

## Shake Flask Bioreactor System for Dynamic Culture of Mesenchymal Stem Cells on Electrospun PCL-nHA Nanofibrous Scaffolds for Bone Tissue Engineering

Mohammad Vazirzadeh<sup>1</sup>, Sameereh Hashemi-Najafabadi<sup>2\*</sup>, Masoud Soleimani<sup>3</sup>

- 1- M.Sc., Department of Biomedical Engineering, Faculty of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran Iran
- 2- Associate Professor, Department of Biomedical Engineering, Faculty of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 3- Associate Professor, Department of Hematology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*\*Corresponding Address: Postal Code: 1411713116, Department of Biomedical Engineering, Faculty of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran  
Email: s.hashemi@modares.ac.ir*

Received: 30/Aug/2015, Accepted: 09/Apr/2016

### Abstract

**Objective:** In the present study we investigated the effect of a dynamic culture in a shake flask bioreactor (SFB) on the proliferation and differentiation to osteoblasts for human mesenchymal stem cells (hMSCs) cultured on multilayered electrospun PCL-nHA scaffolds.

**Methods:** First, we prepared PCL-nHA scaffolds by electrospinning. After culturing the hMSCs on the scaffolds in a static state, the seeded scaffolds were divided into two groups (static and SFB culture) and incubated up to 21 days. We assessed biocompatibility and cell differentiation by the MTT, calcium, and alkaline phosphatase (ALP) assays on days 7, 14, and 21.

**Results:** The MTT assay evaluated hMSCs proliferation rate on the scaffold layers. There was greater cell proliferation (optical density values) on the layers in the bioreactor (OD=2.18) compared to the static state condition (OD=1.68) on day 21. In order to study osteogenic differentiation, we determined the amount of calcium deposition and ALP activity. We observed a 1.6-fold greater level of calcium deposition for the dynamic culture compared to the static culture, which showed increased cell differentiation within the bioreactor on day 21. The ALP results showed that during 14 days, ALP activity within the bioreactor was 1.55-fold higher than the static culture.

**Conclusion:** The SFB culture displayed a higher proliferation and differentiation of stem cells on PCL-nHA multilayered scaffolds compared to the static state condition.

**Keywords:** Nanofibrous scaffold, Electrospinning, Mesenchymal stem cells (hMSCs), Polycaprolactone, Shake flask bioreactor (SFB)

Pathobiology Research, Vol. 19 (2016-2017), No.1, Pages: 79-91

# راکتور زیستی فلاسک لرزان برای کشت پویای سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر نانوالیاف الکتروریسی شده پلی‌کاپرولاکتون - نانوهیدروکسی آپاتیت برای مهندسی بافت استخوان

محمد وزیرزاده<sup>۱</sup>، سمیره هاشمی نجف آبادی<sup>۲\*</sup>، مسعود سلیمانی<sup>۳</sup>

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست پزشکی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه زیست پزشکی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه خون شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

\*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده مهندسی شیمی، گروه زیست پزشکی

Email: s.hashemi@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۵/۰۱/۲۱

دریافت مقاله: ۹۴/۰۶/۰۹

## چکیده

**هدف:** در این مطالعه اثر محیط کشت پویا (در راکتور زیستی فلاسک لرزان) بر تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوانی با استفاده از داربست‌های الکتروریسی شده پلی‌کاپرولاکتون - نانوهیدروکسی آپاتیت بررسی شد. **مواد و روش‌ها:** ابتدا داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون - نانوهیدروکسی آپاتیت به روش الکتروریسی تهیه شد. پس از کشت ایستای سلول‌های بنیادی مزانشیمی روی داربست‌ها، داربست‌ها در یک دوره ۲۱ روزه به دو گروه کشت ایستا و راکتور زیستی فلاسک لرزان تقسیم شدند. تکثیر و تمایز سلول‌ها در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱، با آزمایش‌های MTT، کلسیم و آلکالین فسفاتاز بررسی شد.

**نتایج:** تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی روی لایه‌های داربست توسط آزمون MTT بررسی شد. تکثیر سلولی (جذب نوری) روی لایه‌ها در روز ۲۱ پس از کشت درون راکتور زیستی فلاسک لرزان ( $OD = 2/18$ ) نسبت به حالت ایستا ( $OD = 1/68$ ) بالاتر بود. به منظور مطالعات تمایز استخوانی، مقدار رسوب کلسیم و فعالیت آلکالین فسفاتاز اندازه‌گیری شد. میزان رسوب کلسیم برای کشت پویا ۱/۶ برابر بیشتر از کشت ایستا بود که این اختلاف نشان دهنده تمایز بیشتر سلول‌ها در دوره ۲۱ روزه درون راکتور زیستی فلاسک لرزان بود. فعالیت آلکالین فسفاتاز درون راکتور زیستی فلاسک لرزان در طول ۱۴ روز پس از کشت ۱/۵۵ برابر بیشتر از کشت ایستا بود.

**نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل از کشت راکتور زیستی فلاسک لرزان، تکثیر و تمایز بیشتر سلول‌های بنیادی به استخوانی را برای داربست‌های چندلایه پلی‌کاپرولاکتون - نانوهیدروکسی آپاتیت نسبت به ایستا نشان داد.

**کلیدواژگان:** داربست نانوالیاف، الکتروریسی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، پلی‌کاپرولاکتون، راکتور زیستی فلاسک لرزان

پژوهش‌های آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۹، شماره ۱، بهار ۱۳۹۵، صفحات: ۷۹-۹۱

## مقدمه

با وجود توانایی سیستم اسکلتی انسان برای بازسازی خود، چالش باقی ماندن نقص حاصل از شکستگی استخوان، نیاز به پیوند استخوان را برای غلبه بر این مشکل پررنگ‌تر می‌کند [۱]. در حال حاضر، استفاده از بافت پیوندی استخوان از خود بیمار

## راکتور زیستی فلاسک لرزان برای کشت پویای سلول‌های بنیادی مزانشیمی روی داربست‌های نانوالیاف

۱۰]. در کشت ایستا تمایز سلولی بعد از گذشت زمان محدودی کاهش می‌یابد ولی با ایجاد جریان مناسب در محیط کشت پویا، میزان تمایز سلولی در طول زمان افزایش می‌یابد. تنش برشی حاصل از جریان سیال بر سطح سلول‌های بنیادی سبب انتقال پیام‌های مکانیکی به سلول‌ها می‌شود که به‌نوبه خود پاسخ سلول‌ها به تنش‌های برشی، سبب افزایش تکثیر و تمایز سلولی و در نتیجه تشکیل استخوان می‌شود [۱۱، ۱۲].

