Summer (2023) 12(45): 57-66
DOI: 10.30473/eab.2023.68207.1913
Received: 12 Jun 2023 Accepted: 4 Nov 2023

Experimental Animal Biology Open Access

ORIGINAL ARTICLE

Investigating the Effect of Ascorbic Acid on the Viability of Mesenchymal Stem Cell Cultured on the Skeletal Muscle Decellularized Scaffold

Fatemeh Ghiyasvand[1], Somayeh Arabzadeh[2], Mahmood Talkhabi[1*]

[1]Department of Animal Sciences and Marine Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.
[2]Department of Biology, Faculty of Basic Science, Ale Taha Institute of Higher Education, Tehran, Iran.

Correspondence
Mahmood Talkhabi
Email: m_talkhabi@sbu.ac.ir

How to cite
Ghiyasvand, F., Arabzadeh, S., & Talkhabi, M. (2023). Investigating the Effect of Ascorbic Acid on the Viability of Mesenchymal Stem Cell Cultured on the Skeletal Muscle Decellularized Scaffold. *Experimental Animal Biology, 12*(45), 57-66.

ABSTRACT

Tissue engineering is an emerging field based on the three elements of cells, scaffolds, and bioactive molecules, and can be a useful method for treating muscle injuries. The aim of this study is to investigate the effect of ascorbic acid (AA) on the viability of bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) cultured on skeletal muscle decellularization scaffold. First, BM-MSCs were extracted from rat leg bone marrow and cultured in vitro. The identity of the cells was assessed using flow cytometry. The extracted rat skeletal muscle was decellularized using a 1% SDS solution. The decellularization process was investigated by Masson Trichrome, and Alcian blue and DAPI staining.BM-MSCs were cultured on decellularized scaffolds and treated with 1 mM AA for 2 days. Then, the survival and viability of the cells were evaluated using scanning electron microscope (SEM) and MTT methods, respectively.BM-MSCs had a spindle morphology, and the results of flow cytometry showed the expression of CD44 and CD90 and the lack of expression of CD45 and CD34 in more than 90% of the cells. The staining verified the preservation of collagen and glycosaminoglycans and the absence of DNA in the decellularized tissue. MTT results showed that AA significantly increases the viability of BM-MSCs ($P<0.05$). Also, the SEM results showed that the cells in the group treated with AA were more proliferated. In general, AA can improve the efficiency of muscle tissue engineering by increasing the viability of BM-MSCs.

KEYWORDS

Tissue engineering, Bone Marrow Mesenchymal stem cell, Skeletal muscle scaffold, Ascorbic acid.

© 2023, by the author(s). Published by Payame Noor University, Tehran, Iran.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

سال دوازدهم، شماره اول، پیاپی چهل و پنجم، تابستان ۱۴۰۲ (۶۶-۵۷)
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۱۳
DOI: 10.30473/eab.2023.68207.1913

نشریه علمی
زیست‌شناسی جانوری تجربی

«مقاله پژوهشی»

بررسی تاثیر آسکوربیک اسید بر زیستایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت شده بر روی داربست سلول‌زدایی‌شده عضله اسکلتی

فاطمه قیاسوند[۱]، سمیه عرب‌زاده[۲]، محمود تلخابی[۱*]

[۱]گروه علوم جانوری و زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.
[۲]گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، موسسه آموزش عالی غیرانتفاعی آل طه، تهران، ایران.

چکیده

مهندسی بافت رشته ای نوظهور است که بر سه عنصر سلول، داربست و مولکول های زیستی فعال استوار بوده و می‌تواند برای درمان آسیب های عضلانی مفید باشد. هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر آسکوربیک اسید (AA) بر زیستایی سلول‌های بنیادی مزانشیمیِ مغز استخوانِ (BM-MSCs) کشت شده بر روی داربستِ سلول زدایی شده عضله اسکلتی می‌باشد. ابتدا BM-MSC از مغز استخوان پای رت استخراج و کشت شده و هویت سلول‌ها با استفاده از فلوسایتومتری بررسی شد. همچنین عضله اسکلتی پای رت، استخراج گردیده و با استفاده از محلول ۱٪ SDS سلول زدایی انجام شد. برای اطمینان از سلول زدایی، رنگ آمیزی‌های اختصاصی ماسون تریکروم، آلسیان بلو و DAPI انجام شد. سپس BM-MSCs روی داربست های سلول زدایی شده کشت شدند و با AA یک میلی‌مولار به مدت ۲ روز تیمار شدند. سپس با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و روش MTT به ترتیب بقاء و میزان زیستایی سلول‌ها بررسی شد. BM-MSCs مورفولوژی دوکی داشته و نتایج فلوسایتومتری نشان دهنده بیان CD44 و CD90 و نیز عدم بیان CD45 و CD34 در بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها بود. رنگ آمیزی های اختصاصی حفظ کلاژن و گلیکوزآمینوگلیکان ها و عدم حضور DNA را در بافت سلول زدایی شده اثبات کردند. نتایج MTT نشان داد که AA به طور معنی داری باعث افزایش زیستایی BM-MSCs می‌شود (P<۰/۰۵). همچنین نتایج SEM نشان داد که سلول‌ها در گروه تیمار شده با AA، گسترش بیشتری داشتند. بطور کلی، AA می‌تواند با افزایش زیستایی BM-MSCs، بازده مهندسی بافت عضله را بهبود بخشد.

واژه‌های کلیدی

مهندسی بافت، سلول بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، داربست عضله اسکلتی،آسکوربیک اسید.

نویسنده مسئول:
محمود تلخابی
رایانامه: m_talkhabi@sbu.ac.ir

استناد به این مقاله:
قیاسوند، فاطمه، عرب‌زاده، سمیه و تلخابی، محمود (۱۴۰۲). بررسی تاثیر آسکوربیک اسید بر زیستایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت شده بر روی داربست سلول زدایی شده عضله اسکلتی. فصلنامه زیست‌شناسی جانوری تجربی, ۱۲(۴۵)، ۶۶-۵۷.

