

Investigation of the Dynamic Culture Medium on Proliferation and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells after Culturing on Electrospun PCL and PCL-nHA Nanofibers

Mohammad Vazirzadeh¹, Sameereh Hashemi-Najafabadi^{2*}, Masoud Soleimani³, Maliheh Yaghoobi⁴

1- M.Sc., Department of Biomedical Engineering, Faculty of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Department of Biomedical Engineering, Faculty of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Associated Professor, Department of Hematology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

4- Ph.D. Candidate, Department of Biotechnology, Faculty of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

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

Received: 26/May/2014, Accepted: 06/Sep/2014

Abstract

Objective: More similarity to in vivo may help to increase the proliferation and differentiation of cells at in vitro culture. The present study has investigated the effect of a dynamic culture medium and nano hydroxyapatite (nHA) presence on proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) to bone cells using electrospun polycaprolactone (PCL) scaffolds.

Methods: We prepared PCL and PCL-nHA scaffolds by electrospinning. After static culturing of the scaffolds with MSCs, the scaffolds, were divided into two groups of static and dynamic cultures. The dynamic culture scaffolds were placed on a shaker. Cell proliferation and differentiation at days 3, 7 and 14 were investigated by MTT, and the calcium and alkaline phosphatase assays.

Results: The obtained results from the MTT assay on day 14 showed an increase of 1.1 times in cell proliferation in the dynamic culture compared to the static culture. During this period, the calcium content produced by cells in the dynamic culture at day 14 were 1.23 times higher for PCL scaffolds and 1.46 times higher for PCL-nHA scaffolds compared to the static culture. Alkaline phosphatase levels for the dynamic state PCL scaffold were 1.24 times more and for PCL-nHA scaffolds were 1.28 times more compared to the static culture at day 14.

Conclusion: The obtained results from dynamic culture, showed higher proliferation and differentiation of stem cells to bone for both PCL and PCL-nHA scaffolds compared to the static culture. The amount of cell proliferation and differentiation in the scaffolds that contained nHA was more than scaffolds that did not have nHA.

Keywords: Electrospinning, Mesenchymal Stem Cells, Polycaprolactone, Nanohydroxyapatite, Dynamic Medium

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol. 17 (2014-2015), No. 4, Pages: 63-73

مطالعه محیط کشت پویا بر رشد و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از کشت روی نانو الیاف الکتروریسی شده پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌کاپرولاکتون - نانوهیدروکسی آپاتیت

محمد وزیرزاده^۱، سمیره هاشمی نجف آبادی^{۲*}، مسعود سلیمانی^۳، ملیحه یعقوبی^۴

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

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

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

۴- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده مهندسی شیمی، گروه زیست پزشکی
Email: s.hashemi@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۳/۰۳/۰۵

پذیرش مقاله: ۹۳/۰۶/۱۵

چکیده

هدف: شباهت بیشتر به محیط درون تنی به افزایش تکثیر و تمایز سلول‌ها در شرایط برون تنی کمک می‌کند. در این مطالعه اثر محیط کشت پویا و وجود نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت بر تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوانی با استفاده از داربست‌های الکتروریسی شده پلی‌کاپرولاکتون بررسی شده است. **مواد و روش‌ها:** ابتدا داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌کاپرولاکتون-نانوهیدروکسی آپاتیت به روش الکتروریسی تهیه شد. پس از کشت ایستای داربست‌ها با سلول‌های بنیادی مزانشیمی، داربست‌ها در یک دوره ۱۴ روزه در دو گروه کشت ایستا و پویا تقسیم شدند. داربست‌های کشت پویا روی هم‌زن قرار گرفتند. تکثیر و تمایز سلول‌ها در روزهای ۳، ۷ و ۱۴، با آزمایش‌های MTT، کلسیم و آلکالین فسفاتاز بررسی شد.

نتایج: نتایج به دست آمده از بررسی MTT داربست‌ها در روز ۱۴، افزایش ۱/۱ برابری میزان تکثیر سلول‌ها را در کشت پویا نسبت به ایستا نشان داد. همچنین طی این دوره، میزان کلسیم تولیدی توسط سلول‌ها برای داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌کاپرولاکتون-نانوهیدروکسی آپاتیت در حالت پویا نسبت به ایستا در روز ۱۴، به ترتیب ۱/۲۳ و ۱/۴۶ برابر بود. در بررسی فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز، میزان فعالیت برای داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌کاپرولاکتون-نانوهیدروکسی آپاتیت در حالت پویا نسبت به ایستا در روز ۱۴، به ترتیب ۱/۲۴ و ۱/۲۸ برابر بود. **نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل از کشت پویا، تکثیر و تمایز بیشتر سلول‌های بنیادی به استخوانی را برای هر دو نوع داربست پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌کاپرولاکتون-نانوهیدروکسی آپاتیت نسبت به ایستا نشان داد. همچنین میزان تکثیر و تمایز سلولی در داربست‌های حاوی نانوهیدروکسی آپاتیت بیشتر از داربست‌های بدون آن بود.