به‌طور کلی راکتورهای زیستی (Bioreactors) برای غلبه بر محدودیت انتقال مواد غذایی و در معرض تنش برشی قرار دادن سلول‌ها توسعه یافته‌است. یکی از جنبه‌های مهم سامانه‌های راکتور زیستی، توانایی ایجاد شرایط محیطی برون تنی (In vitro) بسیار مشابه با شرایط درون تنی (In vivo) است [۱۰-۱۳]. راکتور زیستی فلاسک لرزان (Shake flask bioreactor: SFB) یکی از انواع راکتور زیستی است که در آن داربست‌ها روی سبدها قرار داده شده و سبدها به کمک یک محور مرکزی به درب محفظه متصل می‌شوند، به‌طوری که محیط کشت در اطراف داربست جریان دارد. در مقالات مشابه تکثیر و تمایز به سلول‌های استخوانی روی داربست‌های سه بعدی درون راکتور زیستی [مانند فلاسک چرخان (Spinner flasks)] گزارش داده شده است [۱۵، ۱۶].

در مطالعه حاضر، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی روی داربست‌های الکترورسی شده چند لایه PCL-nHA در SFB بررسی شد. داربست‌های چند لایه به‌منظور ترمیم نقص با اندازه بحرانی استفاده می‌شود. علاوه بر این؛ SFB برای افزایش نفوذپذیری اکسیژن و تولید جریان و تنش برشی در محیط کشت استفاده شد.

## مواد و روش‌ها

### مواد

در این پژوهش، برای کشت سلول‌ها از محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (ایده

یا هم نوع، تقاضای بالینی رو به رشد برای پیوند استخوان را برآورده نمی‌کند. با این وجود، رویکرد مهندسی بافت به‌ویژه برای ترمیم بافت استخوان، استفاده از اصول مهندسی و علوم حیاتی برای توسعه جایگزینی زیستی برای بازگرداندن، حفظ یا بهبود عملکرد بافت‌های انسانی است. سلول‌ها، داربست‌ها و عوامل رشد سه جزء اصلی مهندسی بافت هستند [۲، ۳].

داربست‌های سه‌بعدی، یک سازه حمایتی موقت برای تکثیر سلولی فراهم می‌کنند. همچنین سبب تشکیل شبکه برون سلولی و به‌دنبال آن رگ‌ها و رشد استخوان، محافظت از منطقه شکستگی در مقابل تهاجم بافت نرم و القای تکثیر و تمایز سلول‌های استخوانی می‌شوند [۴].

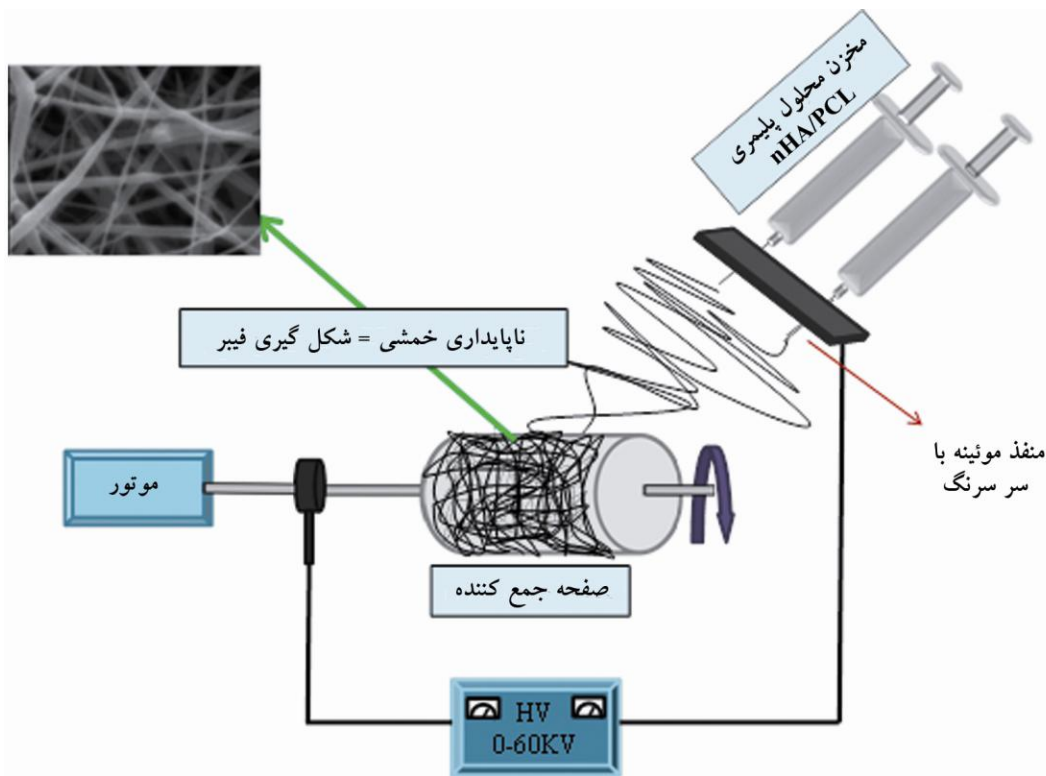
ساختار نانوالیاف، خواص منحصر به فردی چون نسبت سطح به حجم (که احتمالاً باعث افزایش چسبندگی سلولی) و انعطاف‌پذیری بالا را نشان می‌دهد. الکترورسی (Electrospinning) روشی بسیار ساده و ارزان برای تولید داربست‌های دوبعدی نانوالیاف با خواص مکانیکی مطلوب و تخلخل بالا است [۵-۹].

پلی‌کاپرولاکتون (Polycaprolactone: PCL) پلیمری زیست‌سازگار (Biocompatible) است که می‌توان آن را با موادی مانند نشاسته و هیدروکسی آپاتیت (Hydroxyapatite: HA) به‌منظور کاهش قیمت و افزایش زیست‌سازگاری ترکیب کرد. داربست‌های تولید شده از PCL، خواص مطلوبی را برای تحمل بار در کاربردهای مهندسی بافت استخوان از خود نشان می‌دهند. هیدروکسی آپاتیت ماده معدنی است که در ترکیب بافت استخوان وجود دارد. نانوهیدروکسی آپاتیت (nHA) استحکام نانوالیاف PCL را افزایش می‌دهد و همچنین خواص مکانیکی، زیست‌سازگاری، سرعت تخریب و تحریک استخوان‌سازی را بهبود می‌بخشد [۷، ۸].

تنش‌های برشی و مخلوط کردن محیط کشت، نقش مهمی در مهندسی بافت ایفا می‌کنند. اختلاط بهینه محیط کشت، افزایش انتقال جرم و نفوذپذیری مواد مغذی را به همراه دارد و در نتیجه باعث توسعه بافتی همگن در داربست می‌شود [۹].