مقدمه

هر ساله با افزایش میانگین سنی جامعه و فعالیت های ورزشی و نیز تنوع بیمارانی که با آسیب‌های اسکلتی-عضلانی دست و پنجه نرم می‌کنند، هزینه های زیادی به جامعه تحمیل می‌شود و همچنین افراد زیادی از این موضوع رنج می‌برند. برای مثال، بیماری از دست دادن حجم عضلانی یاVML (Volumetric muscle loss) تنها یکی از انواع بیماری های عضلانی است که تعداد بیماران آن رو به افزایش است و می‌تواند ناشی از انواع آسیب ها یا بیماری ها، از جمله ضربه، آسیب های بعد از عمل، تخریب‌های حاصل از سرطان، نقایص مادرزادی و همچنین میوپاتی باشد (Cittadella Vigodarzere & Mantero, 2014). بسیاری از این بیماری‌های اسکلتی عضلانی صدمات جبران ناپذیری را برای زندگی شخصی و اجتماعی فرد داشته و هزینه های زیادی به دولت ها و بیمه‌ها تحمیل می‌کنند. روش‌های درمانی مختلفی تاکنون برای بهبود آسیب های عضلانی پیشنهاد شده و یا مورد استفاده قرار گرفته است. یک از این روش های امیدوار کننده و جدید، مهندسی بافت می‌باشد. مهندسی بافت یک علم بین رشته ای است و بر استفاده از سلول، داربست و فاکتورهای القایی استوار بوده و به عنوان یک رویکرد درمانی مناسب می‌تواند جهت تولید بافت های جدید و نیز بهبود بافت های آسیب دیده مورد استفاده قرار گیرد (VanDusen *et al*., 2014). در مهندسی بافت برای ماتریکس خارج سلولی جایگزینی به نام داربست طراحی می‌شود (Stevens & George, 2005). داربست ها دارای ساختار متخلخل مشابه ماتریکس خارج سلولی هستند و به عنوان چارچوب و پشتیبان برای سلول‌ها عمل می‌کنند تا سلول‌ها بتوانند به آنها متصل شوند و به رشد و تکثیر و تمایز بپردازند و در نهایت قادر به ترشح ماتریکس خارج سلولی شوند (Yarlagadda *et al*., 2005). انواع داربست های مختلفی از قبیل هیدروژل ها، ریزگویچه ها، ماتریکس‌های متخلخل سه بعدی، شبکه‌های نانولیفی و داربست مشتق از بافت سلول زدایی شده در مهندسی بافت مورد استفاده قرار می‌گیرد (Langer & Peppas, 2003). بافت های سلول زدایی شده، داربست های طبیعی مشتق شده از بافت ها یا اندام ها می‌باشند که محتویات سلولی و هسته های در آنها حذف شده اما ساختار و ترکیب سه بعدی ماتریکس خارج سلولی آنها تا حد زیادی حفظ شده است. این داربست ها کاندیدای امیدوارکننده ای برای استفاده بالینی در افراد مبتلا به بیماری VML می‌باشند (Urciuolo & De Coppi, 2018). این داربست ها از زنده ماندن سلول بنیادی، تکثیر، گسترش و نیز تمایز آنها در شرایط آزمایشگاهی پشتیبانی می‌کنند (Talaei-Khozani & Yaghoubi, 2022).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی نوعی سلول غیرخونساز ساکن در مغز استخوان و سایر بافت های اسکلتی بوده و جزو مهم ترین سلول‌های بنیادی بزرگسال توصیف می شوند که در ترمیم بافت‌هایی با منشاء مزودرمی شرکت می‌کنند (Khanban *et al*., 2019). سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی بر اساس تعریف انجمن بین المللی سلول درمانی دارای سه ویژگی می‌باشند: ۱- در شرایط کشت معمولی به صورت چسبنده رشد می‌کنند، ۲- مارکرهای سطحی CD105، CD73 و CD90 را بیان می‌کنند و مارکرهای سلول‌های خونساز از جمله CD45، CD34 و دیگر مارکرها از جمله CD14، CD116، CD79، CD19 و DR-HLA را بیان نمی‌کنند، ۳- توانایی تمایز به سلول‌های چربی، غضروف و استخوان را دارند (Hematti, 2011). علاوه بر تمایز به سلول‌هایی با منشاء مزودرمی، می‌توانند به سلول‌هایی با منشاء غیرمزودرمی مانند سلول‌های عصبی، قلبی و کبدی نیز تمایز یابند (Chen *et al*., 2023). سلول‌های بنیادی مزانشیمی با توجه به خصوصیات تمایز، خودنوزایی، ترشح سایتوکاین ها، توانایی اتصال به سلول‌های آسیب دیده و مهاجرت به محل جراحت، کاندیدای مناسبی برای ژن‌درمانی، سلول‌درمانی و همچنین مهندسی بافت عضله اسکلتی به حساب می‌آیند (Han *et al*., 2022; Raman *et al*., 2022).

آسکوربیک اسید، ویتامین محلول در آب است که به عنوان یک مکمل برای تقویت رژیم های غذایی درنظر گرفته می‌شود (Sam Daliri *et al*., 2023). آسکوربیک اسید با خاصیت آنتی‌اکسیدانی ریسک ابتلا به بیماری‌هایی از جمله سرطان و بیماری‌های قلبی را کاهش می‌دهد (Blake, 2008). آسکوربیک اسید بر تکثیر، تمایز و ترشح ماتریکس خارج سلولیِ سلول‌های بنیادی نیز نقش بسزایی دارد (Talkhabi *et al*., 2015). همچنین در مطالعه ای نشان داده شد که در حضور آسکوربیک اسید ترشح پروتئین‌های اختصاصی سلول‌های عضله صاف دو تا چهار برابر افزایش می‌یابد (Narita *et al*., 2008). آسکوربیک اسید نقش مهمی در فرایند های بیولوژیکی از جمله هموستازی بافت های نرمال و اندام ها و ترمیم بافت ها ایفا می‌کند. همچنین در تنظیم هموستازی ماتریکس خارج سلولی و کلاژن نقش دارد (Lindblad *et al*., 2013). بطورکلی آسکوربیک اسید دو عملکرد کوآنزیمی و غیرآنزیمی را دارا می‌باشد. آسکوربیک اسید در نقش کوآنزیمی خود عملکردهای زیادی دارد. به عنوان مثال به‌عنوان کوفاکتور ضروری برای تعدیل آهن (Fe^{2+}) و ۲-

اکسوگلوتارات (2-OG) عمل می کند. آسکوربیک اسید در نقش غیرآنزیمی، باعث احیا رادیکال های آزاد می‌شود و با به کارگیری خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی که دارد، باعث حذف گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر می‌شود (Savini *et al*., 2005).