کلیدواژگان: الکتروریسی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، پلی‌کاپرولاکتون، نانو هیدروکسی آپاتیت، محیط کشت پویا

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۷، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳، صفحات: ۶۳-۷۳

مقدمه

با وجود توانایی سامانه اسکلت انسانی برای بازسازی خود، ناپیوستگی‌های باقی مانده از شکستگی‌ها، یک چالش عمده بالینی است که سبب می‌شود نیاز به پیوند استخوان برای اصلاح نقص ایجاد شود. بر این اساس، استخوان به دومین پیوند بافت در جهان تبدیل شده است. در حال حاضر، استفاده از بافت‌های پیوندی استخوان از خود بیمار یا هم نوع، پاسخ‌گوی افزایش تقاضای بالینی برای پیوند استخوان نیست. مشکلات اساسی از قبیل دسترسی محدود و جراحات محلی بافت اهدا شده خودی، خطر انتقال عوامل بیماری‌زا با پیوند هم نوع و نبود امکان بازسازی با استفاده از جایگزین‌های مصنوعی وجود دارد. برای برطرف کردن کمبودهای موجود در بافت پیوندی استخوان و برآورده ساختن نیازهای بالینی، راه‌کار مهندسی بافت برای توسعه پیوندهای مهندسی شده بافت استخوان، به منظور دستیابی به ظرفیت بالای ترمیم استخوان دنبال شده است. مهندسی بافت برای تسهیل رشد و ترمیم یا جایگزینی بافت آسیب‌دیده، از ترکیب زیست مواد (Biomaterials) به عنوان داربست، سلول‌ها و مولکول‌های زیست فعال کمک می‌گیرد [۱-۳].

داربست‌های سه‌بعدی، یک سازه حمایتی موقت برای تکثیر سلولی فراهم می‌کند. همچنین سبب تشکیل شبکه برون سلولی (Extra Cellular Matrix: ECM) و به دنبال آن، توسعه رگ‌ها و رشد استخوان، حفاظت از فروپاشی بافت منطقه نقص، تهاجم بافت رشته‌ای و القای تکثیر و تمایز سلول‌های استخوانی می‌شود [۴].

در ساختار داربست‌های مهندسی بافت، استفاده از فناوری نانو الیاف اهمیت به‌سزایی پیدا کرده و پژوهشگران به روش‌های ساخت داربست با ساختار نانو روی آورده‌اند. ساختار نانو الیاف، خواصی چون نسبت سطح به حجم و انعطاف‌پذیری بسیار بالا را ایجاد می‌کند. مساحت سطح بسیار بالا، امکان تماس تعداد بیشتری از مولکول‌های سطح را با سلول‌ها فراهم می‌نماید، به گونه‌ای که توانایی بالایی برای اتصال یا رهاسازی

گروه‌های فعال، یون‌ها و انواع مواد در مقیاس نانو ایجاد می‌کند [۴-۶].

یکی از روش‌های تولید داربست در مهندسی بافت، الکتروریسی (Electrospinning) است. الکتروریسی روشی بسیار ساده و ارزان برای تولید داربست با خواص مکانیکی مطلوب و تخلخل بالا است. در این روش محلول پلیمری یا مذاب پلیمر از داخل سرنگ با اعمال فشار توسط پمپ، روی سطح جمع‌کننده پاشیده می‌شود. با استفاده از دو الکترود و با اعمال یک ولتاژ بالا بین سوزن سرنگ یا نازل و صفحه جمع‌کننده، حلال پلیمر تبخیر شده و روی صفحه جمع‌کننده، داربست متخلخلی از پلیمر شکل می‌گیرد. قطره پلیمری در هنگام خروج از سوزن، به دلیل ولتاژ بالا به صورت رشته کشیده می‌شود. بار الکتریکی سبب کشیده شدن قطره خروجی می‌شود [۶-۹].

پلی‌کاپرولاکتون (Polycaprolactone: PCL) پلیمری زیست سازگار (Biocompatible) با نقطه ذوب پایین، حدود ۶۰ درجه سانتی‌گراد است. برای افزایش زیست سازگاری، آن را با موادی چون نشاسته و هیدروکسی آپاتیت (Hydroxyapatite: HA) ترکیب می‌کنند تا قیمت آن کاهش یافته و زیست تخریب‌پذیری (Biodegradability) آن افزایش یابد. آب‌گریزی از خواص منفی PCL است، اما در اثر آب‌کافت (Hydrolysis) اتصال‌های استری در داخل بدن، می‌تواند تخریب شود. داربست‌های ساخته شده از PCL، خواص مطلوبی را برای تحمل بار در کاربردهای مهندسی بافت استخوان نشان می‌دهد. آن‌ها با سرعت آهسته‌تر تخریب شده، شدت واکنش تخریب ساختاری تنها ۷ درصد طی یک دوره شش ماهه در شرایط درون تنی (In vivo) دارد و حمایت مکانیکی را برای یک دوره حفظ می‌کند. HA ماده معدنی است که در ترکیب بافت استخوان وجود دارد. نانوهیدروکسی آپاتیت (Nano-Hydroxyapatite: nHA) سبب افزایش استحکام نانو الیاف PCL، بهبود خواص مکانیکی، زیست‌سازگاری، افزایش سرعت تخریب و همچنین تحریک

استخوان سازی می شود [۷، ۸].

