

Designing Nanofiber Multilayer Composite Scaffolds and Lyophilized Blood Growth Factors in the Process of Osteogenesis

Mahdieh Ghiasi¹,
Mohammad Mehdizadeh²,
Liela Khatib shad³

¹ PhD in Tissue Engineering, Iranian Tissue Bank and Research Center, Gene, Cell and Tissue Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Associate Professor, Dental and Oral Research Center, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran

³ MSc in Pure Chemistry, Iranian Tissue Bank and Research Center, Gene, Cell and Tissue Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received January 29, 2022 ; Accepted May 24, 2022)

Abstract

Background and purpose: Tissue engineering and cell therapy, as promising therapies, provide the opportunity to repair bone lesions and defects. Combined scaffolds, synthetic and natural polymers can provide a suitable structure for differentiation of Wharton Jelly mesenchymal stem cells (WJ-MSCs) into bone. In current study, the effect of lyophilized blood growth factors in promoting the process of osteogenesis is important.

Materials and methods: In this study, PCL-Gel nanofiber scaffolds were prepared by electrospinning method. To prepare membrane, blood was collected from volunteers and its growth factors were extracted and loaded on nanofiber layers. They were then placed in a freezer at -20°C for three days and finally in a freezer for 48 hours. They were structurally examined by electron microscopy and sterilized by gamma rays. WJ-MSCs were then cultured on scaffolding. MTT and Real-Time PCR tests were performed to evaluate cell viability and expression of ALP, RUNX2, COLX, and COLI genes in the designed scaffold.

Results: Findings showed that the viability, growth, proliferation, and the expression of WJ-MSCs and osteogenic-specific genes were significantly higher at high concentration of blood derived growth factors/ polycaprolactone /gelatin-scaffold combination ($P < 0.001$).

Conclusion: High concentration of blood derived growth factors in designed scaffolds facilitated the osteogenesis process.

Keywords: polycaprolactone/gelatin, blood-derived growth factors, bone, Wharton Jelly mesenchymal stem cells

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32 (210): 1-12 (Persian).

Corresponding Author: Mahdieh Ghiasi - Iranian Tissue Bank & Research Center, Gene, Cell & Tissue Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. (E-mail: mahdieh.ghiasi@yahoo.com)

طراحی داربست های ترکیبی چند لایه نانوفیبری و فاکتورهای رشد خونی لیوفیلیزه در فرآیند استئوژنز

مهدیه قیائی^۱

محمد مهدیزاده^۲

لیلا خطیب شاد^۳

چکیده

سابقه و هدف: مهندسی بافت و سلول درمانی به عنوان درمان های امیدوار کننده، این امکان را جهت ترمیم ضایعات و نقایص استخوانی می تواند فراهم نماید. داربست های ترکیبی، پلیمرهای سنتتیک و طبیعی می توانند بستر مناسبی برای WJ- MSCs به سلول های استخوانی را فراهم سازند. در این مطالعه تاثیر فاکتورهای رشد خونی لیوفیلیزه در پیشبرد فرآیند استئوژنز حائز اهمیت می باشد.

مواد و روش ها: ابتدا داربست های نانولیفی PCL-Gel با روش الکترورسی تهیه و همچنین برای تهیه غشا، از افراد داوطلب خون جمع آوری و فاکتورهای رشد آن استخراج و بر روی لایه های نانو فیبری لود گردید. سپس در فریزر -20°C به مدت ۳ روز و در نهایت فریز دایر به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت و از لحاظ ساختاری با میکروسکوپ الکترونی بررسی و با اشعه گاما استریل گردیدند. در ادامه WJ-MSCs بر روی داربست ها کشت داده شد. به منظور بررسی ماندگاری سلول ها و بیان ژن های ALP، RUNX2، COLX و COLI در داربست طراحی شده آزمون های MTT و Real-Time PCR انجام پذیرفت. **یافته ها:** نتایج حاصل از مطالعه نشان داد ماندگاری و رشد و تکثیر WJ-MSCs و بیان ژن های ویژه استخوانی در غلظت بیش تر ترکیب فاکتورهای رشد مشتق از خون/ داربست پلی کاپرولاکتون / ژلاتین به طور معنی داری بیش تر است ($P < 0.001$).

استنتاج: افزایش غلظت فاکتورهای رشد خونی در داربست های طراحی شده، فرایند استئوژنز را تسهیل کرد.

واژه های کلیدی: پلی کاپرولاکتون / ژلاتین، فاکتورهای رشد خونی، استخوان، سلول های بنیادی مشتق از وارتون ژلی

مقدمه

آلوگرفت ها، زونوگرفت ها و مواد مصنوعی مانند سرامیک، پلیمرها و کامپوزیت ها می باشد (۲).
از آن جا که هر کدام از مواد طبیعی دارای معایب خاصی می باشند، اخیرا داربست های مصنوعی به عنوان جایگزینی برای استخوان آسیب دیده، مورد توجه محققان قرار گرفته اند (۳).