تحقیقات مختلفی بر روی تاثیر آسکوربیک اسید بر تکثیر سلول‌های بنیادی صورت گرفته است که نشان‌دهنده‌ی تاثیر مثبت این ماده بر تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد. Xinu *et al*. (2018) طی مطالعه‌ای دریافتند که کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی روی داربست عضله اسکلتی سلول زدایی شده، اثرات هم افزایی را در بهبود بازسازی بافت ماهیچه های اسکلتی ایجاد می‌کنند (Qiu *et al*., 2018). Muhamed و همکاران در سال ۲۰۱۹، به دنبال محدودیت زنده مانی سلول بنیادی مزانشیمی در محل پیوند، پژوهشی انجام دادند که طی آن داربست های کروی متشکل از ژلاتین و عضله اسکلتی سلول زدایی شده را جهت چسبندگی و تحویل سلول‌های بنیادی مزانشیمی به محل آسیب VML، ساختند. این داربست ها از زنده ماندن سلول بنیادی، تکثیر، ترشح فاکتور تغذیه ای و تعدیل سیستم ایمنی در شرایط آزمایشگاهی پشتیبانی کردند (Talovic *et al*., 2019). تحقیقات Yongzhong *et al*. (2016) نشان داد که غلظت مناسب آسکوربیک اسید، باعث تقویت و حفظ توانایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در پاسخ به تحریک استخوانی شدن در اثر گسترش سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی می‌شود. در صورت استفاده از آسکوربیک اسید و TGF-ß1 علاوه بر بیان ژنهای خاص سلول‌های عضله صاف، پروتئین های اختصاصی سلول‌های عضله صاف دو تا چهار برابر افزایش می‌یابند (Wang *et al*., 2006). به دنبال انجام تحقیقات مختلفی برای یافتن راه حلی برای افزایش زیستایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی پیوندی در بافت هایی که دچار ایسکمی می‌شوند، Chia *et al*. (2015) دریافتند که استفاده از ترکیب N-acetylcysteine (NAC) و Ascorbic Acid-2-Phosphatase (AAP) برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی که تحت استرس اکسیداتیو ناشی از H_2O_2 بودند، تولید گونه های اکسیژن فعال را کاهش داده، پتانسیل غشای میتوکندری را تثبیت کرده، تخریب میتوکندری را کاهش داده و مانع از مرگ سلولی سلول‌های بنیادی مزانشیمی پیوندی شدند (Li *et al*., 2015). Lina *et al*. (2021) نقش آسکوربیک اسید و رتینوئیک اسید را بر تمایز استخوانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی پالپ دندان انسانی بررسی کردند که نتایج آنها مشخص کرد از نظر مورفولوژیکی، سلول‌های تیمار شده با آسکوربیک اسید و رتینوئیک اسید بزرگ‌تر و کشیده‌تر از سلول‌های کنترل بودند (Escobar *et al*., 2021). Yuki *et al*. (2022) طی پژوهشی ثابت کردند که تیمار طولانی مدت سلول‌های بنیادی مزانشیمی موشی با آسکوربیک اسید، به طور قابل توجهی کلسیفیکاسیون را افزایش می‌دهد و بیان فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGEF-D) را بالا می‌برد (Takaku *et al*., 2022).

هدف از این مطالعه بررسی اثر آسکوربیک اسید بر زیستایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت شده بر روی داربست عضله اسکلتی سلول زدایی شده می‌باشد.

مواد و روش ها

سلول زدایی بافت عضله اسکلتی

عضله اسکلتی ران و ساق پای رت جدا شده و بافت همبند و چربی از آن جدا شده و فریز گردید. سپس از آنها برش هایی به ضخامت یک میلیمتر و ابعاد یک در یک سانتیمتری تهیه شده و به مدت زمان ۳۰ دقیقه با PBS- و سپس با آب دو بار تقطیر شستشو داده شد (شکل 1.A). سپس به مدت ۷۲ ساعت در محلول 1% SDS (شرکت DNAbiotech) بر روی استیرر قرار داده شد. هر ۲۴ ساعت یکبار، تعویض محلول SDS صورت گرفت (Narciso *et al*., 2022).

ارزیابی های بافت شناسی

ابتدا نمونه های بافت عضلانی به مدت 48 ساعت در پارافرمالدئید، فیکس شده و سپس با آب مقطر شستشو داده شدند و توسط رقت های مختلف الکل آبگیری و در پارافین قالب گیری شدند. سپس برش های ۵ میکرومتری توسط میکروتوم تهیه گردید. در نهایت رنگ آمیزی ماسون تریکروم (MT)، دپی (DAPI) و آلسیان بلو (AB) انجام شده و نمونه ها با استفاده از میکروسکوب نوری مورد بررسی قرار گرفتند.

عکس‌برداری توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

ابتدا قطعه ای از بافت سلول زدایی شده را به مدت 48 ساعت درون گلوتارآلدئید فیکس کرده و سپس دو بار با PBS^- شستشو داده و در آخر در سری الکل ۲۰٪، ۳۰٪، ۴۰٪، ۵۰٪، ۹۰٪ و ۱۰۰٪ هر کدام به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد. در نهایت نمونه‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (برند ZEISS، آزمایشگاه مرکزی دانشگاه شهید بهشتی)، مورد بررسی قرار گرفت.

استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان رت

به منظور جداسازی استخوان پای رت (شامل ساق و ران)، رت‌ها ابتدا با کلروفرم بیهوش و سپس نخاعی شده و استخوان‌های پا جدا شده و عضلات و بافت‌های اضافی آنها پاک شدند. استخوان‌ها پس از شستشو با الکل ۷۰٪ درون ظرف محتوی PBS- قرار داده شده و به زیر هود منتقل شدند. سپس دو سر هر استخوان توسط قیچی مخصوص برش استخوان، قطع گردید و توسط سرنگی که محتوی محیط کامل (شامل محیط DMEM، ۱۵ درصد سرم جنینی گاوی، ۱ درصد پنی‌سیلین-استرپتومایسین) بود، مغز استخوان به درون فلاسک تخلیه شد و به آن محیط کامل اضافه شد و در انکوباتور (در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و سطح CO_2 ۵٪) نگهداری شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت، محیط سلول‌ها خارج شده و یکبار شستشو با PBS- انجام شد و محیط کامل تازه به سلول‌ها اضافه شد.

بررسی مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از فلوسایتومتری

به منظور بررسی مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، از سلول‌ها در پاساژ سوم استفاده گردید. زمانی که تراکم سلولهای ظرف کشت به ۷۰-۸۰ درصد رسید، محیط رویی سلول‌ها خارج شده و یک بار شستشو توسط PBS^- انجام شد. سپس، با استفاده از آنزیم تریپسین (شرکت Bioidea) از کف ظرف کنده شده و سلول‌ها برای بررسی مارکرهای سطحی CD44، CD45، CD34 و CD90 به آزمایشگاه بافت آزما (ایران-تهران) منتقل شدند.

تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی با آسکوربیک اسید

بافت های سلول زدایی شده یا همان داربست ها به پلیت شش چاهکی منتقل شدند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی در پاساژ سوم بر روی این بافت های سلول زدایی شده کشت داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت از کشت، سلول‌ها با استفاده از آسکوربیک اسید 1 میلی مولار به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند (Sam Daliri *et al.*, 2023). گروه کنترل، آسکوربیک اسید دریافت نکرد.

ارزیابی زیستایی با استفاده از تست MTT

به منظور بررسی زیستایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با آسکوربیک اسید، به هر چاهک از پلیت شش چاهکی ۱۵۰ میکرولیتر محلول MTT (شرکت Sigma-Aldrich) اضافه شد (غلظت نهایی MTT، نیم میلی گرم در میلی لیتر محیط کشت بود). سپس سلولها به مدت ۲ تا ۳ ساعت درون انکوباتور قرار داده شدند. در ادامه محیط رویی سلولها خارج شده و به هر چاهک ۱ میلی‌لیتر DMSO اضافه گردید و پس از حل شدن بلور های فورمازان و مشاهده تغییر رنگ، جذب آنها توسط دستگاه الایزاریدر (BioTek® 800™ TS) در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. برای بررسی زیستایی از فرمول زیر استفاده شد.

$$\text{میزان زیستایی} = \frac{\text{جذب گروه تست}}{\text{جذب گروه کنترل}} \times 100$$

آنالیز آماری

در این مطالعه از شاخص های میانگین و انحراف معیار برای نشان دادن توزیع داده ها و جمع بندی آن ها استفاده شد. به منظور بررسی تغییرات معناداری هر یک از متغیرهای مورد مطالعه از T-test استفاده شد. همچنین سطح معناداری برای محاسبات $P<۰.۰۵$ در نظر گرفته شد. جهت رسم نمودار زیستایی، از نرم‌افزار GraphPad prism 9 استفاده شد.

نتایج

تایید بافت سلول زدایی شده عضله اسکلتی

رنگ آمیزی DAPI عدم وجود ماده ژنتیکی و هسته های سلولی در بافت سلول زدایی شده را نشان داد (شکل1.B، چپ). نتایج به دست آمده از رنگ آمیزی MT، نشان دهنده وجود کلاژن در ماده زمینه‌ای خارج سلولی هم در بافت طبیعی و هم در بافت سلول زدایی شده است (شکل 1.B، وسط) نتایج حاصل از رنگ آمیزی AB نیز نشانگر وجود گلیکوزآمینوگلیکان ها هم در بافت طبیعی و هم در بافت سلول زدایی شده است که این به معنای حفظ پلیمرهای ماده زمینه خارج سلولی عضله اسکلتی است (شکل1.B، راست).