تنش های موجود در محیط کشت، نقش مهمی در توسعه بافت بازی می کند. افزایش انتقال جرم و نفوذپذیری مواد و ایجاد یکنواختی در محیط کشت از مزایای وجود جریان در محیط کشت است. به طور معمول تنها تعداد کمی از سلول ها از نمونه گیری به دست می آید. تکثیر سلول ها اغلب با تمایز نیافتن آن ها همراه است. ظروف کوچک کشت [به عنوان مثال، ظروف کشت ۲۴ خانه ای و تی - فلاسک (T-Flask)] به طور کلی برای توسعه سلولی استفاده می شود. این دستگاه ها تنها اجازه افزایش تعداد سلول ها را تا حدود ۱۰ برابر می دهد که برای این تعداد نیز چندین پاساژ (Passage) سلولی مورد نیاز است. این به عنوان یک دلیل عمده در تمایز نیافتن سلول ها در نظر گرفته شده است. ایجاد تنش در محیط کشت، سبب افزایش تمایز سلولی نیز می شود. در کشت ایستا تمایز سلولی بعد از گذشت زمان محدودی کاهش می یابد ولی با ایجاد جریان در محیط کشت، میزان تمایز سلولی در طول زمان افزایش می یابد. جریان سیال سبب وارد شدن تنش برشی بر سطح سلول های بنیادی، استئوبلاست ها (Osteoblasts) و استئوسیت ها (Osteocytes) می شود که در نتیجه آن، پیام های زیست شیمیایی (Biochemicals) به هسته سلول ها منتقل می شود. پاسخ سلول ها به تنش های برشی، سبب افزایش تکثیر و تمایز سلولی و تشکیل استخوان می شود. این فرآیند به طور دقیق شناخته شده نیست. از پیام های شناخته شده در این فرآیند که سبب تمایز استخوانی می شود، می توان به نیتریک اکسید (Nitric Oxide) و پروستاگلاندین ها (Prostaglandins) اشاره کرد [۹-۱۲].

زیست واکنشگاه ها (Bioreactors) انتقال مواد غذایی را افزایش و سلول ها را در معرض تنش برشی سیال قرار می دهند. یکی از جنبه های مهم سامانه های زیست واکنشگاهی، توانایی ایجاد شرایط محیطی برون تنی (In vitro) بسیار مشابه با شرایط درون تنی برای استخوان است [۱۳-۱۵].

هدف از این پژوهش، بررسی اثر وجود نانو ذرات HA در داربست های نانو الیاف PCL بر تمایز و گسترش سلولی بود.

همچنین اثر وجود جریان در محیط کشت، ناشی از به هم خوردن محیط، به عنوان یک عامل بهبود دهنده تمایز و گسترش سلولی نیز بررسی شد.

مواد و روش ها

مواد اولیه

در این پژوهش، برای کشت سلول ها از محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (شرکت ایده زیست نو ترکیب، ایران) به همراه سرم جنینی گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) (شرکت GIBCO، آمریکا) استفاده شد. از PCL و nHA (شرکت Sigma-Aldrich، آلمان) برای تولید داربست ها استفاده شد. از آسکوربیک اسید (Ascorbic Acid)، بتا گلیسرول فسفات (β -Glycerol Phosphate) و دکزامتازون (Dexamethasone) (شرکت 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 گلیکول تترا استیک اسید (Ethylene Glycol Tetraacetic Acid: EGTA) و اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (Ethylenediaminetetraacetic Acid: EDTA) (شرکت Sigma-Aldrich، آلمان) برای تهیه محلول ریپا (Radio Immunoprecipitation Assay: RIPA) استفاده شد. در این پژوهش، از سلول های بنیادی مغز استخوان انسان بالغ، جداسازی شده در شرکت بن یاخته و تأیید شده توسط کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به شماره نامه ۵۲/د/۷۴۷ مورخ ۹۴/۲/۶ استفاده شد. سلول های مورد نظر تا پاساژ سوم به منظور تأمین سلول ها به اندازه مورد نیاز تکثیر داده شدند.

تولید داربست و اصلاح سطحی آن

داربست های مورد استفاده از PCL به تنهایی یا به همراه

کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر روی داربست‌ها

سلول‌های بنیادی بعد از پاساژ ۴ روی لایه‌های داربست نانو الیاف PCL و PCL-nHA، به صورت مجزا قرار گرفت. بدین منظور ۵۰ میکرولیتر تعلیق سلولی حاوی 3×10^4 سلول در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS روی داربست‌ها، درون ظروف ۲۴ خانه‌ای کشت ریخته شد. برای چسبیدن سلول‌ها به سطح داربست، داربست‌ها به مدت ۱ ساعت درون گرمخانه (Incubator) ۳۷ درجه سانتی‌گراد ۵ درصد CO_2 قرار گرفت. پس از گذشت ۱ ساعت، به هر یک از داربست‌های سلول‌دار، ۱ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS اضافه شد. داربست‌ها برای چسبندگی بهتر سلول‌ها، ۲۴ ساعت درون گرمخانه ۵ درصد CO_2 قرار گرفت.

کشت ایستا و پویای داربست‌ها

برای بررسی اثر تنش روی کشت سلولی، داربست‌های نانو الیاف به دو گروه کشت پویا و ایستا دسته‌بندی شد. داربست‌ها درون ظروف ۱۲ خانه‌ای قرار گرفت. روی هر یک از داربست‌ها، ۱/۵ میلی‌لیتر محیط کشت 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) ریخته شد. برای بررسی اثر تنش در کشت پویا، داربست‌ها روی همزن (Shaking N-Biotec Incubator، کره جنوبی) با سرعت ۳۰ دور بر دقیقه درون گرمخانه CO_2 قرار گرفت. نمونه‌های شاهد در کشت ایستا، به صورت مشابه درون ظروف ۱۲ خانه‌ای با محیط تمایزی روی قفسه‌های گرمخانه ۵ درصد CO_2 قرار گرفت.

