:26445829]. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2938-2_3.
 25. Gabr MM, Zakaria MM, Refaie AF, Khater SM, Ashamallah SA, Ismail AM, et al. Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells into Insulin-Producing Cells: Evidence for Further Maturation In Vivo. *Biomed Res Int.* 2015;**2015**:575837. [PubMed ID:26064925]. [PubMed Central ID:PMC4443784]. <https://doi.org/10.1155/2015/575837>.
 26. Golizadeh M, Karimi A, Gandomi-Ravandi S, Vossoughi M, Khafaji M, Joghataei MT, et al. Evaluation of cellular attachment and proliferation on different surface charged functional cellulose electrospun nanofibers. *Carbohydr Polym.* 2019;**207**:796-805. [PubMed ID:30600068]. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.028>.
 27. Enoch K, Somasundaram AA. Rheological insights on Carboxymethyl cellulose hydrogels. *Int J Biol Macromol.* 2023;**253**(Pt 8):127481. [PubMed ID:37865366]. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127481>.
 28. Lefebvre V, Dvir-Ginzberg M. SOX9 and the many facets of its regulation in the chondrocyte lineage. *Connect Tissue Res.* 2017;**58**(1):2-14. [PubMed ID:27128146]. [PubMed Central ID:PMC5287363]. <https://doi.org/10.1080/03008207.2016.1183667>.
 29. Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrughe B. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro $\alpha 1(\text{II})$ collagen gene. *Mol Cell Biol.* 1997;**17**(4):2336-46. [PubMed ID:9121483]. [PubMed Central ID:PMC232082]. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.4.2336>.
 30. Aigner T, Stove J. Collagens—major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;**55**(12):1569-93. [PubMed ID:14623402]. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.009>.
 31. Dalir Abdolahinia E, Jafari B, Parvizpour S, Barar J, Nadri S, Omid Y. Role of cellulose family in fibril organization of collagen for forming 3D cancer spheroids: In vitro and in silico approach. *Bioimpacts.* 2021;**11**(2):111-7. [PubMed ID:33842281]. [PubMed Central ID:PMC8022235]. <https://doi.org/10.34172/bi.2021.18>.
 32. Lin L, Jiang S, Yang J, Qiu J, Jiao X, Yue X, et al. Application of 3D-bioprinted nanocellulose and cellulose derivative-based bio-inks in bone and cartilage tissue engineering. *Int J Bioprint.* 2023;**9**(1):637. [PubMed ID:36844245]. [PubMed Central ID:PMC9947488]. <https://doi.org/10.18063/ijb.v9i1.637>.
 33. Cordeiro R, Alvites RD, Sousa AC, Lopes B, Sousa P, Mauricio AC, et al. Cellulose-Based Scaffolds: A Comparative Study for Potential Application in Articular Cartilage. *Polymers (Basel).* 2023;**15**(3). [PubMed ID:36772083]. [PubMed Central ID:PMC9919712]. <https://doi.org/10.3390/polym15030781>.
 34. Szustak M, Gendaszewska-Darmach E. Nanocellulose-Based Scaffolds for Chondrogenic Differentiation and Expansion. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;**9**:736213. [PubMed ID:34485266]. [PubMed Central ID:PMC8415884]. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.736213>.
 35. Zhang Z, Lin S, Yan Y, You X, Ye H. Enhanced efficacy of transforming growth factor-beta1 loaded an injectable cross-linked thiolated chitosan and carboxymethyl cellulose-based hydrogels for cartilage tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2021;**32**(18):2402-22. [PubMed ID:34428384]. <https://doi.org/10.1080/09205063.2021.1971823>.
 36. Lee KW, Chung K, Nam DH, Jung M, Kim SH, Kim HG. Decellularized allogeneic cartilage paste with human costal cartilage and crosslinked hyaluronic acid-carboxymethyl cellulose carrier augments microfracture for improved articular cartilage repair. *Acta Biomater.* 2023;**172**:297-308. [PubMed ID:37813156]. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2023.10.008>.
 37. Cochis A, Grad S, Stoddart MJ, Fare S, Altomare L, Azzi-monti B, et al. Bioreactor mechanically guided 3D mesenchymal stem cell chondrogenesis using a biocompatible novel thermo-reversible methylcellulose-based hydrogel. *Sci Rep.* 2017;**7**:45018. [PubMed ID:28332587]. [PubMed Central ID:PMC5362895]. <https://doi.org/10.1038/srep45018>.
 38. Le BQ, Vasilevich A, Vermeulen S, Hulshof F, Stamatalis DF, van Blitterswijk CA, et al. Micro-Topographies Promote Late Chondrogenic Differentiation Markers in the ATDC5 Cell Line. *Tissue Eng Part A.* 2017;**23**(9-10):458-69. [PubMed ID:28152670]. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2016.0421>.

Research Article

Investigation on the Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Cultured on a Non-woven Carboxymethyl Cellulose Scaffold Into Chondrocyte-Like Cells

Negar Asadollahei ¹, Forough Azam Sayahpour ², Fariba Karimzadeh ³, Afzal Karimi ⁴, Abolfazl Lotfi ⁵, Faezeh Faghihi ^{3, 6, *}

¹Department of Developmental Biology, University of Science and Culture, Tehran, Iran

²Department of Surgery, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, USA

³Cellular and Molecular Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴Department of Tissue Engineering, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁵Agricultural College of Damavand, National University of Skill, Tehran, Iran

⁶Immunogenetics Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

*Corresponding author: Cellular and Molecular Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Email: faghihi.f@iums.ac.ir

Received 17/01/2024; Accepted 23/07/2024

Abstract

Background: Trauma can significantly impact cartilage tissue and human quality of life. Limited cartilage regeneration capability has led to medical interventions for tissue repair. Carboxymethyl cellulose (CMC) is an anionic cellulose with suitable price and mechanical properties. Carboxymethyl cellulose is used as a lubricant or in constructing hydrogel scaffolds for cell culture.

Objectives: Since cartilage cells differentiate from bone marrow-derived mesenchymal stem cells, this study aimed to investigate their chondrogenic differentiation potential on a non-woven CMC scaffold in a monolayer system.

Methods: Non-woven CMC was synthesized and evaluated using Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), and mechanical tests. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells were isolated and identified using flow cytometry. After chondrogenic differentiation induction, cell attachment and expression of chondrogenic-related genes were examined using dimethyl thiazolyl diphenyl tetrazolium (MTT) and Quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR).

Results: MTT assay showed that cells adhered well to the scaffold surface. There was no significant difference in cell viability between the control group (cells without scaffold) and the experimental group. The SEM images showed that the cells were successfully attached to the membrane. Fourier-transform infrared spectroscopy spectra showed the singes of carbonyl, methyl, and hydroxyl groups. The tensile strength was measured as 0.224 ± 0.155 and 0.306 ± 0.164 MPa in the scaffold's dry and wet forms, which was insignificant. Young's modulus was equal to 0.077 and 0.079 MPa in dry and wet conditions, respectively. After two weeks of differentiation culture, a significant increase in Sox9- and Collagen II expression was observed. No significant increase in the expression of Collagen X and Aggrecan was detected.

Conclusion: Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells successfully adhered to the non-woven CMC scaffold and could express early chondrogenic pathway genes in the presence of inducing factors. However, expression of more specific cartilage-related genes morphological changes toward a chondrogenic phenotype and lacuna formation were not observed.

Keywords: Carboxymethyl Cellulose, Cartilage, Human's, Mesenchymal Stem Cells