تایید هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از مغز استخوان

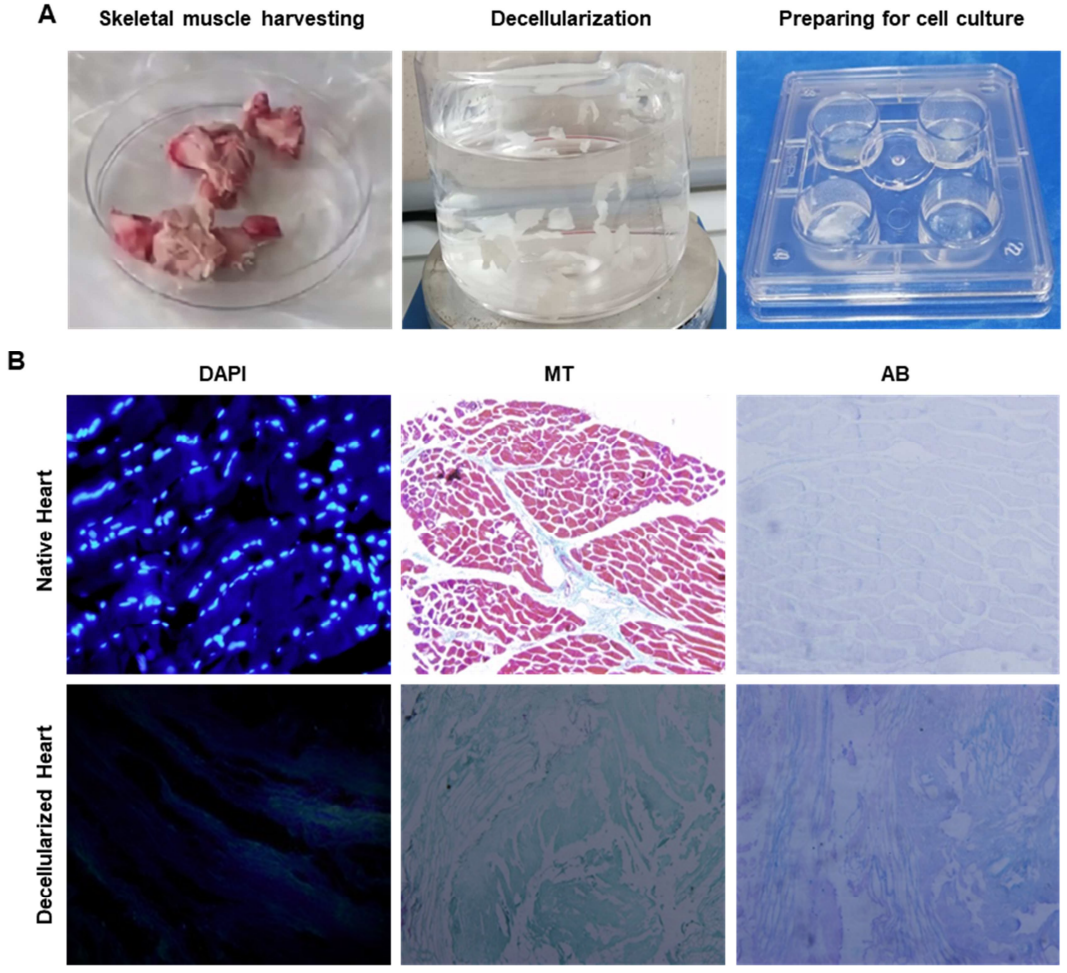
سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از مغز استخوان ساق پای رت، در محیط کشت کامل، کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت جهت حذف سلول‌های خونی و سلول‌های مرده و آزاد در محیط کشت، سلول‌ها مورد شستشو قرار گرفتند. سلول‌هایی که به کف ظرف چسبیده بودند شروع به تکثیر کردند. این سلول‌ها مورفولوژی کشیده و دوکی شکل داشته و زمانی‌که ۸۰-۷۰ درصد کف ظرف کشت را اشغال کردند، پاساژ داده شدند. در تمام فرایند آزمایش

سلول‌ها به صورت چسبنده تکثیر شده و مورفولوژی فیبروبلاستی یا دوکی شکل داشتند که نشانگر ماهیت مزانشیمی سلول‌های مورد مطالعه می‌باشد (شکل 2.A).

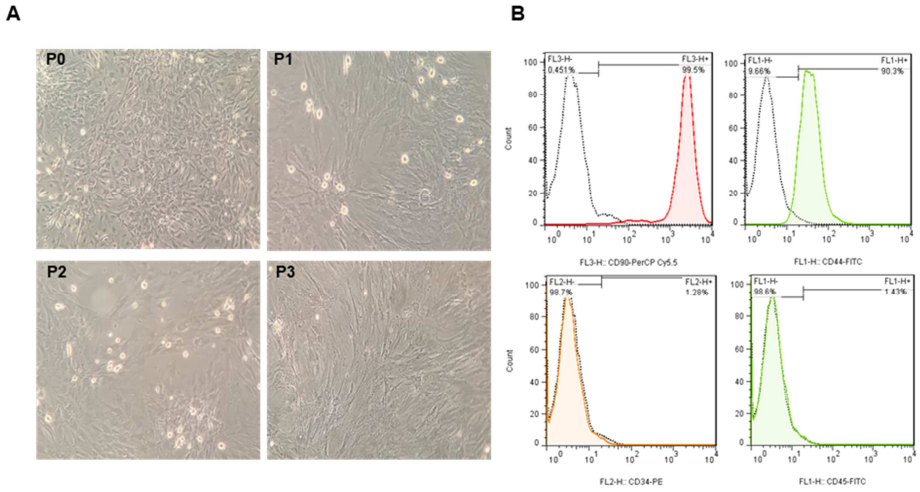
یکی از ویژگی های سلول‌های بنیادی مزانشیمی بیان و عدم بیان یک سری از مارکرهای سطحی می‌باشد. بدین منظور میزان بیان مارکرهای سطحی سلول‌ها در پاساژ سوم با استفاده از روش فلوسایتومتری بررسی شد. نتایج نشان داد که ۳۹۰/۳ درصد سلول‌ها مارکر سطحی CD44 و ۹۹/۵ درصد سلول‌ها مارکر سطحی CD90 را بیان کردند (شکل 2.B). درحالی که تنها ۱/۴۳ درصد سلول‌ها مارکر سطحی CD45 و ۱/۲۸ درصد سلول‌ها مارکر سطحی CD34 را بیان کردند (شکل2.B).

تاثیر آسکوربیک اسید و داربست عضله سلول زدایی شده بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی

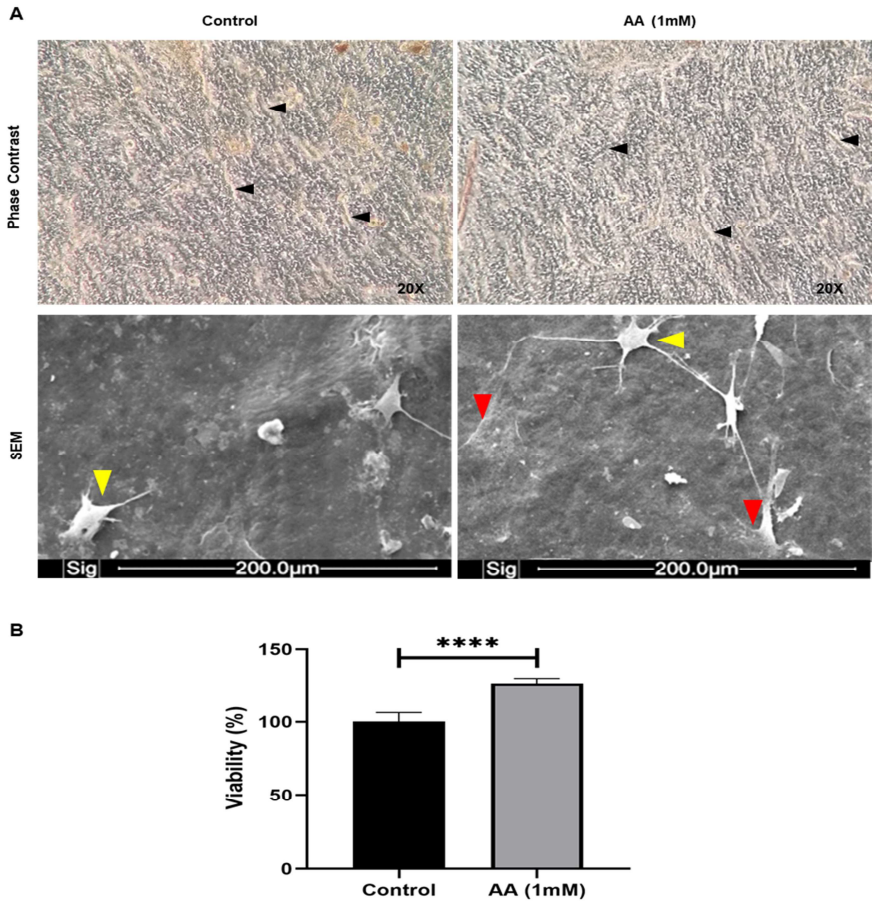
تصاویر میکروسکوپ نوری و الکترونی، نشان داد سلول‌ها در گروه تیمار شده با آسکوربیک اسید و گروه کنترل توانسته اند به داربست متصل شوند و مورفولوژی فیبروبلاستی کسب کنند (شکل 3.A). در گروه تیمار با آسکوربیک اسید، تعداد سلول‌های متصل شده به داربست بیشتر بوده و سلول‌ها بسیار پهن و کشیده بودند، درحالی که در گروه کنترل سلول‌های کمتری به داربست چسبیده بودند و اکثرا اتصال خوبی با درابست برقرار نکرده بودند (شکل3.A). نتایج حاصل از تست MTT نشان داد که میزان زیستایی در گروه تیمار شده با آسکوربیک اسید، به طور معنی‌داری ($P<۰/۰۰۰۱$) بیشتر از گروه کنترل است (شکل3.B).



شکل ۱. نتایج حاصل از رنگ آمیزی ها. A. مراحل سلول زدایی عضله اسکلتی B. رنگ آمیزی‌های بافتی عضله اسکلتی طبیعی و سلول زدایی شده. مقایسه رنگ آمیزی DAPI بافت طبیعی و سلول زدایی شده، نشان دهنده از بین رفتن هسته سلول‌ها در طی روند سلول زدایی است. رنگ آمیزی MT و AB به ترتیب، باقی ماندن کلاژن و گلیکوزآمینوگلیکان بعد از سلول زدایی را نشان می‌دهد (بزرگنمایی ۲۰X).



شکل ۲. نتایج حاصل از میکروسکوپ نوری و فلوسایتومتری A. تصاویر میکروسکوپ نوری از سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت شده، بلافاصله پس از استخراج در مرحله کشت اولیه (P0)، پاساژ اول(P1) ، پاساژ دوم(P2) و پاساژ سوم (P3). B. میزان بیان مارکرهای سطحی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی در پاساژ سوم برای مارکرهای سطحی CD44، CD90، CD45 و CD34.



شکل ۳. نتایج حاصل از میکروسکوپ نوری، میکروسکوپ الکترونی روبشی و تست MTT. A بالا. تصاویر میکروسکوپ نوری از سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت شده بر روی داربست (بزرگنمایی 20x). نشانگرهای سیاه در تصویر موقعیت سلول‌هایی می‌باشند که به داربست متصل شده و مورفولوژی دوکی شکل پیدا کرده‌اند. A پایین. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی. نشانگرهای قرمز نشان دهنده سلول‌هایی هستند که بصورت کامل به داربست متصل شده و پهن شده اند. نشانگرهای زرد اشاره به سلول‌هایی دارند که به صورت کامل به داربست متصل نشده و پهن نشده اند. B. نمودار نتایج تست MTT که نشانگر افزایش معنادار زیستایی سلول‌ها در حضور آسکوربیک اسید نسبت به گروه کنترل می‌باشد (P<۰/۰۰۰۱).