استخوان سالم دارای توانایی منحصر به فردی برای بازسازی خود به خود است. با این حال، اگر بیمار یا ناحیه آسیب دیده بیش از اندازه خاصی باشد، پیوند استخوان برای بازسازی بافت مورد نیاز است (۱). روش های مختلفی برای بازسازی نقایص بافت استخوان بزرگ وجود دارد که شامل پیوند مواد طبیعی مانند استخوان اتولوگ،

E-mail: mahdieh.ghiasi@yahoo.com

مؤلف مسئول: مهدیه قیائی - تهران: دانشگاه علوم پزشکی تهران، مرکز تحقیقات و بانک فرآورده های پیوندی ایران

۱. دکترای مهندسی بافت، مرکز تحقیقات و بانک فرآورده های پیوندی ایران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲. دانشیار، گروه جراحی فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران

۳. کارشناسی ارشد شیمی محض، مرکز تحقیقات و بانک فرآورده های پیوندی ایران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۰/۱۲/۸ تاریخ تصویب: ۱۴۰۱/۳/۳

در حال حاضر، چالش‌های علمی مهندسی بافت استخوان، ایجاد داربست‌های سه بعدی (سه بعدی) زیست تخریب پذیر و زیست سازگارپذیر در اشکال و اندازه‌های مختلف با خواص مکانیکی و تخلخل مطلوب است (۴). نانوالیاف الکتروروسی شده زیست سازگار به علت داشتن نسبت سطح به حجم بالاتر، به طور گسترده‌ای برای تحقیقات در مهندسی بافت استفاده می‌شوند. از میان انواع نانوالیاف‌های الکتروروسی شده زیست سازگار، می‌توان به نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون (PCL) (Polycaprolactone) که دارای خصوصیات مناسب جهت کاربردهای پزشکی به منظور بازسازی بافت‌های سخت و بافت نرم بدن است، اشاره کرد. PCL به دلیل تخلخل و ساختار سه بعدی مناسب و همچنین ویژگی زیست سازگارپذیری و زیست تخریب‌پذیری و تاییدیه FDA در زمینه‌های مختلف پزشکی استفاده می‌شود (۵). ژلاتین (Gel (Gel (Gelatin)) هم یک ماده زیستی طبیعی و یک نوع پروتئین طبیعی با وزن مولکولی بالا است که توسط هیدرولیز اسیدی یا قلیایی کلاژن تولید می‌شود و به دلیل هزینه کم، عدم سمیت سلولی و غیر ایمن زایی، کاربردهای بالقوه در مهندسی بافت و حمل دارو دارند (۶). استفاده ترکیبی از PCL و Gel منجر به تشکیل حامل دارویی قوی و داربست مناسب برای مهندسی بافت شده است. کاربرد PCL، علی‌رغم مزیت‌های بسیار، به علت فقدان سایت‌های شناسایی سلولی سطحی و آب دوستی ضعیف، به دلیل کاهش چسبندگی، تکثیر و تمایز سلولی، محدود می‌باشد. از این رو، ترکیب این پلیمر با پلیمرهای طبیعی مانند Gel در ساخت داربست پیشنهاد می‌گردد که شرایط افزایش تکثیر سلول‌ها را فراهم می‌کند (۷). PCL در محیط فیزیولوژیک بدن، بدون اثرات نامطلوب بر متابولیسم سلولی، می‌تواند به عنوان یک بستر مناسب براس سلول‌های بنیادی عمل نماید (۸). از طرف دیگر، Gel به دلیل دارا بودن سکانس شبه لیگاند بسیاری از اینتگرین‌های سلولی در بهبود اتصال سلول به داربست مؤثر بوده و همچنین دارای ویژگی‌هایی از قبیل

افزایش چسبندگی، مهاجرت، تکثیر و تمایز سلولی است (۹-۱۱). در سال‌های اخیر پلاسمای غنی از فاکتورهای رشد (PRGF) (Plasma rich in growth factors) مشتق شده از خون در پزشکی بازساختی جذابیت بسیاری به دست آورده‌اند. PRGF به خاطر خصوصیات ذاتی و داشتن انواعی از فاکتورهای رشد مانند $TGF\beta 1$ (Transforming growth factor beta 1)، IGF-1 (insulin-like growth factor 1)، PDGR (Platelet-derived growth factor)، VEGF (Vascular endothelial growth factor)، سبب افزایش سرعت ترمیم بافت‌های نرم و سخت و فعالسازی پلاکت‌ها و در نهایت آزادسازی فاکتورهای رشد و سایتوکاین‌ها می‌گردد (۱۲۱۳). علاوه بر این، سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها در فرآیند بهبودی و مسیر تنظیم‌کننده سیستم ایمنی نقش دارند، یعنی $IL-8$ (Interleukin-8)، $IL-1\beta$ (Interleukin 1 beta)، MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1)، MCP-2 (Monocyte chemoattractant protein-3)، MCP-3 (Monocyte chemoattractant protein-3)، RANTES (Regulated upon Activation, Normal و T Cell Expressed and Presumably Secreted) را می‌توان در PRGF فعال اندازه‌گیری کرد. استفاده از فاکتورهای رشد خونی و تشکیل داربست به جهت انجام فرآیند تمایز از اهمیت به‌سزایی در مهندسی بافت دارد و می‌تواند به عنوان یک عامل کمک‌کننده به جهت اصلاح سطح مواد سنتتیک باشد. با توجه به ضرورت بازسازی استخوان در اولین لحظات، هماتوم نامتعادل و تشکیل بافت گرانوله ممکن است باعث تاخیر در ترمیم و عملکرد ناکارآمد استخوان شود. برای جلوگیری از این نتایج نامطلوب، PRGF ممکن است توسط HGF (Human growth factor) موجود در آن مانع تشکیل بافت فیبری و مهار التهاب شود که این عمل با تنظیم عامل پائین دستی nuclear factor-kB، که دخیل در پاسخ التهابی می‌باشد، صورت می‌پذیرد. از سوی دیگر، با فقدان لکوسیت‌ها، میزان عوامل پیش التهابی و