بررسی تکثیر سلول‌ها

به منظور بررسی میزان تکثیر سلول‌ها روی داربست‌ها، در دو گروه پویا و ایستا، آزمون MTT انجام گرفت. بعد از برداشتن

nHA تهیه شد. برای تولید داربست‌های نانو الیاف از سامانه الکتروریسی (آزمایشگاهی، نانوفناوران، ایران) موجود در شرکت بن‌یاخته استفاده شد. برای تهیه داربست‌های نانو الیاف PCL-nHA و PCL از روش الکتروریسی تصادفی استفاده شد. برای تولید داربست به روش الکتروریسی، متغیرها و عوامل مؤثر، به این ترتیب تنظیم شد: ولتاژ کاربردی ۲۰ کیلوولت، فاصله نازل تا صفحه جمع‌کننده ۱۵ سانتی‌متر، شدت جریان خروجی محلول ۰/۴ میلی‌لیتر بر ساعت، سرعت جمع‌کننده ۳۰۰ دور بر دقیقه و زاویه پاشش نسبت به افق ۴۵ درجه. ابتدا محلولی از PCL در کلروفرم و دی‌متیل فرماید (Dimethylformamide: DMF) با نسبت ۷۵ به ۲۵، بدون یا به همراه nHA، به صورت جداگانه تهیه شد. محلول پلیمری مورد نظر، درون سرنگ‌های دستگاه الکتروریسی قرار گرفت و بعد از حدود ۶ ساعت، صفحه نانو الیافی مورد نظر آماده شد. داربست‌ها به قطر ۱/۵ سانتی‌متر برش زده شد. داربست‌های پلیمری PCL به دلیل آب‌گریز بودن، دارای سطح مناسبی برای چسبندگی سلول‌ها نیست. به منظور بهبود سطح و افزایش چسبندگی سلول‌ها به سطح داربست، از پلاسمای گاز اکسیژن بهره گرفته شد. اصلاح سطحی با پلاسما، سبب افزایش اتم‌های اکسیژن باردار در سطح می‌شود. در این روش، داربست درون یک واکنشگاه (Reactor) استوانه‌ای کوارتزی [نانو UHP، دینر (Diener)، آلمان] با گاز اکسیژن خلوص بالا و فشار ۰/۴ میلی‌بار اصلاح سطح شد.

بررسی شکل ظاهری داربست‌های نانو الیاف

تولیدی

شکل‌شناسی نانو الیاف تولیدی و تعیین قطر الیاف، توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning Electron Microscope: SEM) (Philips) دانشکده فنی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. همچنین بررسی میزان توزیع ذرات nHA با تصاویر به دست آمده انجام گرفت. برای تصویربرداری با SEM روی داربست‌ها پوشش‌دهی با لایه نازکی از طلا انجام گرفت.

محیط کشت تمایزی از روی داربست‌ها، محلول ۱ درصد MTT [۵ میلی گرم تترازولیوم برماید (Tetrazolium Bromide) در محلول بافر فسفات (Phosphate Buffered Saline: PBS) به همراه محیط کشت DMEM به میزان ۵۰۰ میکرو لیتر به هر داربست اضافه شد. داربست‌ها به مدت ۳ ساعت درون محیط تاریک گرمخانه ۵ درصد CO₂ قرار گرفت. پس از اتمام فرآیند، محلول MTT خارج شده و برای حل کردن بلورهای فورمازان (Formazan)، از محلول آلی دی‌متیل سولفوکسید (Dimethyl Sulfoxide: DMSO) استفاده شد. میزان کدورت محلول به دست آمده در طول موج ۵۴۵ نانومتر توسط دستگاه قرائت گر الایزا (ELISA Reader) اندازه‌گیری شد.

بررسی تمایز سلول‌ها به استخوان

آزمایش رسوب کلسیم

کلسیم تولید شده توسط سلول‌ها، به صورت رسوب روی داربست‌ها تشکیل می‌شود. برای بررسی میزان کلسیم تولیدی، از محلول تجاری شرکت پارس آزمون [حاوی کرسولفتالین (Cresolphthalein)] استفاده شد. ابتدا داربست‌های هر دو دسته 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، داربست‌ها توسط اسیدکلریدریک ۰/۶ نرمال شسته شد. سپس ۲۰ میکرو لیتر از این محلول به ۲۰۰ میکرو لیتر از محلول کیت اضافه شد. کدورت محلول در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. با توجه به این که 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 شد و از مقدار جذب داربست‌های PCL-nHA حاوی سلول کسر شد.