بحث و نتیجه‌گیری

سالیانه میلیون‌ها نفر از آسیب عضلانی، در اثر آسیب‌های ورزشی، جراحی و حوادث ناگوار مانند رانندگی، رنج می‌برند. بافت عضلانی توانایی بالایی در ترمیم و بازسازی خود دارد، اما اگر بیش از ۲۰ درصد از بافت عضله از بین رود، می‌تواند منجر به نقص بزرگی شود. این اتفاق در اثر برخی از بیماری های ارثی و اکتسابی ایجاد می‌شود (Cittadella Vigodarzere & Mantero, 2014; Gilbert-Honick *et al*., 2018). روش های درمانی مربوط به این آسیب ها بسیار محدود می‌باشند درحالی که هیچ یک قادر به بازگردانی کامل عملکرد و ظاهر بافت نیستند (Jiwlawat *et al*., 2018). درمان فعلی آسیب عضلانی، خارج کردن بافت آسیب دیده از بدن و جایگزینی بافت اتولوگ همراه با اعصاب و رگ ها از نزدیک محل آسیب است (Qazi *et al*., 2019). حتی این روش هم معایب و مشکلاتی مانند کمبود بافت، رد پیوند و پاسخ ایمنی بدن، معایب ظاهری، هزینه بالای عمل و طولانی بودن زمان بستری دارد (Nakamura *et al*., 2015). مهندسی بافت با روش سلول درمانی رویکرد های امیدوار کننده‌ای را در اختیار پزشکان قرار داده است. از جمله مهم‌ترین سلول‌هایی که در این زمینه مورد استفاده قرار می‌گیرد، سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشند که توانایی تمایز به سلول عضلانی را دارند. در مهندسی بافت، از یک ماده متخلخل به عنوان بستر یا ماده زمینه ای خارج سلولی برای اتصال، رشد و تکثیر سلول‌ها استفاده می‌شود که به آن داربست می‌گویند. داربست های مختلفی مورد استفاده قرار می‌گیرند که هر یک از آنها مزایا و معایب خاص خود را دارند. در مهندسی بافت تلاش بر این است که داربست از نظر ساختاری و فاکتورها، شبیه به بافت طبیعی باشد. بدین منظور بافت سلول زدایی شده می‌تواند گزینه مناسبی باشد. از این نظر که از بدن شخص گرفته می‌شود و ترکیبات آن نزدیک به بافت طبیعی می‌باشد و از این رو می‌تواند به حفظ بقا و عملکرد سلول‌ها و تمایز آنها کمک کند. اما یکی از معضلاتی که در این زمینه در مهندسی بافت وجود دارد، بقا و زیستایی کم سلول‌ها بر روی داربست می‌باشد. این موضوع در زمینه درمانی بسیار حائز اهمیت است. در این مطالعه برای افزایش بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر روی داربست، از آسکوربیک اسید استفاده شد و تاثیر آن مورد بررسی قرار گرفت. بررسی ما نشان داد که روش سلول‌زدایی استفاده شده، باعث حفظ فراساختار بافتی می‌شود، به این صورت که هسته ها حذف شدند درحالی که پروتئین‌های ماتریکس سلولی حفظ شدند. سلول‌های استخراج شده، توسط فلوسایتومتری و میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند و ماهیت مزانشیمی آنها مشخص شد. نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که آسکوربیک اسید با غلظت ۱ میلی‌مولار می‌تواند باعث افزایش بقا و بهبود تکثیر سلول‌ها شود.

Kyung و همکاران، اثرات آسکوربیک اسید بر تکثیر، تمایز و ترشح ماده زمینه ای خارج سلولی را مورد بررسی قرار دادند و نتایج آنها نشان داد که میزان این اعمال به غلظت آسکوربیک اسید بستگی دارد (Choi *et al*., 2008). نتایج حاصل از این پژوهش نیز در همین راستا بود، با این تفاوت که در پژوهش Kyung سلول‌ها به مدت دو هفته و توسط L-ascorbatr-2-phosphate تیمار شدند ولی در این پژوهش سلول‌ها به مدت دو روز توسط آسکوربیک اسید ۱ میلی‌مولار تیمار شدند. همچنین Koichi و همکاران نیز طی پژوهشی تاثیر مثبت آسکوربیک اسید را بر تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی نشان دادند (Fujisawa *et al*., 2018). در مطالعه ای که توسط Komang و همکاران انجام گرفت، نشان داده شد که سلول‌هایی که مکمل آسکوربیک اسید را دریافت کرده بودند تا ۲۴۰ ساعت تکثیر را ادامه دادند. درحالی که سلول‌هایی که در محیط فاقد آسکوربیک اسید قرار داشتند تا ۹۶ ساعت به کف ظرف متصل شدند (Wahyuningsih *et al*., 2020). به طور کلی نتایج آنها نشان داد که آسکوربیک اسید، تقسیم سلولی را افزایش داده و فرایند پیری را سرکوب کرده است. نتایج این پژوهش نیز در راستای پژوهش ما می‌باشد با این تفاوت که در این پژوهش سلول‌های بنیادی از بافت چربی استخراج شدند و روی داربست برده نشده بودند. همچنین در این آزمایش سلول‌ها با ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر آسکوربیک اسید تیمار شدند. مطالعه ما نشان داد که آسکوربیک اسید باعث افزایش بقاء و زیستایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر روی داربست عضله اسکلتی سلول‌زدایی شده می‌گردد و می‌تواند به عنوان یک رویکرد در مهندسی بافت عضله مورد استفاده قرار گیرد و باعث بهبود عملکرد ترمیم بافت عضله شود. هرچند در این مطالعه اثر مثبت آسکوربیک اسید بر روی زیستایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر روی داربست اثبات گردید، اما با این حال تایید این موضوع نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد. در این مطالعه تنها دو مورد ارزیابی برای اثبات تاثیر آسکوربیک اسید بررسی شد و برای اطمینان از عملکرد آسکوربیک اسید می‌بایست ارزیابی‌های دیگری نیز انجام شود.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافعی توسط نویسندگان وجود ندارد.

REFERENCES

Blake, S. (2008). Vitamin C: The Citrus Antioxidant. *Vitamins and Minerals Demystified*, 55-71.

Chen, Z., Jin, M., He, H., Dong, J., Li, J., Nie, J., ... Wu, F. (2023). Mesenchymal stem cells and macrophages and their interactions in tendon-bone healing. *Journal of Orthopaedic Translation, 39*, 63-73.

Choi, K.-M., Seo, Y.-K., Yoon, H.-H., Song, K.-Y., Kwon, S.-Y., Lee, H.-S., & Park, J.-K. (2008). Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *Journal of bioscience and bioengineering, 105*(6), 586-594.

Cittadella Vigodarzere, G., & Mantero, S. (2014). Skeletal muscle tissue engineering: strategies for volumetric constructs. *Frontiers in physiology, 5*, 362.

Escobar, L. M., Escobar, J. D., Bendahan, Z., & Castellanos, J. E. (2021). Retinoic and ascorbic acids induce osteoblast differentiation from human dental pulp mesenchymal stem cells. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research, 11*(2), 143-148.

Fujisawa, K., Hara, K., Takami, T., Okada, S., Matsumoto, T., Yamamoto, N., & Sakaida, I. (2018). Evaluation of the effects of ascorbic acid on metabolism of human mesenchymal stem cells. *Stem cell research & therapy, 9*(1), 1-12.