گلاپکول تترا استیک اسید ( Ethylene Glycol Tetraacetic Acid: EGTA Sigma-) و اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (Ethylenediaminetetraacetic Acid: EDTA Sigma-) (Aldrich، آلمان) برای تهیه محلول RIPA (Radio Immunoprecipitation Assay) استفاده شد. در این پژوهش، از سلول‌های بنیادی مغز استخوان انسان بالغ تهیه شده از شرکت بن‌یاخته و تأیید شده توسط کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به شماره نامه ۵۲/د/۷۴۷ مورخ ۹۴/۲/۶ استفاده شد. سلول‌های مورد نظر تا پاساژ سوم به منظور تأمین سلول‌ها به اندازه مورد نیاز تکثیر داده شدند.

زیست نوترکیب، ایران) به همراه سرم جنینی گاوی ( Fetal Bovine Serum: FBS (GIBCO، آمریکا) استفاده شد. از PCL با وزن مولکولی ۸۰ کیلودالتون و nHA (Sigma-) برای تولید داربست‌ها استفاده شد. از آسکوربیک اسید (Ascorbic Acid)، بتاگلیسرول فسفات (β-Glycerol Phosphate) و دگزامتازون (Dexamethasone) (Sigma-Aldrich، آلمان) برای محیط تمایز استخوانی استفاده شد. از کلرید سدیم، سدیم دودسیل سولفات ( Sodium Dodecyl Sulfate: SDS or NaDS)، گلیسرول (Glycerol)، تریتون ایکس - ۱۰۰ [Triton (100x)]، اتیلن



شکل ۱. نمای از فرآیند الکترورسی و تهیه داربست نانوالیاف

وزنی) با استفاده از سامانه الکترورسی (آزمایشگاهی، نانوفناوران، ایران) برای هر دو کشت ایستا و پویا تهیه شدند (شکل ۱). ابتدا مخلوطی از nHA (۰/۰۹ گرم) در کلروفرم

## روش‌ها

### ساخت داربست

داربست‌های نانوالیاف از ترکیب PCL و nHA (۷/۵ درصد

### کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی روی داربست‌ها

سلول‌های بنیادی (پاساژ ۴) به‌طور جداگانه روی لایه‌های داربست نانوالیاف کشت داده شدند. سطح موجود برای کشت سلول‌ها ۳۱۵ میلی‌متر مربع بود. بدین منظور، ۱۰۰ میکرولیتر تعلیق سلولی حاوی  $3 \times 10^6$  سلول در محیط کشت DMEM (۱۰ درصد FBS) روی داربست‌ها، درون ظروف ۱۲ خانه‌ای کشت اضافه شد. برای اتصال سلول‌ها به سطح داربست، داربست‌ها به‌مدت ۱ ساعت درون انکوباتور (Incubator) (۳۷ درجه سلسیوس ۵ درصد  $CO_2$ ) قرار گرفت. پس از گذشت ۱ ساعت، ۱ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM (۱۰ درصد FBS) به هر یک از داربست‌های سلول‌دار، اضافه شد. داربست‌ها برای چسبندگی بهتر سلول‌ها، ۲۴ ساعت درون انکوباتور ۵ درصد  $CO_2$  قرار داده شد.

کشت ۲۴ ساعته سلول‌ها در محیط DMEM به‌منظور چسبندگی ابتدایی سلول‌ها روی داربست صورت گرفت. برای چسبندگی بهتر سلول‌ها روی داربست، ابتدا از محیط کشت غیرتمایزی استفاده شد. این کشت برای یکنواختی چسبندگی سلول‌ها، به‌صورت یکسان برای هر دو کشت ایستا و پویا انجام شد. بعد از این مرحله، سلول‌ها در هر دو نوع کشت برای آزمون کلسیم، آلکالین فسفاتاز و Dimethylthiazol-3-(4,5)-MTT Bromide [2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium (۲۱ به‌مدت ۲۱ روز در محیط کشت تمایزی کشت داده شدند.

### کشت ایستا و پویا

داربست‌های نانوالیاف به‌منظور یک دوره کشت ۲۱ روزه، به دو گروه کشت پویا و راکتور زیستی دسته‌بندی شدند. بدین منظور، چهار لایه داربست با هم روی هر یک از سبدهای محور مرکزی راکتور زیستی قرار گرفتند. راکتور زیستی شامل یک بازوی جانبی فیلتردار برای تبادل اکسیژن و  $CO_2$  با محیط اطراف است (شکل ۲). همچنین دارای یک محور مرکزی به‌منظور حمل هشت سبد برای نگهداری داربست‌های چند لایه است. راکتور زیستی حاوی ۱۲۰

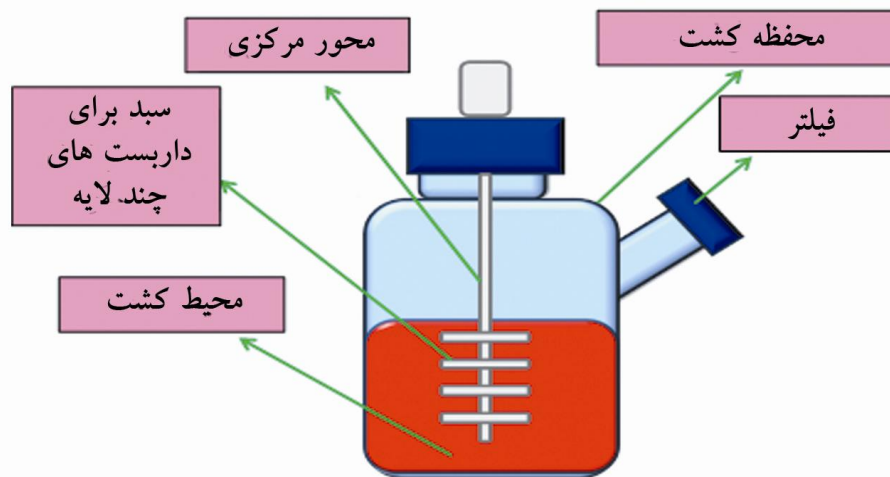
(Merck، آمریکا) و دی متیل فراماید (Dimethylformamide: DMF) (Sigma-Aldrich، آلمان) (درصد حجمی ۷۵/۲۵) تهیه شد، مخلوط به‌مدت ۱۵ دقیقه همزده شد و برای توزیع بهتر ذرات، به‌مدت ۱۰ دقیقه مورد فرا آوادهی قرار گرفت. در ادامه PCL (۱/۲۱ گرم) به مخلوط اضافه شد و به‌مدت ۳ ساعت همزده شد و در انتها ۱۰ دقیقه تحت فرا آوادهی قرار گرفت. محلول حاصل، داخل دو نازل ریخته شد و درون دستگاه الکترورسی قرار گرفت. نانوالیاف PCL-nHA با روش الکترورسی تصادفی در شرایط ولتاژ کاربردی ۲۰ کیلوولت، فاصله نازل تا صفحه جمع‌کننده ۱۵ سانتی‌متر، دبی خروجی محلول ۰/۴ میلی‌لیتر بر ساعت، سرعت جمع‌کننده ۳۰۰ دور بر دقیقه و زاویه پاشش نسبت به افق ۴۵ درجه تهیه شد. فرآیند الکترورسی توسط دو نازل و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و فشار یک اتمسفر انجام گرفت. بعد از حدود ۶ ساعت الکترورسی، صفحه نانوالیافی مورد نظر آماده شد [۷]. سپس صفحه تولید شده در محیط کوره خلأ برای حلال‌زدایی به‌مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت.