اندازه‌گیری فعالیت آلکالین فسفاتاز

آلکالین فسفاتاز (Alkaline Phosphatase: ALP) یکی

از مهم‌ترین فنوتایپ‌های (Phenotypes) سلول‌های استخوان ساز است. بنابراین توان استخوان‌سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی روی داربست‌ها، از طریق بررسی فعالیت آلکالین فسفاتاز ارزیابی شد. میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در روزهای ۶ و ۱۴ با استفاده از کیت ALP 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 شد 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 آلکالین فسفاتاز، ابتدا ۲۵۰ میکرو لیتر محلول RIPA به سلول‌های روی داربست‌ها اضافه شد. سپس ظرف یاد شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شد. از محلول رویی، ۱۰ میکرو لیتر برداشته و به ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول کیت اضافه شد. در کیت ALP، آنزیم آلکالین فسفاتاز، واکنش تبدیل پارا-نیترو فنیل فسفات (P-Nitrophenylphosphate) بی‌رنگ را به پارا-نیترو فنیل زرد رنگ کاتالیز می‌کند. با اندازه‌گیری میزان جذب نوری نیترو فنیل تشکیل شده در طول موج ۴۰۵ نانومتر، مقدار آلکالین فسفاتاز تعیین می‌شود.

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

کشت پویای سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر الیاف الکتروریسی شده PCL و PCL-nHA

تصاویر SEM، قرار گرفتن تصادفی نانو الیاف را نشان می‌دهد. ساختار داربست متخلخل و قطر الیاف در محدوده ۲۰۰-۵۰۰ نانومتر است.

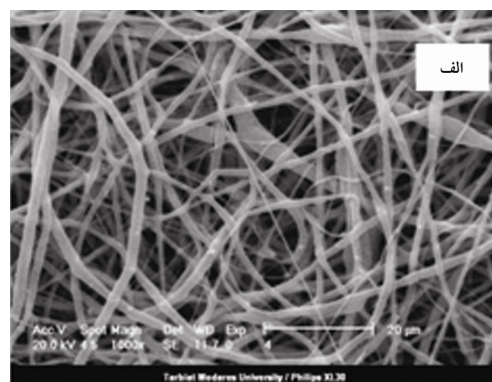
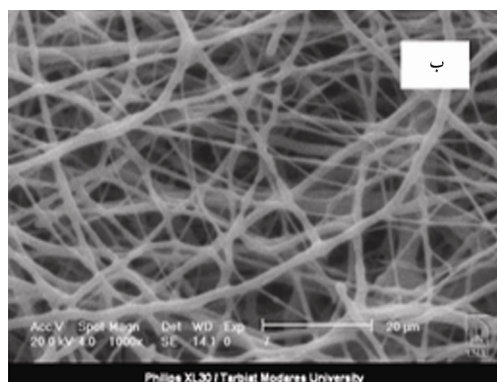
داربست‌های تولید شده با روش الکتروریسی در این پژوهش، دارای سطحی یکنواخت و بدون پاشش قطره‌های بزرگ محلول پلیمری روی سطح است که سطوحی کاملاً یکنواخت را برای چسبندگی و نفوذ سلول‌های بنیادی مزانشیمی در تمامی لایه‌ها فراهم می‌کند. همچنین در شکل ۱ کلوخه نشدن نانو ذرات HA در طول نانو الیاف مشاهده می‌شود که می‌توان توزیع یکنواخت نانو ذرات را در طول نانو الیاف نتیجه گرفت.

۰/۰۵ معیار اختلاف معنی‌دار پاسخ گروه‌ها در آزمایش‌ها در نظر گرفته شد. باید به این نکته اشاره کرد که مقایسه بین گروه‌های ایستای PCL با PCL-nHA، پویا با ایستای PCL و nHA و پویا با ایستای PCL صورت گرفت.

نتایج

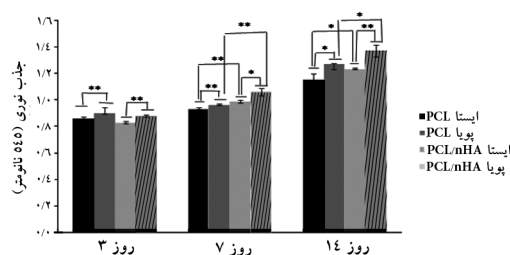
بررسی تصاویر SEM

داربست‌های PCL و PCL-nHA به صورت جداگانه، به کمک روش الکتروریسی تولید شد. به منظور مشاهده ساختار داربست‌ها، تصاویر SEM از آن‌ها تهیه شد (شکل ۱).



شکل ۱ تصاویر SEM داربست: الف) PCL-nHA، ب) PCL

بیانگر این است که کشت پویا و ایستا دارای توانایی ایجاد شرایط مناسب برای تکثیر سلول‌ها است.

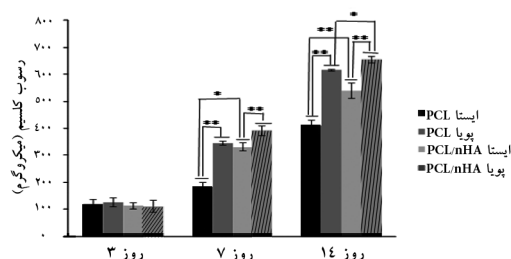


شکل ۲ نتایج حاصل از آزمون MTT روی داربست‌های تک لایه PCL و PCL-nHA در کشت ایستا و پویا (ظروف ۱۲ خانه‌ای) (*: $P < 0.05$ و **: $P < 0.01$)