پرو فیرو تیک در محل آسیب، احتمالاً به ایجاد تعادل بافت استخوانی کمک می کنند (۱۶-۱۴). از دیگر عناصر دخیل در مهندسی بافت، سلول های بنیادی مزانشیمی (MSCs (Mesenchymal Stem Cells)) هستند که دارای توانایی خود نوزایی و تمایز به انواع مختلفی از بافت ها بوده و می توان آن ها را از منابع مختلفی جدا نمود (۱۷). از این میان، WJ-MSCs (Wharton's Jelly Mesenchymal Stromal Cells) که سلول های بنیادی ژله وارتون هستند و حالت میانی بین سلول های بنیادی جنینی (Embryonic Stem Cells: ESC) و MSCs های بالغ با حداقل واکنش ایمنی و اثرات تعدیل کننده ایمنی، را نشان می دهند، کاندیدی ایده آل برای مهندسی بافت استخوان به شمار می رود (۱۸). با توجه به اهمیت موضوع، تمرکز مطالعه حاضر بر بررسی WJ-MSCs بر داربست ترکیبی PCL-Gel/PRFM تحت شرایط برون تنی بود.

مواد و روش ها

این مطالعه از نوع تجربی می باشد و به منظور انجام این طرح، کد اخلاق (IR.IAU.Qom.REC.1395.23) از دانشگاه آزاد اسلامی قم دریافت گردید.

جدا سازی، کشت و تکثیر WJ-MSCs

در ابتدا نمونه بند ناف در محلول فسفات بافر سالین (PBS (Phosphate-buffered saline)) حاوی ۱ درصد آنتی بیوتیک پنیسیلین - استرپتومایسین (Pen/Strep (penicillin/streptomycin)) شستشو داده شد و سپس هضم آنزیمی (کلاژناز تیپ ۱ (۰/۰۷۵ درصد)) به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد. پس از آن با محیط α -MEM حاوی ۱۰ درصد FBS (Fetal bovin serum) خنثی و در نهایت با دور rpm ۱۸۰۰ به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفوژ گردیده و رسوب سلولی در محیط کشت α -MEM، حاوی FBS ۲۰ درصد و Pen/Strep ۱ درصد کشت داده شد. سپس در داخل انکوباتور با دمای 37°C و CO_2 ۵ درصد قرار گرفت.

بررسی مارکرهای سطحی WJ-MSCs

مارکرهای CD34، CD44، CD90 و CD105 با روش فلوسایتومتری با دستگاه FACS caliber ساخت شرکت B.D انجام شد.

تمایز WJ-MSCs به سلول های استخوانی (تعیین هویت چند توانی سلول ها)

WJ-MSCs (5×10^4) بر روی داربست ها در پلیت های ۶ خانه با محیط تمایزی شامل α -MEM حاوی ۱۰ درصد FBS، ۱ درصد Pen/Strep، ۲ میلی مولار ال-گلوتامین، ۱۰ میلی مولار بتا-گلیسرول فسفات، ۱۰۰ نانومولار دگزامتازون و ۵۰ میکرومولار آسکوربیک اسید به مدت ۲۱ روز در دمای 37°C و ۵ درصد CO_2 انکوبه شد. برای ارزیابی تمایز، رنگ آمیزی آلیزارین رد به منظور تشخیص ذخایر کلسیمی صورت گرفت.

تمایز WJ-MSCs به سلول های غضروفی (تعیین هویت چند توانی سلول ها)

WJ-MSCs (5×10^4) بر روی داربست ها در پلیت های ۶ خانه با محیط تمایزی حاوی محیط DMEM-High glucose و ۱۰ نانوگرم TGF- β 3، ۱۰ نانوگرم ITS، BMP-6، ۱ میکرومولار دگزامتازون، ۵۰ میکرومولار ۲-فسفوآسکوربات و ۱ درصد Pen/Strep به مدت ۲۱ روز در دمای 37°C و ۵ درصد CO_2 انکوبه شد. ارزیابی تمایز با روش رنگ آمیزی اختصاصی آلسین بلو انجام شد.