### آماده‌سازی داربست برای راکتور زیستی و اصلاح سطحی آن

داربست‌ها به قطر خارجی ۲۲ میلی‌متر و قطر خارجی ۹/۵ میلی‌متر از صفحه تولید شده توسط دستگاه الکترورسی، برش زده شد. برای ایجاد داربست چند لایه با ضخامت بیشتر، ۴-۵ لایه داربست برش زده شده، با پنس روی هم قرار گرفت. داربست‌های پلیمری PCL به‌دلیل آب‌گریز بودن، دارای سطح مناسب برای چسبندگی سلول‌ها نیست. به‌منظور بهبود سطح و افزایش چسبندگی سلول‌ها به سطح داربست، از پلاسمای گاز اکسیژن استفاده شد. اصلاح سطحی با پلاسمای سبب افزایش اتم‌های اکسیژن باردار در سطح و در نتیجه آب‌دوستی سطح می‌شود. پلاسمای سطح درون یک راکتور استوانه‌ای کوارتزی (نانو UHP، Diener، آلمان) با گاز اکسیژن خلوص بالا و فشار ۰/۴ میلی‌بار انجام گرفت.

کره جنوبی) با دور ۳۰ دور بر دقیقه درون انکوباتور ۵ درصد CO<sub>2</sub> قرار گرفت. نمونه‌های کنترل در کشت ایستا به صورت مشابه در چهار لایه داربست روی هم، درون هر یک از خانه‌های ظروف ۱۲ خانه‌ای با ۱/۵ میلی‌لیتر محیط تمایزی روی قفسه‌های انکوباتور ۵ درصد CO<sub>2</sub> گذاشته شد.

میلی‌لیتر محیط کشت تمایزی DMEM با گلوکز بالا حاوی ۱۰ درصد FBS به همراه القاگرهای دگزامتازون (۱۰ میکرومولار)، بتاگلیسرول فسفات (۱۰ میلی‌مولار) و آسکوربیک اسید (۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) است [۷]. راکتور زیستی روی همزن (N-Biotec, Shaking Incubator)



شکل ۲ تصویر شماتیک بیوراکتور فلاسک لرزان ساخته شده برای انجام پژوهش

اتانول، آب گیری داربست‌ها انجام شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دسیکاتور (Desiccator) برای حذف هر گونه حلال باقی‌مانده قرار داده شد. در نهایت سطوح با یک لایه نازک از طلا برای تصویربرداری با SEM پوشش داده شد [۸].

### بررسی تکثیر سلولی

به منظور بررسی میزان تکثیر سلولی روی داربست‌ها، در دو گروه پویا و ایستا، آزمون MTT در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از کشت انجام گرفت. بعد از حذف محیط کشت تمایزی از روی داربست‌ها، محلول ۱ درصد MTT (۵ میلی‌گرم تترازولیوم برامید (Sigma-Aldrich، آلمان) در محلول بافر فسفات) به همراه محیط کشت DMEM به میزان ۲ میلی‌لیتر به هر چهار لایه داربست اضافه شد. داربست‌ها درون محیط

### تجزیه و تحلیل‌ها و آزمون‌ها

#### بررسی شکل ظاهری داربست‌های نانوالیاف

شکل‌شناسی نانوالیاف تولیدی، میزان توزیع ذرات nHA و تعیین قطر الیاف، توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning Electron Microscope: SEM) (Philips، هلند) دانشکده فنی دانشگاه تربیت مدرس، بررسی شد. به منظور مطالعه شکل‌شناسی سلول‌های روی داربست‌ها بعد از ۱۴ روز کشت درون SFB، داربست‌ها پس از خروج از محیط کشت به منظور حذف سلول‌های مرده و نچسبیده با محلول بافر فسفات (Phosphate Buffered Saline: PBS) (GIBCO، آمریکا) شسته شد. لایه‌ها از هم جدا شد، عمل تثبیت روی داربست‌ها با محلول گلو تارآلدید (Sigma-Aldrich، آلمان) ۳ درصد انجام شد. در مرحله بعد با استفاده از افزایش درصد

## راکتور زیستی فلاسک لرزان برای کشت پویای سلول‌های بنیادی مزانشیمی روی داربست‌های نانوالیاف

شد. میزان فعالیت آلكالین فسفاتاز در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ با استفاده از کیت آلكالین فسفاتاز پارس آزمون اندازه‌گیری شد. ابتدا محلول RIPA تهیه شد. برای تهیه محلول RIPA، محلول‌های زیر به صورت مجزا تهیه شد: محلول ۰/۰۱ میلی مولار EDTA (۰/۱۶۶ گرم EDTA در ۴۰ میلی لیتر آب)، محلول ۰/۰۱ میلی مولار EGTA (۰/۱۵۲ گرم EGTA در ۴۰ میلی لیتر آب)، محلول ۰/۱ مولار Tris-HCl (۰/۶۳ گرم Tris-HCl در ۴۰ میلی لیتر آب) و محلول ۱ مولار NaCl (۲/۳۴ گرم نمک در ۴۰ میلی لیتر آب). از هر یک از محلول‌های تهیه شده، حجم ۱۰ میلی لیتر درون یک بالن ۱۰۰ میلی لیتری ریخته شده و ۵ میلی لیتر گلیسرول، ۰/۱ گرم SDS و یک میلی لیتر تریتون به آن‌ها اضافه شد. در ادامه با افزودن آب، حجم محلول به ۱۰۰ میلی لیتر رسید.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آلكالین فسفاتاز، ابتدا ۵۰۰ میکرولیتر محلول RIPA به سلول‌های روی هر چهار لایه داربست اضافه شد. سپس، ظرف یاد شده در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. از محلول رویی، ۲۰ میکرولیتر برداشته و به ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کیت اضافه شد. در کیت آلكالین فسفاتاز، آنزیم آلكالین فسفاتاز، واکنش تبدیل پارانیتروفنیل فسفات (P-Nitrophenylphosphate) بی‌رنگ را به پارانیتروفنیل زرد رنگ کاتالیز می‌کند. با اندازه‌گیری میزان جذب نوری نیتروفنیل تشکیل شده در طول موج ۴۰۵ نانومتر، مقدار آلكالین فسفاتاز تعیین شد [۸، ۱۱].