بررسی تکثیر سلولی

اولین عامل در بررسی زیست‌سازگاری داربست‌ها، ارزیابی زنده بودن و تکثیر سلول‌ها در شرایط ایستا و پویا است. برای بررسی شرایط زیست‌سازگاری سلول‌ها، از آزمایش MTT [3-3-bromide] استفاده شد. نتایج به دست آمده در کشت‌های ایستا و پویا در شکل ۲ نشان داده شده است. بررسی زنده بودن سلول‌ها و تکثیر آن‌ها در حالت ایستا، به عنوان آزمون شاهد انجام گرفت. میزان جذب نوری محلول فورمازان در این آزمون، معیاری برای اثبات وجود میزان سلول‌های زنده بر داربست‌ها است. روند افزایش این مقدار روی داربست‌ها،

میزان رسوب کلسیم است. برای محاسبه میزان تولید یون کلسیم در فرآیند تمایز سلولی، کدورت محلول اندازه‌گیری شد. مقدار کلسیم تولیدی برای داربست‌ها در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ محاسبه شد. در طول دوره ۱۴ روزه، همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، میزان رسوب‌های کلسیم‌دار روی داربست‌ها در دو حالت کشت افزایش پیدا کرد.



شکل ۳ نتایج میزان رسوب کلسیم در داربست‌های تک لایه PCL و PCL-nHA در دو حالت ایستا و پویا (داخل ظروف ۱۲ خانه‌ای) (*: $P < 0.05$ و **: $P < 0.01$)

در طول دوره ۱۴ روزه، مقدار کلسیم در کشت پویا بیشتر از مقدار آن در کشت ایستا برای هر دو نوع داربست است. اختلاف معنی‌داری در میزان تشکیل رسوب کلسیم در روز سوم روی داربست‌ها پس از افزودن محیط تمایزی، مشاهده نمی‌شود. در روز هفتم پس از کشت، این میزان اختلاف در داربست‌های پویا نسبت به حالت ایستا، دارای اختلاف معنی‌داری است که نشان دهنده تأثیر جریان سیال در محیط کشت است ($P < 0.01$). همچنین در این روز، داربست‌های PCL حاوی nHA، تمایز بیشتری نسبت به داربست‌های PCL نشان داد ($P < 0.05$). در روز ۱۴ پس از کشت، داربست‌های پویا نسبت به حالت ایستا تمایز بیشتری از خود نشان داد و در این روز رسوب کلسیم بیشتری در داربست‌های حاوی nHA تشکیل شد ($P < 0.01$). همچنین باید به این نکته اشاره کرد که میزان تشکیل رسوب در داربست PCL-nHA در حالت پویا بیشتر از حالت پویای داربست PCL ($P < 0.05$) و ایستای داربست‌های PCL و PCL-nHA ($P < 0.01$) است.

نتایج برای روزهای ۳، ۷ و ۱۴ پس از کاشت گزارش شد. در روز ۳ پس از کاشت در دو حالت کشت و در تمامی داربست‌ها، کدورت خوانده شده برای تمامی گروه‌ها تقریباً یکسان است. میزان افزایش کدورت خوانده شده در کشت پویا نسبت به کشت ایستا، در مقایسه جداگانه از داربست‌های PCL و PCL-nHA به میزان ($P < 0.01$) معنی‌دار بود. این مقدار برای تمامی گروه‌ها در هر دو حالت در روز ۷ افزایش داشته که نشانه گسترش سلولی است. ولی این مقدار افزایش برای گروه‌های پویا در مقایسه با نمونه‌های کشت ایستا اندکی بیشتر بود. میزان اختلاف خوانده شده برای روز هفتم کشت پویا نسبت به ایستا برای داربست‌های PCL معنی‌دار است ($P < 0.01$) و درجه معنی‌دار بودن برای داربست‌های PCL-nHA به میزان ($P < 0.05$) است. در روز هفتم در مقایسه داربست‌های نانو الیاف حاوی nHA و بدون آن، مشاهده شد که میزان گسترش سلولی روی داربست‌های حاوی nHA بیشتر از داربست‌های بدون nHA است ($P < 0.01$).

مقدار کدورت اندازه‌گیری شده داربست‌ها ۱۴ روز بعد از کشت، نشان دهنده تکثیر و گسترش بیشتر سلول‌ها در حالت پویا نسبت به حالت ایستا است. افزایش کدورت برای داربست‌های در حالت پویا، بیان‌کننده تکثیر و گسترش بیشتر سلول‌ها روی داربست‌های درون آن است. باید به این نکته اشاره کرد که میزان گسترش سلولی روی داربست‌های PCL-nHA در حالت پویا در روز ۱۴ نیز نسبت به سایر داربست‌های پویا (داربست PCL) و ایستا بیشتر بود که می‌توان به تأثیر مثبت دو عامل هیدروکسی آپاتیت در ترکیب داربست و تنش برشی ایجاد شده در حالت پویا مرتبط دانست. همچنین تمامی نتایج به‌دست آمده برای بررسی گسترش سلولی، نشان دهنده گسترش بیشتر سلول‌ها در حالت پویا نسبت به حالت ایستا است.

رسوب مواد معدنی کلسیم

یکی از شاخص‌های تمایز سلول‌های بنیادی به استخوانی،

غذایی و اکسیژن می‌شود و در افزایش رشد سلولی اهمیت زیادی دارد.