ساخت داربست PCL - PRFM

Gel/PCL با نسبت ۳۰:۷۰ در اسید استیک/اسید فرمیک با نسبت ۱:۹ آماده و جهت الکترورسی استفاده شد. نانوالیاف ها در بازه زمانی ۲ ساعت و سرعت 2 ml/h و با چرخش rpm ۲۵۰ ولتاژ KV ۲۵ جمع آوری شد. در مرحله دوم نیز غشا PRFM را تهیه و به لایه های نانوفیبری افزوده می شود. به این ترتیب که ابتدا از هر یک از داوطلین ۲۰ میلی لیتر خون همراه با ماده ضد انعقاد سیترا ته جمع آوری و پس از دو بار سانتریفوژ با

MTT (5 ml/mg) در غلظت‌های مختلفی از PRGF (20%، 50%) با استفاده از دستگاه ELISA Reader در طول موج 570 نانومتر اندازه‌گیری گردید.

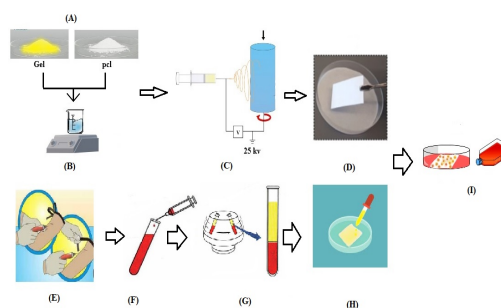
تمایز به سلول‌های استخوان

تمایز WJ-MSCs (5×10^5) در دو غلظت از PRGF به منظور بررسی بیان ژن‌های ویژه سلول‌های استخوانی انجام پذیرفت و پس از گذشت ۲۱ روز، داربست‌های تیمار شده به جهت بررسی بیان ژن‌های وی ژه سلول‌های استخوانی با روش RealTime-PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی بیان ژن‌ها با روش RealTime-PCR

بدین منظور داربست‌های تیمار شده جهت استخراج RNA استفاده شدند. در ابتدا داربست‌ها در ازت مایع خرد شده و سپس RNA ها با استفاده از کیت (Bioneer Co., Daedeok-gu, Daejeon, Korea) و طبق دستورالعمل مربوطه، استخراج گردیدند. RNA ها بلافاصله جهت ساخت cDNA با استفاده از کیت AccPower® RT Premix (Korea., Co Bioneer) مورد استفاده قرار گرفتند و Real-Time PCR از کیت SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Austin, TX, USA) و دستگاه Rotor Gene 6000 Real-Time PCR Machine (Corbett Life Science, Australia) انجام گرفت. در این مطالعه از ژن خانه‌داری مرجع "بتا-اکتین" استفاده شد. پرایمرهای اختصاصی ژن مرجع و ژن‌های موردنظر توسط software, Primer version 3 (Applied Biosystems) Express USA, TX, Austin طراحی شدند (جدول شماره ۱).

سرعت ۱۸۰۰ rpm به مدت ۱۲ min تغلیظ پلاکتی انجام و PRGF تهیه شد. بدین ترتیب که با افزودن 10 CaCl_2 درصد به PRGF بر روی صفحات نانوفیبری داربست چند لایه ترکیبی تشکیل شد. داربست‌ها با استفاده از اشعه UV استریل شدند (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: مراحل ساخت Gel/PCL-PRFM (A) وزن PCL و (B) مخلوط کردن با اسید و همگن سازی، (C) الکتروسی، (D) لایه‌های نانوفیبری، تهیه (E) خونگیری از داوطلبین، (F) تخلیه خون در داخل لوله‌های ۹ ml، (G) سانتریفوژ به مدت ۱۲min و ۱۸۰۰rpm، (H) قرار گیری فلکتورهای رشد مشتق از خون بر روی لایه‌های نانوفیبری و فریز درایر به منظور تشکیل داربست، (I) لود سلول‌های بنیادی ژله وارزون بر روی داربست ترکیبی Gel/PCL-PRFM.

بررسی ساختار داربست با استفاده از میکروسکوپ الکترونی بررسی و مشاهده مورفولوژی ساختار داربست‌ها، با استفاده از دستگاه VEGA/TESCANII ساخت کشور بلژیک موجود در دانشگاه امیر کبیر انجام شد.