## روش تحلیل آماری و ارزیابی نتایج

هر آزمایش حداقل سه بار در دو گروه شاهد (ایستا) و پویا تکرار شد. تجزیه و تحلیل آماری Student t-test برای مقایسه نتایج حاصل از آزمایش‌ها در نمونه‌های گروه آزمایش و شاهد که همزمان انجام شد، به کار گرفته شد. مقدار P کوچک‌تر از ۰/۰۵ معیار اختلاف معنی‌دار پاسخ گروه‌ها در آزمایش‌ها در نظر گرفته شد. باید به این نکته اشاره کرد که مقایسه بین گروه‌های

تاریک انکوباتور ۵ درصد CO<sub>2</sub> و دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از ۳ ساعت محلول MTT خارج شد و برای حل کردن بلورهای فورمازان از محلول آلی دی‌متیل سولفوکسید (Dimethyl Sulfoxide: DMSO) (سیناژن، ایران) استفاده شد. میزان کدورت محلول به دست آمده در طول موج ۵۴۵ نانومتر توسط دستگاه قرائت‌گر الیزا (ELISA Reader) اندازه‌گیری شد [۵].

## بررسی تمایز سلول‌ها به استخوان

### آزمایش رسوب کلسیم

برای بررسی میزان کلسیم تولیدی، از محلول تجاری شرکت پارس آزمون [حاوی کرسولفتالین (Cresolphthalein)] استفاده شد. ابتدا داربست‌های هر دو دسته راکتور زیستی و ایستا به صورت مجزا از محیط کشت خارج شد و با محلول بافر فسفات، به منظور حذف محیط کشت شسته شد. برای استخراج رسوب‌های نمکی معدنی، هر چهار لایه داربست با هم توسط ۴ میلی لیتر اسیدکلریدریک (۰/۶ نرمال) شسته شد. در مرحله بعد، ۱۰ میکرو لیتر از این محلول به ۲۰۰ میکرو لیتر از محلول کیت سنجش کلسیم اضافه شد. کدورت محلول در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. با توجه به این‌که در ترکیب هیدروکسی آپاتیت نیز کلسیم وجود دارد، برای جلوگیری از دخالت این میزان در مقدار جذب کلسیم، تمام مراحل به صورت مشابه برای داربست‌های خالی بدون سلول نیز انجام گرفت؛ میزان کلسیم آن محاسبه و از مقدار جذب داربست‌های PCL-nHA حاوی سلول کسر شد [۱۱].

## اندازه‌گیری فعالیت آلكالین فسفاتاز

آلكالین فسفاتاز یکی از نشانگرهای قابل توجه تمایز به سلول‌های استخوانی و در نتیجه از مهم‌ترین فنوتایپ‌های (Phenotypes) سلول‌های استخوان‌ساز است. در این مطالعه، توان استخوان‌سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی روی داربست‌ها از طریق بررسی فعالیت آلكالین فسفاتازی ارزیابی

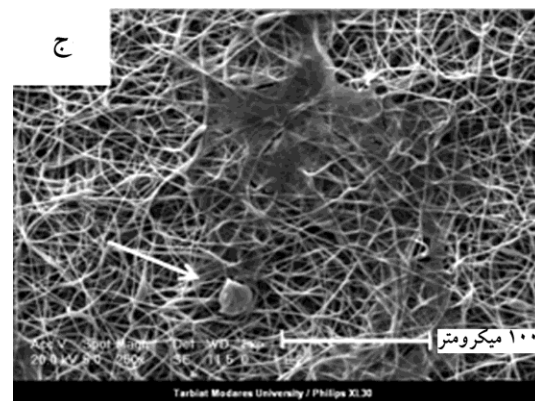
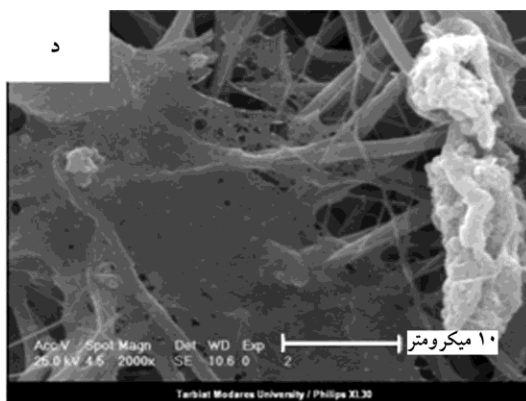
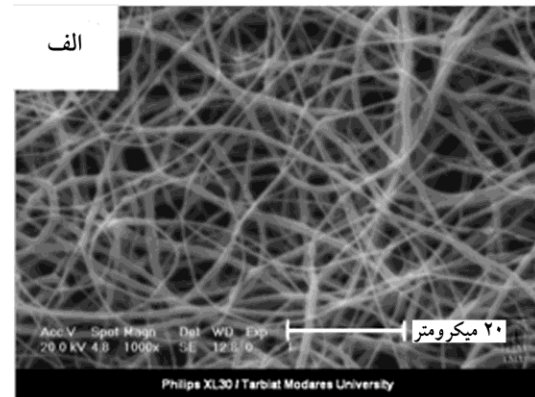
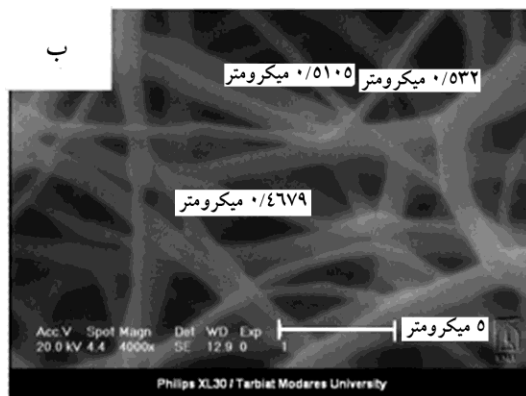
ایستا و درون راکتور زیستی PCL-nHA صورت گرفت.

## نتایج

### بررسی شکل‌شناسی تصاویر SEM

داربست‌های نانوالیاف PCL-nHA به کمک روش الکتروزیستی تهیه شدند. از تصاویر SEM برای بررسی ساختار داربست استفاده شد. تصاویر SEM، ساختار تصادفی نانوالیاف را نشان می‌دهند. ساختار داربست متخلخل و قطر الیاف در

محدوده ۲۰۰-۵۰۰ نانومتر است. قطر متوسط الیاف الکتروزیستی شده در حدود ۲۹۰ نانومتر بود. در شکل ۳ کلوخه‌ای از نانوذرات هیدروکسی آپاتیت در طول نانوالیاف مشاهده نمی‌شود که می‌توان توزیع یکنواخت نانوذرات را در طول نانوالیاف نتیجه گرفت. ذرات تصاویر SEM از داربست‌ها (تنها به عنوان ۲ نمونه) ۱۴ روز پس از کشت سلولی تشکیل بلورهای کلسیم و تمایز سلول‌های استخوانی (شکل ۳) را نشان داد. این داربست‌ها در شرایط بهینه‌سازی تهیه شد که میزان تخلخل آن‌ها ۸۵ درصد است [۷].