به‌منظور بررسی اثر تنش، ارزیابی میزان توسعه و تکثیر سلولی، اهمیت به سزایی دارد. باید به این نکته اشاره کرد که میزان نفوذپذیری اکسیژن به‌عنوان یک عامل حیاتی برای زنده ماندن سلول‌ها، به میزان ۱۰۰-۲۰۰ میکرومتر است [۱۱]. همچنین باید به این نکته اشاره کرد که در کشت پویا، نفوذپذیری مواد مغذی و پسماندها درون لایه‌های داربست نیز باید افزایش پیدا کند. نتایج حاصل از بررسی زیست‌سازگاری داربست‌های حاوی سلول، تأثیر مثبت محیط جریان‌دار را در انتقال مواد مغذی و اکسیژن، نسبت به حالت ایستا نشان می‌دهد. از آنجایی‌که سلول‌های قرارگرفته در روز صفر (لحظه کاشت) روی تمامی لایه‌های داربست‌ها مساوی بودند، مقایسه این سلول‌ها در روزهای بعدی در دو حالت کشت، نشان‌دهنده قدرت تکثیر سلول‌ها در کشت پویا و ایستا است.

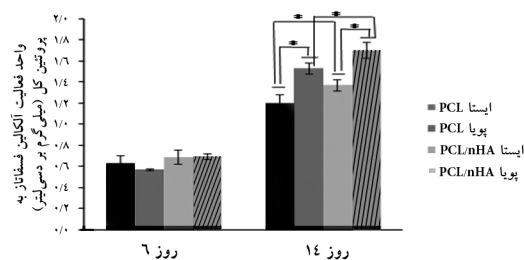
دو عامل وجود جریان در محیط کشت و حضور نانو ذرات HA که یک عامل تمایزی است، اثر تحریکی بر تمایز استخوانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی را افزایش می‌دهد. افزایش یون کلسیم خارج سلولی، نقش حیاتی در تنظیم تکثیر و تمایز استئوبلاست‌ها ایفا می‌کند، به این ترتیب که افزایش تمایز به استئوبلاست‌ها در حضور غلظت اضافی یون کلسیم در محیط کشت صورت می‌گیرد.

یکی دیگر از شاخص‌های بررسی تمایز سلول‌های بنیادی به استخوانی، اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز است. آنزیم آلکالین فسفاتاز استرهای فسفات را آب‌کافت کرده و غلظت فسفات محلی را افزایش می‌دهد. افزون بر این، سبب افزایش معدنی شدن شبکه برون سلولی می‌شود. میزان تشکیل آنزیم در داربست PCL-nHA در حالت پویا به دلایل وجود تنش و جریان در محیط کشت نسبت به حالت ایستای PCL-nHA و وجود nHA که یک عامل تمایزی است، نسبت به حالت PCL پویا بیشتر است.

نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های فعالیت آلکالین فسفاتاز و رسوب ماده معدنی کلسیم، افزایش تمایز سلول‌ها را در محیط

فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز

مقدار آنزیم تولیدی برای داربست‌ها در روزهای ۶ و ۱۴ محاسبه شد. در طول دوره ۱۴ روزه، همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است، میزان آنزیم تولیدی توسط سلول‌ها در هر دو حالت کشت افزایش پیدا کرد. در روز ۶ پس از کشت، اختلاف معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم مشاهده نمی‌شود. در روز ۱۴ پس از کشت، میزان فعالیت آنزیم در داربست‌های پویا بسیار بیشتر از کشت ایستاست ($P < 0.01$). همچنین باید به این نکته اشاره کرد که داربست ایستای PCL-nHA دارای فعالیت آنزیمی بیشتری نسبت به داربست PCL است ($P < 0.01$). در طول دوره ۱۴ روزه، مقدار فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در کشت پویا بیشتر از مقدار آن در کشت ایستا برای هر دو نوع داربست PCL و PCL-nHA بود (شکل ۴).



شکل ۴: نتایج فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در داربست‌های تک لایه PCL و PCL-nHA در دو حالت ایستا و پویا (داخل ظروف ۱۲ خانه‌ای) ($P < 0.01$; *).

بحث

داربست‌های PCL و PCL-nHA به روش الکتروریسی تهیه شد. تصاویر SEM ساختار نانو الیافی داربست‌ها را تأیید می‌کند. با توجه به تصویر SEM حفره‌ها و تخلخل‌های داربست در اندازه میکرو بوده‌است. وجود ساختار نانو الیافی سبب افزایش نسبت سطح به حجم می‌شود و این عامل سبب بهبود سطح برای چسبندگی سلول‌ها روی داربست و تولید یک داربست مناسب برای مهندسی بافت می‌شود. وجود تخلخل بالا در ساختار داربست نانو الیاف، سبب تسهیل در انتقال مواد

جریان‌دار نسبت به حالت ایستا نشان می‌دهد. وجود تنش در محیط کشت، سبب افزایش تشکیل بلور کلسیم و فعالیت ALP در داربست‌های PCL و PCL-nHA نسبت به حالت ایستای داربست‌ها شده است. همچنین در بررسی آزمون‌های تمایزی، تأثیر مثبت ذرات nHA در ترکیب داربست PCL-nHA نسبت به داربست‌های PCL نشان داده شده است.