تست MTT

MTT یک روش رنگ سنجی برای اندازه‌گیری میزان تکثیر و زنده ماندن سلول‌ها است (۱۹). برای به‌دست آوردن بهترین غلظت جهت تیمار توسط PRGF، WJ-MSCs (1×10^4) بر روی داربست‌ها کشت داده شدند. پس از طی ۳ روز میزان ماندگاری سلول‌ها با

جدول شماره ۱: پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام RealTime-PCR

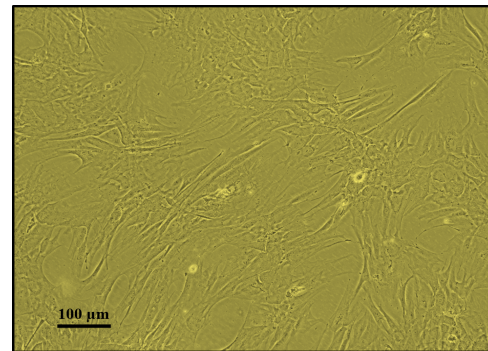
Size of product	Antisense strand	Sense strand	ژن‌ها
114 bp	AGTTTCACAATGTGGCGAG	TGGGGTGGCTTTTAGGATGG	β -actin
136 bp	TGGCAGTCACATGGCAGATT	CTTGGGTGGGTGGAGGATTC	RUNX2
132 bp	TGGTGGACACAGAGTACCTT	GCTGAACGATACCAATGCC	COLX
122 bp	GTCTACACGATCACCTT	CTCTGGAGCATCTGGAGAC	COLI
200 bp	GTACTGGCGAGACCAAGCGCA	AGGGGAACCTGTCCATCTCC	ALP

با استفاده از آنالیز واریانس ANOVA و تست LSD، معنی داری داربست ها بررسی گردید و سطح معنی داری با ارزش $P < 0.05$ مشخص شد.

یافته ها

کشت WJ-MSCs

در بررسی مورفولوژی در زیر میکروسکوپ، این سلول ها دارای ظاهری تقریباً دو کی شکل و فیروبلستی هستند (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۲: بررسی مورفولوژی WJ-MSCs زیر میکروسکوپ نوری معکوس (بزرگمایی ۲۰X)

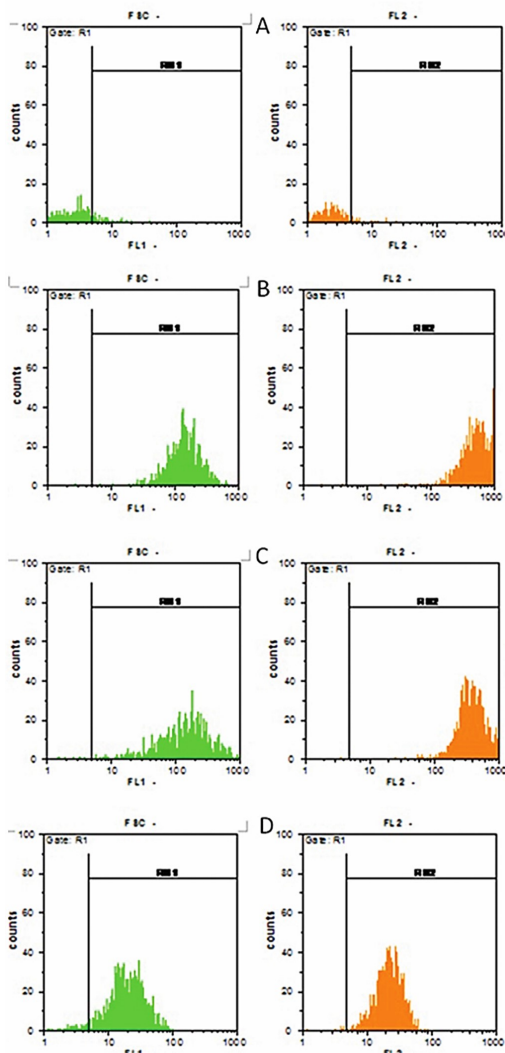
فلوسایتومتری

مارکرهای سلول های بنیادی ژله وارتون به ترتیب شامل (A) CD34، (B) CD44، (C) CD90 و (D) CD105. همان طوری که در تصویر نشان داده شده است، این سلول ها مارکرهای CD44، CD90 و CD105 را که از مارکرهای اختصاصی سلول های بنیادی ژله وارتون هست را بیان نموده اند (نمودار شماره ۱).

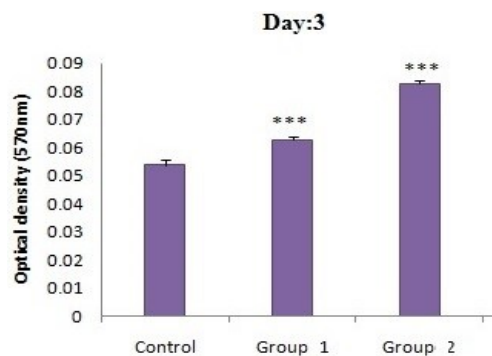
بررسی ساختار داربست های نانولیفی

به منظور بررسی و مشاهده ساختار داربست های الکتروریسی شده، تصاویری از سطح الیاف تهیه

شد (تصویر شماره ۳). در شکل A ابتدا PCL و Gel با روش الکتروریسی تهیه و قطر نانوالیاف با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مشخص شد. در شکل B، داربست های تهیه شده چند لایه مرکب از PCL و Gel و PRFM بر روی هم قرار گرفته و ضخامت هر کدام از صفحات با میکروسکوپ الکترونی نشان داده شده است.