شکل ۳ تصاویر SEM داربست PCL-nHA بدون سلول در مقیاس (الف) ۲۰ میکرومتر و (ب) ۵ میکرومتر؛ داربست حاوی سلول پس از ۱۴ روز کشت درون راکتور زیستی در مقیاس (ج) ۱۰۰ میکرومتر و (د) ۱۰ میکرومتر

### بررسی تکثیر سلولی

از آزمایش MTT به‌عنوان معیاری برای میزان زنده ماندن

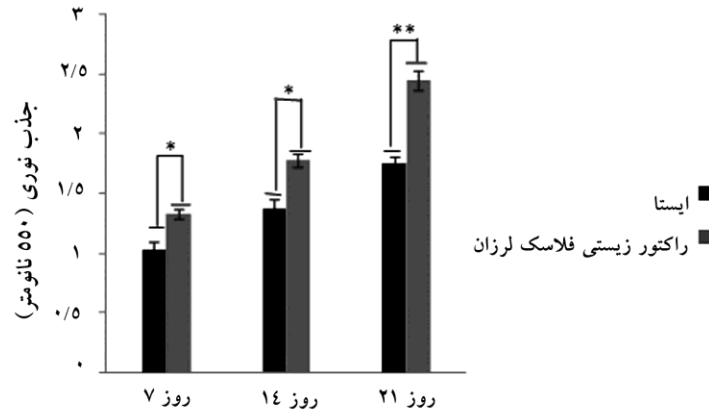
سلول‌ها استفاده شد. نتایج به‌دست آمده در کشت ایستا و درون SFB در شکل ۴ نشان داده شده است. میزان جذب نوری محلول



### راکتور زیستی فلاسک لرزان برای کشت پویای سلول‌های بنیادی مزانشیمی روی داربست‌های نانوالیاف

داربست‌ها، بیان‌گر این است که کشت درون راکتور زیستی و ایستا دارای توانایی ایجاد شرایط مناسب برای تکثیر سلول‌ها است.

فورمازان در این آزمون، معیاری برای ارزیابی وجود میزان سلول‌های زنده روی داربست‌ها بود. روند افزایش این مقدار بر لایه‌های

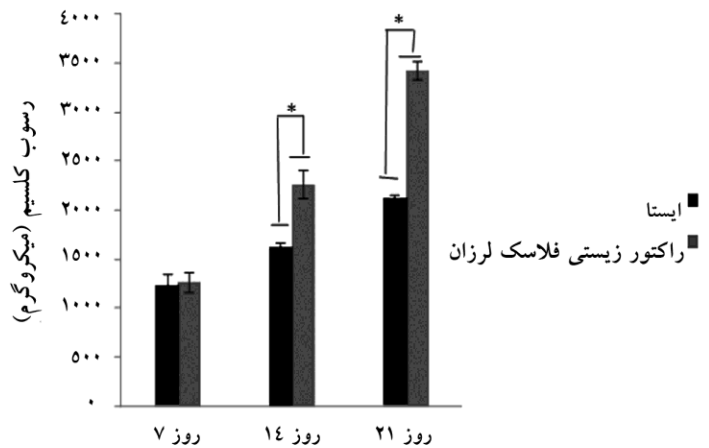


شکل ۴ نتایج حاصل از آزمون MTT روی داربست‌های چندلایه PCL-nHA در کشت ایستا و SFB ( $P < 0.05$  و  $P < 0.01$ )

کلسیم‌دار روی داربست‌ها در دو حالت کشت افزایش پیدا کرد. این میزان افزایش در طول دوره برای داربست‌های درون راکتور زیستی بیشتر از داربست‌های کشت ایستا بود.

### رسوب مواد معدنی کلسیم

مقدار کلسیم تولیدی روی چهار لایه داربست در روز ۷، ۱۴ و ۲۱ محاسبه شد. در طول دوره ۲۱ روزه، همان‌طور که در شکل ۵ نشان داده شده، میزان رسوب‌های

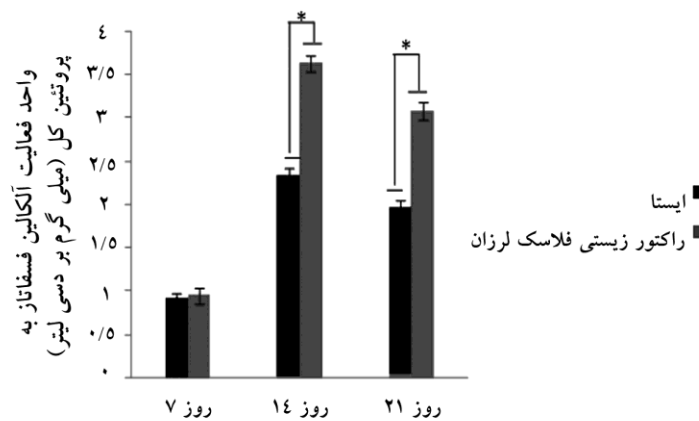


شکل ۵ نتایج رسوب کلسیم روی داربست‌های چندلایه PCL-nHA در کشت ایستا و SFB ( $P < 0.05$ )

## فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز

آلکالین فسفاتاز، به‌عنوان یکی از شاخص‌های استخوانی شناخته شده که در مراحل اولیه معدنی شدن که همراه با تجمع یون کلسیم و فسفات غیرآلی است، نقش مهمی دارد. افزون بر این، افزایش معدنی شدن بستر برون سلولی را به همراه دارد. نتایج فعالیت آلکالین فسفاتاز در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ بر مقدار

روز صفر، نرمالیزه شد و در انتها نتایج به‌دست آمده بر مقدار کل پروتئین سلولی نرمالیزه شد (شکل ۶). در طول دوره ۱۴ روزه مقدار فعالیت آلکالین فسفاتاز در داربست‌های درون راکتور زیستی بیشتر از مقدار آن در ایستا است. این میزان در روز ۲۱ بعد از کشت با مقداری کاهش روبه‌رو شده است که می‌توان دلیل آن را بلوغ اکثر سلول‌ها در روز ۱۴ پس از کشت دانست.