ژانگ و همکارانش [۹] به نتایج مشابهی مبتنی بر افزایش فعالیت استخوان‌سازی با بیان ALP درون زیست‌واکنشگاه‌ها دست یافتند. افزایش فعالیت ALP، نشان‌دهنده تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان بر سطح لایه‌های داربست‌ها است. با توجه به این‌که بیشتر بافت‌های بدن، تحت تنش‌های خاصی قرار دارد و این تنش‌ها بر تمایز سلول‌های بنیادی به بافت مورد نظر تأثیرگذار است، می‌توان نتیجه گرفت که تنش‌های برشی موجود در محیط کشت، تأثیرگذاری به سزایی در تحریک و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوانی دارد.

ژانگ و همکاران [۱۰] در بررسی‌های مشابه کشت سلول‌های بنیادی بر داربست‌های سه‌بعدی درون زیست‌واکنشگاه چرخان دو محوری در مقایسه با کشت ایستا، افزایش بیان فعالیت آنزیم ALP را در طی دوره مشابه نشان دادند. همچنین در بررسی‌های مشابه برای تمایز استخوانی، میزان کلسیم رسوبی طی دوره ۲۸ روزه به میزان قابل ملاحظه‌ای نسبت به حالت ایستا افزایش پیدا کرده بود. ژانگ اثر این افزایش را در وجود جریان زیست‌واکنشگاه دانسته که این عامل سبب بهبود جریان سیال در داربست می‌شود و همچنین تنش‌های برشی حاصل از این نوع جریان سیال، تمایز سلولی را نسبت به حالت ایستا افزایش می‌دهد.

منابع

گلدشتاین (Goldstein) و همکارانش [۱۶] در مقایسه‌ای از انواع زیست‌واکنشگاه‌ها با هم و با کشت ایستا نشان دادند که میزان ALP تولیدی در محیط کشت جریان‌دار درون زیست‌واکنشگاه‌ها بیشتر از حالت ایستا است. میزان گسترش سلولی در این پژوهش، طی ۱۴ روز نتایج مشابهی را نشان می‌دهد. گلدشتاین این افزایش تعداد سلول‌ها را در کشت پویا نسبت به حالت ایستا به دلیل بهبود انتقال مواد مغذی به داخل داربست دانسته است. هدف این گروه از پژوهشگران، به حداکثر رساندن میزان گسترش سلولی و تمایز آن به فنوتیپ استخوانی بوده که این امر در زیست‌واکنشگاه‌های پرفیوژن و فلاسک همزن‌دار نسبت به حالت ایستا محقق شده است.

در این پژوهش، تأثیر تنش بر کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی روی داربست‌های نانو الیاف PCL و PCL-nHA بررسی شد و میزان اثرگذاری جریان در محیط کشت (ناشی از به هم خوردن محیط) بر تمایز و زنده ماندن سلول‌ها مطالعه شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که وجود جریان در محیط کشت، سبب بهبود تکثیر و تمایز سلولی می‌شود. همچنین می‌توان نتیجه گرفت که برای افزایش میزان گسترش سلولی می‌توان از دو عامل جریان محیط کشت و مواد تحریک کننده تمایز مانند نانو ذرات HA استفاده کرد تا میزان سرعت تمایز سلولی را افزایش داد.

تشکر و قدردانی

لازم می‌دانیم که از حمایت و همکاری شرکت بن‌یاخته در اجرای این پژوهش تشکر و قدردانی نماییم.

[1] Zhang ZY, 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] 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.
- [4] Yeatts AB, Fisher JP. Bone tissue engineering bioreactors: dynamic culture and the influence of shear stress. *Bone* 2011; 48(2): 171-81.
- [5] Venugopal J, Zhang YZ, Ramakrishna S. Fabrication of modified and functionalized polycaprolactone nanofibre scaffolds for vascular tissue engineering. *Nanotechnology* 2005; 16(10): 2138-42.
- [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, Tehran: Tarbiat Modares University, 2012. (Persian)
- [8] Mohammadyar F. Scaffold manufacturing using PCL nanofibers coated by fibronectin and nHA for bone repairing using mesenchymal cells. M.Sc. Thesis, Tehran: Tarbiat Modares University, 2012. (Persian)
- [9] Zhang ZY, Teoh SH, Teo EY, Khoo Chong MS, Shin CW, Tien FT, Choolani MA, Chan JK. A comparison of bioreactors for culture of fetal mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2010; 31(33): 8684-95.
- [10] 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.
- [11] Pörtner R, Nagel-Heyer S, Goepfert C, Adamietz P, Meenen NM. Bioreactor design for tissue engineering. *J Biosci Bioeng* 2005; 100(3): 235-45.
- [12] Janssen FW, Oostra J, Oorschot Av, van Blitterswijk CA. A perfusion bioreactor system capable of producing clinically relevant volumes of tissue-engineered bone: in vivo bone formation showing proof of concept. *Biomaterials* 2006; 27(3): 315-23.
- [13] Kim JW, Kim SY, Park SY, Kim YM, Kim JM, Lee MH, Ryu HM. Mesenchymal progenitor cells in the human umbilical cord. *Ann Hematol* 2004; 83(12): 733-8.
- [14] Korossis SA, Bolland F, Kearney JN, Fisher J, Ingham E. Bioreactors in Tissue Engineering. In: Ashammakhi N, Reis RL. *Topics in Tissue Engineering*. Volume 2, 2005; p: 145-54.
- [15] Wei G, Ma PX. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2004; 25(19): 4749-57.
- [16] Goldstein AS, 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.