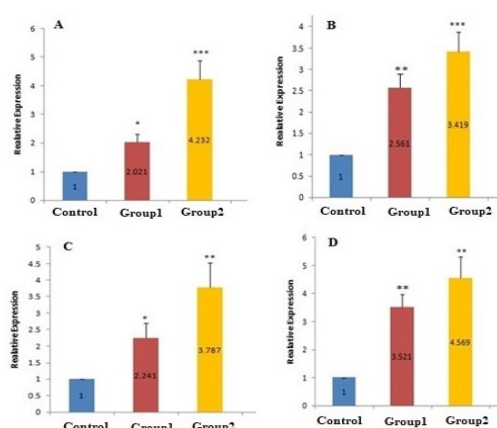
تصویر شماره ۱: بیان مارکرهای (A) CD34، (B) CD44، (C) CD90 و (D) CD105 در سلول های بنیادی ژله وارتون



نمودار شماره ۲: بررسی WJ-MSCs تحت تأثیر غلظت های مختلف PRGF. بیشترین غلظت PRGF در روز ۳ بیشترین تأثیر را بر بقای سلول ها داشت ($P < 0.001$ و $P < 0.01$ ، $P < 0.05$).

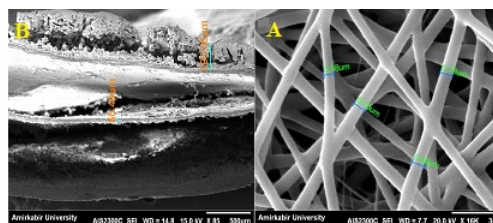
نتایج به صورت میانگین $\pm$ SEM گزارش شده اند.
Control (PCL/Gel-Stem cells),
Group1: 2nanofiber/1PRGM (20%),
Group2: 3nanofiber/2PRGM (50%)

بررسی تمایز WJ-MSCs به استخوان توسط Real-Time PCR
نتایج نشان داد که پس از ۲۱ روز بیان ژن های ALP, RUNX2, Coll X, Coll I در گروه با غلظت ۳۶ نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری بیش تر است (نمودار شماره ۳).



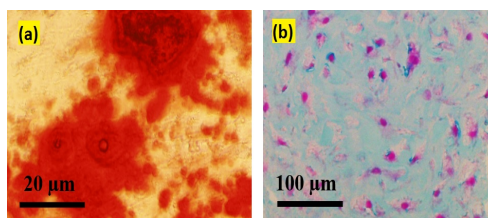
نمودار شماره ۳: بررسی تأثیر غلظت های PRGF بر بیان ژن ها: (A: ALP, RUNX2 (B, COLX (C, COLLI (D). $P < 0.001$ و $P < 0.01$ ، $P < 0.05$).

Control (PCL/Gel-Stem cells),
Group1: 2nanofiber/1PRGM (20%),
Group2: 3nanofiber/2PRGM (50%)



تصویر شماره ۳: تصاویر میکروسکوپ الکترونی: از سمت چپ به راست به ترتیب: A) ۳۰ Gel/PCL (۷۰ PRFM- Gel/PCL (B) تمایز WJ-MSCs به سلول های استخوان و غضروف

رسوب قرمز رنگ به عنوان رسوب کلسیم با رنگ آمیزی Alizarin Red-S در سلول های تمایز یافته به سلول های استخوانی در روز ۲۱ تشخیص داده شد. در سلول های بنیادی تمایز یافته به غضروف بعد از رنگ آمیزی با Alcian blue و ایجاد کنتراست با نوکلئار فست رد، ماتریکس خارج سلولی شدیداً آبی شده، که نشان دهنده حضور گلیکوز آمینو گلیکان های سولفاته در ماتریکس است (تصویر شماره ۴).



تصویر شماره ۴: تمایز WJ-MSCs به سلول های استخوانی و غضروفی زیر میکروسکوپ نوری. (a) رنگ آمیزی با Alizarin Red-S روی سلول های تمایز یافته به سلول های استخوانی با بزرگنمایی ۴۰ X (b) رنگ آمیزی با Alcian blue روی سلول های تمایز یافته به سلول های غضروفی با بزرگنمایی ۲۰ X

بررسی زنده مانده WJ-MSCs توسط آزمون MTT

اثر غلظت های مختلف PRGF در روز ۳ بر میزان زنده ماندن سلول های WJ-MSCs بررسی گردید. در طی روز ۳ بیشترین ماندگاری در غلظت ۵۰ درصد دیده شد (نمودار شماره ۲).