شکل ۶ نتایج فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در داربست‌های چندلایه PCL-nHA در کشت ایستا و SFB ( $P < 0.001$ )

## بحث

با توجه به تصویر SEM قطر الیاف داربست و اندازه تخلخل‌های در مقیاس نانو و میکرومتر است. این دو عامل سبب افزایش نسبت سطح به حجم می‌شود که فرصت را برای اتصال سلول‌ها به سطح داربست افزایش می‌دهد. وجود تخلخل بالا در ساختار داربست نانوالیاف، سبب تسهیل در انتقال مواد غذایی و اکسیژن می‌شود و در افزایش رشد سلولی اهمیت زیادی دارد. داربست‌های تولید شده با روش الکتروریسی در این پژوهش، دارای سطحی یکنواخت است که سطوحی کاملاً یکنواخت را برای چسبندگی، تکثیر و نفوذ سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای تمامی لایه‌ها فراهم می‌کند. شکل‌شناسی سلول‌ها بر لایه‌های داربست در حالت کشت SFB، نشان دهنده شرایط مطلوب

برای رشد سلول‌ها است. نتایج حاصل از تصویربرداری SEM تأیید‌کننده شرایط مناسب کشت و گسترش یکنواخت سلول‌ها روی داربست‌های درون راکتور زیستی است. در روز چهاردهم، سلول‌ها گسترده‌گی و پهن‌شدگی خوبی روی تمامی لایه‌های داربست‌ها از خود نشان دادند.

میزان نفوذپذیری اکسیژن و مواد مغذی به‌عنوان یک عامل حیاتی برای زنده ماندن سلول‌ها، در محدوده ۱۰۰-۲۰۰ میکرومتر در کشت ایستا گزارش شده است [۱۱]. در SFB، سبدهای حاوی داربست‌ها در فاصله‌های تقریباً برابر از هم و به ترتیب در فاصله‌های ۳، ۸، ۱۳، ۱۸، ۲۳، ۲۸ و ۳۲ میلی‌متری از سطح محیط کشت قرار گرفت. در صورتی که در کشت شاهد در محیط ایستا، داربست‌ها در محیط کشتی به ارتفاع

## راکتور زیستی فلاسک لرزان برای کشت پویای سلول‌های بنیادی مزانشیمی روی داربست‌های نانوالیاف

نشان داد که تنش برشی حاصل از گردش محیط کشت در راکتور زیستی باعث افزایش اثر تحریکی تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های استخوانی می‌شود.

تجزیه و تحلیل شاخص‌های بیوشیمیایی مانند فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز یکی از رایج‌ترین روش‌ها برای بررسی رفتار تمایزی سلول‌های بنیادی به استخوانی است. آنزیم آلکالین فسفاتاز به‌عنوان یک نشانگر اولیه برای تمایز استخوانی شناخته شده است و نمی‌توان نقش برجسته آن را در اولین مرحله کانی‌سازی که همراه با تجمع یون‌های کلسیم و فسفات معدنی است، نادیده گرفت. در طول دوره ۲۱ روزه، رفتار مشابهی از فعالیت آلکالین فسفاتاز در هر دو کشت ایستا و SFB مشاهده شد. در روزهای ۷ و ۱۴، مقدار آن در مقایسه با روز صفر افزایش یافت. میزان افزایش فعالیت این آنزیم در SFB در روزهای ۱۴ و ۲۱ بیشتر از کشت ایستا بود ( $P < 0.001$ ). با توجه به این واقعیت که فعالیت آلکالین فسفاتاز نقش مهمی در استخوان‌سازی ایفا می‌کند، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که بالاتر بودن فعالیت آلکالین فسفاتاز در لایه‌های داربست درون راکتور زیستی، بیانگر توانایی بالاتر آن در تشکیل استخوان نسبت به کشت ایستا است.

زی-یانگ (Zhang) [۱۱] در بررسی‌های مشابه از کشت سلول‌های بنیادی روی داربست‌های سه‌بعدی درون راکتور زیستی چرخان دو محوری در مقایسه با کشت ایستا، افزایش بیان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز را طی دوره مشابه درون راکتور زیستی نشان داد. همچنین در بررسی‌های مشابه برای تمایز استخوانی، میزان کلسیم رسوبی طی دوره ۲۸ به میزان قابل ملاحظه‌ای نسبت به حالت ایستا افزایش پیدا کرده بود. او اثر این افزایش را در وجود جریان اجباری و همزن‌دار راکتور زیستی دانست که این عامل سبب بهبود جریان سیال در بستر درونی داربست می‌شود و همچنین تنش‌های برشی حاصل از این نوع جریان سیال، تمایز سلولی را نسبت به حالت ایستا افزایش می‌دهد [۹، ۱۱].

گلدشتاین (Goldstein) و همکارانش [۱۵] در مقایسه‌ای

بیشینه نیم ساعته متر قرار گرفتند. از آنجایی که سلول‌های قرار گرفته در روز صفر (لحظه کاشت) روی تمامی لایه‌های داربست‌ها مساوی بودند، مقایسه این سلول‌ها در روزهای بعدی در دو حالت کشت، نشان دهنده قدرت تکثیر سلول‌ها درون راکتور زیستی و کشت ایستا است. نتایج برای روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از کاشت گزارش شد. با توجه به نتایج آزمون MTT در پیش‌آزمایش‌ها، تعداد سلول‌ها روی لایه‌های داربست‌ها در روز صفر به‌طور تقریبی یکسان بود. در روز هفتم پس از کاشت در دو حالت کشت، کدورت خوانده شده برای هر گروه از لایه‌های داربست، در هر دو حالت افزایش داشت. میزان کدورت خوانده شده در کشت درون راکتور زیستی نسبت به کشت ایستا به میزان قابل توجهی بالاتر بود ( $P < 0.05$ ). این مقدار برای دو گروه کشت در روز ۱۴ افزایش داشت که نشانه گسترش سلولی است. ولی این مقدار افزایش برای SFB در مقایسه با نمونه‌های کشت ایستا بیشتر بود. میزان اختلاف خوانده شده برای روز چهاردهم راکتور زیستی نسبت به ایستا با درجه  $P < 0.05$  معنی‌دار است. مقدار کدورت اندازه‌گیری شده داربست‌ها در روز ۲۱ پس از کشت درون راکتور زیستی اختلاف معنی‌داری نسبت به حالت ایستا دارد ( $P < 0.01$ ). افزایش جذب نوری برای داربست‌های درون راکتور زیستی بیان‌کننده تکثیر و گسترش بیشتر سلول‌ها روی داربست‌های درون آن است.

سلول‌های بنیادی در تمایز خود به سلول‌های استخوانی رسوب کلسیم تولید می‌کنند که می‌توان آن را به‌عنوان شاخصی برای تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های استخوانی اندازه‌گیری کرد. در روز ۲۱ مقدار کلسیم در کشت درون SFB بیشتر از کشت ایستا بود. تفاوت معنی‌داری در تشکیل رسوب کلسیم در روز ۷ روی داربست پس از افزودن محیط کشت تمایزی مشاهده شد. در راکتور زیستی تفاوت قابل توجهی از تشکیل رسوب کلسیم در روزهای ۱۴ و ۲۱ در مقایسه با کشت ایستا مشاهده شد ( $P < 0.05$ ) که نشان دهنده اثر جریان سیال بر تمایز سلول‌ها در محیط کشت درون SFB است. این نتایج

نیز ۶/۶ برابر در دوره ۲۱ روزه بود. این پژوهش نیز نشان داد که وجود جریان در داخل داربست‌های سه بعدی، سبب افزایش انتقال جرم و در نتیجه بهبود گسترش سلولی می‌شود. همچنین وجود جریان در محیط کشت سبب افزایش تمایز استخوانی سلول‌های بنیادی موشی شد [۱۶].