Gilbert-Honick, J., Ginn, B., Zhang, Y., Salehi, S., Wagner, K. R., Mao, H.-Q., & Grayson, W. L. (2018). Adipose-derived stem/stromal cells on electrospun fibrin microfiber bundles enable moderate muscle reconstruction in a volumetric muscle loss model. *Cell Transplantation, 27*(11), 1644-1656.

Han, C., Wang, R., Xu, N., Wei, X., Wei, Q., & Xu, X. (2022). Visual analysis of mesenchymal stem cell research in liver disease based on bibliometrics. *iLIVER, 1*(4), 283-291.

Hematti, P. (2011). Human embryonic stem cell-derived mesenchymal stromal cells. *Transfusion, 51*, 138S-144S.

Jiwlawat, N., Lynch, E., Jeffrey, J., Van Dyke, J. M., & Suzuki, M. (2018). Current progress and challenges for skeletal muscle differentiation from human pluripotent stem cells using transgene-free approaches. *Stem Cells International, 2018*.

Khanban, H., Fattahi, E., & Talkhabi, M. (2019). In vivo administration of G9a inhibitor A366 decreases osteogenic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Excli journal, 18*, 300.

Langer, R., & Peppas, N. A. (2003). Advances in biomaterials, drug delivery, and bionanotechnology. *AIChE Journal, 49*(12), 2990-3006.

Li, C.-J., Sun, L.-Y., & Pang, C.-Y. (2015). Synergistic protection of N-acetylcysteine and ascorbic acid 2-phosphate on human mesenchymal stem cells against mitoptosis, necroptosis and apoptosis. *Scientific Reports, 5*(1), 9819.

Lindblad, M., Tveden-Nyborg, P., & Lykkesfeldt, J. (2013). Regulation of vitamin C homeostasis during deficiency. *Nutrients, 5*(8), 2860-2879.

Nakamura, Y., Miyaki, S., Ishitobi, H., Matsuyama, S., Nakasa, T., Kamei, N., . . . Ochi, M. (2015). Mesenchymal-stem-cell-derived exosomes accelerate skeletal muscle regeneration. *FEBS letters, 589*(11), 1257-1265.

Narciso, M., Ulldemolins, A., Junior, C., Otero, J., Navajas, D., Farre, R., ... & Almendros, I. (2022). Novel decellularization method for tissue slices. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 10*, 832178.

Narita, Y., Yamawaki, A., Kagami, H., Ueda, M., & Ueda, Y. (2008). Effects of transforming growth factor-beta 1 and ascorbic acid on differentiation of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells into smooth muscle cell lineage. *Cell and tissue research, 333*(3), 449-459.

Qazi, T. H., Duda, G. N., Ort, M. J., Perka, C., Geissler, S., & Winkler, T. (2019). Cell therapy to improve regeneration of skeletal muscle injuries. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle, 10*(3), 501-516.

Qiu, X., Liu, S., Zhang, H., Zhu, B., Su, Y., Zheng, C., . . . Zhao, X. (2018). Mesenchymal stem cells and extracellular matrix scaffold promote muscle regeneration by synergistically regulating macrophage polarization toward the M2 phenotype. *Stem cell research & therapy, 9*, 1-15.

Raman, N., Imran, S. A., Noordin, K. B. A. A., Zaman, W. S. W. K., & Nordin, F. (2022). Mechanotransduction of mesenchymal stem cells (MSCs) during cardiomyocytes differentiation. *Heliyon*.

Sam Daliri, F., Talkhabi, M., Toolabi, N., Attari, F., & Kehtari, M. (2023). Investigation of the Effect of Conditioned Media of Mesenchymal Stem Cells Treated with Ascorbic Acid on Proliferative Behavior of Breast Cancer Cells. *Journal of Animal Biology, 15*(2), 233-245.

Savini, I., Catani, M. V., Duranti, G., Ceci, R., Sabatini, S., & Avigliano, L. (2005). Vitamin C homeostasis in skeletal muscle cells. *Free radical biology and medicine, 38*(7), 898-907.

Stevens, M. M., & George, J. H. (2005). Exploring and engineering the cell surface interface. *Science, 310*(5751), 1135-1138.

Takaku, Y., Ito, K., Chida, D., & Sato, T. (2022). Vascular endothelial growth factor-D upregulation in mesenchymal stem cells derived from melanocortin 2 receptor-deficient mice during osteoblast differentiation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology, 34*(6), 679-682.

Talaei-Khozani, T., & Yaghoubi, A. (2022). An overview of post transplantation events of decellularized scaffolds. *Transplant Immunology, 74*, 101640.

Talkhabi, M., Pahlavan, S., Aghdami, N., & Baharvand, H. (2015). Ascorbic acid promotes the direct conversion of mouse fibroblasts into beating cardiomyocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 463*(4), 699-705.

Talovic, M., Patel, K., Schwartz, M., Madsen, J., & Garg, K. (2019). Decellularized extracellular matrix gelloids support mesenchymal stem cell growth and function in vitro. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine, 13*(10), 1830-1842.

Urciuolo, A., & De Coppi, P. (2018). Decellularized tissue for muscle regeneration. *International Journal of Molecular Sciences, 19*(8), 2392.

VanDusen, K. W., Syverud, B. C., Williams, M. L., Lee, J. D., & Larkin, L. M. (2014). Engineered skeletal muscle units for repair of volumetric muscle loss in the tibialis anterior muscle of a rat. *Tissue Engineering Part A, 20*(21-22), 2920-2930.

Wahyuningsih, K. A., Karina, K., Rosadi, I., Rosliana, I., & Subroto, W. R. (2020). Effect of ascorbic acid on morphology of post-thawed human adipose-derived stem cells. *Stem Cell Investigation, 7*.

Wang, Y., Singh, A., Xu, P., Pindrus, M. A., Blasioli, D. J., & Kaplan, D. L. (2006). Expansion and osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on a vitamin C functionalized polymer. *Biomaterials, 27*(17), 3265-3273.

Yarlagadda, P. K., Chandrasekharan, M., & Shyan, J. Y. M. (2005). Recent advances and current developments in tissue scaffolding. *Bio-medical materials and engineering, 15*(3), 159-177.