بحث

در سال های اخیر تلاش های بسیاری در جهت درمان مدل های مختلف صدمات استخوانی با سلول های بنیادی مزانشیمی و انواع داربست های سنتتیک و طبیعی انجام شده است. از سلول های بنیادی مزانشیمی به طور گسترده به صورت تزریقی موضعی در مدل های انسانی (۲۰) و کشت این سلول ها بر روی داربست های مختلف زیست تخریب پذیر، استفاده شده که هنوز نتایج رضایت بخشی حاصل نشده است (۲۱).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نانوفیبر ترکیبی با PRGM با غلظت ۵۰ درصد بیش ترین اثر بقاء و ماندگاری بر WJ-MSCs و بیان ژن های ویژه سلول های استخوانی دارد.

پلیمرهای طبیعی، هنگامی که به تنهایی استفاده می شود، مستعد تخریب سریع تر در مقایسه با پلیمرهای مصنوعی می باشد. Ren و همکاران در پژوهشی نشان دادند که ساختارهای نانولیفی ترکیبی از PCL/Gel می تواند به عنوان یک غشا مناسب برای بازسازی بافت استخوان در نظر گرفته شود و مطالعه میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد که الیاف مورفولوژی صاف و تصادفی داشتند (۲۲). مطالعه Preeth نشان داد که کمپلکس کوثرستین- روی در نانو الیاف PCL/Gel می تواند به عنوان یک عامل دارویی برای درمان و تقویت و بازسازی استخوان عمل کند (۲۳). این مطالعه همراستا با نتایج مطالعه حاضر است و نشان می دهد که می توان سطح نانوفیبر را با افزودن عوامل دیگر بهبود بخشید.

Binulal و همکاران از داربست نانوفیبری PCL/Gel الکترورسی شده به همراه سلول های بنیادی برای مهندسی بافت استخوان استفاده کردند. سلول های بنیادی مزانشیمی بر روی آن ها کشت داده شدند و با موفقیت به سلول های استئوبلاست تمایز یافتند که نشان دهنده عملکرد زیستی مناسب این سیستم برای کاربردهای ترمیم استخوان است (۲۴). در مطالعه دیگر، Kim و همکاران از ساختار ترکیبی نانوالیاف PCL/Gel و فسفات کلسیم

دوفازی برای تحویل BMP-2 برای بازسازی استخوان استفاده نمودند. مطالعات رفتار سلولی بر روی داربست های مختلف این را ثابت کرد که سلول های کشت شده بر روی الیاف های حاوی BMP به طور قابل توجهی تکثیر و چسبندگی سلولی را افزایش می دهند. همچنین در پیوند در مدل موشی در ناحیه استخوان جمجمه تفاوت قابل توجهی در ترمیم با نانوالیاف حاوی BMP وجود دارد (۲۵).

در مطالعات اخیر مشخص شده است که پلاکت ها مجموعه ای از فاکتورهای رشد مختلف را آزاد می کنند، عواملی مانند PDGF، TGFβ1، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)، اساساً VEGF-A، فاکتور اصلی رشد فیروبلست (bFGF)، همچنین به عنوان FGF-2 شناخته می شود، فاکتور رشد کبدی (HGF)، فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) و IGF-1 که فرآیندهای ترمیم زخم را تنظیم می کنند (۲۶).

گسترش تکنیک های مهندسی بافت منجر به کاربرد پلاکت های تغلیظ شده در فرآیند بازسازی و افزایش کیفیت بهبودی بیماران تحت درمان های جراحی دندان و سبب تسهیل کاربرد PRGF در تمام تخصص های پزشکی گردید (۲۷). در یک مطالعه تصادفی انجام شده در مدل حیوانی سگ با استئوآرتریت شدید نشان دادند که پیوند داخل مفصلی ASCs باعث بهبود عملکرد فیزیکی و کاهش درد تا ۶ ماه شد (۲۸). همچنین در شرایط برون تنی، ASCs سگ در حضور PRGF بررسی شدند. نتایج گویای این مطلب بود مشابه با ASCs انسانی، رشد، تکثیر، بقا و تمایز ASCs افزایش می یابد. براساس مطالعات آزمایشگاهی، انتظار می رود که ASCs فعال شده با PRGF بهبودی قابل توجه و معنی داری را ایجاد کنند (۲۹۳۰). موافق با این مطالعه در نتایج بدست آمده مشاهده شد که افزودن PRGF باعث افزایش بقا و ماندگاری سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از ژله وارتون شده است. همچنین در تمایز به سلول های استخوانی نیز تاثیر گذار است.

Anitua و همکاران نقش کنسانتره پلاکتی را در کاهش التهاب بافت و افزایش عروق استخوانی نشان دادند (۳۱). یک مطالعه بالینی، ۱۰۰ درصد میزان بقای ایمپلنت و بهبودی قابل قبولی را در بافت نرم با استفاده از PRGF نشان دادند (۳۲).