در این پژوهش، برای اولین بار اثر جریان محیط کشت بر تمایز و زنده ماندن سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر روی داربست‌های نانوالیاف PCL-nHA درون SFB بررسی شد. این مطالعه روشی علمی را برای کشت همگن سلول‌ها روی داربست‌های نانوالیاف الکترووریسی شده برای پیوند بافت با اندازه نقص بحرانی پیشنهاد می‌کند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که وجود جریان سیال در محیط کشت، سبب بهبود تکثیر سلولی و تمایز سلولی می‌شود. همچنین می‌توان نتیجه گرفت که با ایجاد جریان در محیط کشت میزان تکثیر سلولی و سرعت تمایز سلولی افزایش می‌یابد.

## تشکر و قدردانی

لازم می‌دانیم که از حمایت و همکاری شرکت بن‌یاخته و معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس در اجرای این پژوهش تشکر و قدردانی نمایم.

از انواع راکتورهای زیستی با هم و با کشت ایستا نشان دادند که میزان آلکالین فسفاتاز تولیدی در کشت ایستا نسبت به راکتور زیستی جریان اجباری و فلاسک همزن‌دار تقریباً نصف است. همچنین میزان استئوکلسین (Osteocalcin) تولیدی (به عنوان شاخص تمایز استخوانی) طی دوره ۱۴ روزه در بیوراکتور همزن‌دار بیشتر از حالت ایستا و دیواره چرخان است. میزان گسترش سلولی در این پژوهش، طی ۱۴ روز در راکتور زیستی فلاسک همزن‌دار ۸/۶ میلیون سلول و برای حالت ایستا ۱/۶ میلیون سلول بود. گلدشتاین این افزایش تعداد سلول‌ها را در کشت پویا نسبت به حالت ایستا در بهبود انتقال مواد مغذی به داخل داربست دانسته است.

در مطالعه‌ای دیگر؛ سیکاویتسلس (Sikavitsas) و همکارانش [۱۶] در مقایسه کشت سلولی در سه حالت ایستا، دیواره چرخان و فلاسک همزن‌دار نشان دادند که میزان گسترش سلولی در فلاسک همزن‌دار در روز ۷ بعد از کشت در حالت فلاسک همزن‌دار ۶۰ درصد بیشتر از ایستا است. این مقدار از اختلاف، در روز چهاردهم بعد از کشت نیز، نشان داده شد که نشان دهنده برتری فلاسک همزن‌دار نسبت به دو حالت کشت در این پژوهش بود. همچنین آزمون بررسی تمایزی آلکالین فسفاتاز نشان داد که مقدار آلکالین فسفاتاز تولیدی در فلاسک همزن‌دار ۲/۴ برابر بالاتر از دو حالت کشت در روز ۱۴ بعد از کشت بود و مقدار کلسیم رسوبی

## منابع

- [1] Zhang ZY1, Teoh SH, Hui JH, Fisk NM, Choolani M, Chan JK. The potential of human fetal mesenchymal stem cells for off-the-shelf bone tissue engineering application. *Biomaterials* 2012; 33(9): 2656-72.
- [2] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260(5110): 920-6.
- [3] Wei G, Ma PX. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2004; 25(19): 4749-57.
- [4] Venugopal J, Zhang YZ, Ramakrishna S. Fabrication of modified and functionalized polycaprolactone nanofibre scaffolds for vascular tissue engineering. *Nanotechnology* 2005; 16(10): 2138-42.
- [5] Mobini S, Solati-Hashjin M, Peirovi H, Samadikuchaksaraei A. Synthesis and characterization

- of fiber reinforced polymer scaffolds based on natural fibers and polymer for bone tissue engineering application. *Iranian Journal of Biotechnology* 2012; 10(3): 184-90.
- [6] Zhang YZ, Venugopal J, Huang ZM, Lim CT, Ramakrishna S. Characterization of the surface biocompatibility of the electrospun PCL-collagen nanofibers using fibroblasts. *Biomacromolecules* 2005; 6(5): 2583-9.
- [7] Doustgani A. Manufacturing and investigation of multilayer nanofibers scaffolds for bone tissue engineering applications. PhD thesis, 2012; Tehran: Tarbiat Modares University. (Persian).
- [8] Baghaban-Eslaminejad M, Bagheri F, Zandi M, Nejati E, Zomorodian E, Mivehch H. Comparison of proliferation and osteoblast differentiation of marrow-derived mesenchymal stem cells on nano- and micro-hydroxyapatite contained composite scaffolds. *Iranian Journal of Biotechnology* 2010; 8(4): 234-42.
- [9] Zhang ZY, Teoh SH, Teo EY, Khoo Chong MS, Shin CW, Tien FT, Choolani MA, Chan JKY. A comparison bioreactor for the culture of fetal MSC for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2010; 31(33): 8684-95.
- [10] Yeatts AB, Fisher JP. Bone tissue engineering bioreactors: dynamic culture and the influence of shear stress. *Bone* 2011; 48(2): 171-81.
- [11] Zhang ZY, Teoh SH, Chong WS, Foo TT, Chng YC, Choolani M, Chan J. A biaxial rotating bioreactor for the culture of fetal mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2009; 30(14): 2694-704.
- [12] Pörtner R, Nagel-Heyer S, Goepfert C, Adamietz P, Meenen NM. Bioreactor design for tissue engineering. *J Biosci Bioeng* 2005; 100(3): 235-45.
- [13] Korossis SA, Bolland F, Kearney JN, Fisher J, Ingham E. Bioreactors in Tissue Engineering. *Tissue Engineering* 2005; 2(8): 145-54.
- [14] Zhang ZY, Teoh SH, Chong MS, Lee ES, Tan LG, Mattar CN, Fisk NM, Choolani M, Chan J. Neo-vascularization and bone formation mediated by fetal mesenchymal stem cell tissue-engineered bone grafts in critical-size femoral defects. *Biomaterials* 2010; 31(4): 608-20.
- [15] Goldstein AS1, Juarez TM, Helmke CD, Gustin MC, Mikos AG. Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. *Biomaterials* 2001; 22(11): 1279-88.
- [16] Sikavitsas VI, Bancroft GN, Mikos AG. Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor. *J Biomed Mater Res* 2002; 62(1): 136-48.