نتایج یک مطالعه مشخص کرد که Bovine bone mineral (BBM) وقتی همراه با PDGFs استفاده می‌شود، به عنوان یک داربست مناسب برای بازسازی بافت استخوان جدید می‌باشد. با توجه به فرایند استئوژنز، محل‌های درمان شده با BBM/PRGF نتایج بهتری در مقایسه با گروه بیومتریال به تنهایی نشان دادند. جالب توجه است، استفاده از PRGF به‌طور قابل توجهی باعث افزایش قابل توجه تماس بیومواد با استخوان شد. علاوه بر این، در نقایص درمان شده با BBM/PRGF در مقایسه با گروه بهبود یافته خودبخودی پس از ۲ و ۸ هفته پس از پیوند تشکیل استخوان جدید بیش‌تری مشاهده شد (۳۳). نتیجه بررسی یک مقاله مروری این بود که PRGF همراه با جایگزین استخوان باعث افزایش بازسازی و رگ‌زایی استخوان می‌شود و همچنین ممکن است باعث کاهش التهاب و کاهش خطر عوارض جانبی شود (۳۴).

PRGF می‌تواند به عنوان یک حامل مناسب برای ADSCs باشد و از بازسازی اولیه استخوان اطمینان حاصل کرد. سطح بالای فاکتورهای رشد از پلاکت‌ها آزاد می‌شوند و این پروتئین‌های فعال بیولوژیکی نقش مهمی در بازسازی بافت ایفا می‌کنند: مشخص شده است که PDGF اثر میوژنیک قوی بر روی سلول‌های بنیادی و استئوبلاست‌ها دارد (۳۵۳۶)، TGF موثر در تولید ماتریکس خارج سلولی، VEGF در رگ‌زایی است (۳۷) و EGF در تحرک فیروبلات‌ها و پیش استئوبلاست‌ها

دخیل هستند (۳۸). علاوه بر این، فیبرین، در اتصال، رشد و تکثیر سلولی و در رگ‌زایی از طریق تحریک رشد سلول‌های اندوتلیال شرکت می‌کند (۳۹). نتایج به دست آمده از یک مطالعه در محیط برون‌تنی نشان می‌دهد که ترکیبی از سطوح تیتانیوم با غشا فیبرینی کلاته مشتق از پلاسمای اتولوگ می‌تواند تمایز سلول‌های استئوبلاست از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تولید ماتریکس استخوانی کلسیفیه و ادغام استخوانی ایمپلنت‌های دندان‌سازی شده از تیتانیوم را به حداکثر برساند. غشای فیبرینی کلاته مشتق از پلاسمای در بالین باعث افزایش رسوب استخوان در اطراف ایمپلنت‌های تیتانیومی می‌شود (۴۰). در پژوهشی مشخص شد که قابلیت رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی در داربست پلاسمای غنی از پلاکت بیشتر است و می‌تواند شرایط مناسبی را برای رشد و تکثیر سلول‌ها ایجاد کند (۴۱). در پژوهش انجام شده نشان داده شد که استفاده از پلاسمای غنی از فاکتورهای رشد به‌عنوان یک عامل کمک‌کننده در افزایش کیفیت نانوفیبر PCL/Gel می‌باشد و می‌تواند به افزایش سطح بیان ژن‌های ویژه استخوانی کمک کند. مطالعه حاضر نشان داد که داربست ترکیبی PCL/GEL-PRFM تهیه شده باعث افزایش رشد و تکثیر WJ-MSCs و همچنین افزایش بیان ژن‌های ویژه استخوانی در محیط برون‌تنی شد. افزودن PRGF در تهیه داربست می‌تواند افزایش تمایز WJ-MSCs را به استخوان تسهیل نماید.

سپاسگزاری

از مرکز تحقیقات و بانک فرآورده‌های پیوند ایران که فرصت استفاده از سایت مطالعاتی را در اختیار گذاشتند، سپاسگزاریم.

References

1. Majidinia M, Sadeghpour A, Yousefi B. The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration. J Cell Physiol 2018; 233(4): 2937-2948.

2. Graziani G, Govoni M, Vivarelli L, Boi M, de Carolis M, Bianchi M, et al. A Comprehensive Microstructural and Compositional Characterization of Allogenic and Xenogenic Bone: Application to Bone Grafts and Nanostructured Biomimetic Coatings. *Coatings* 2020; 10(6): 522.
3. Wang W, Yeung KW. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact Mater* 2017; 2(4): 224-247.
4. Le Pape F, Richard G, Porchet E, Sourice S, Dubrana F, Férec C; et al. Adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of human MSCs cultured under perfusion with a marine oxygen carrier on an allogenic bone substitute. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2018; 46(1): 95-107.
5. Ji W, Yang F, Ma J, Bouma MJ, Boerman OC, Chen Z, et al. Incorporation of stromal cell-derived factor-1 α in PCL/gelatin electrospun membranes for guided bone regeneration. *Biomaterials* 2013; 34(3): 735-745.
6. Zhang Y, Ouyang H, Lim CT, Ramakrishna S, Huang ZM. Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. *J. Biomed Mater Res* 2005; 72(1): 156-165.
7. Xue J, He M, Liu H, Niu Y, Crawford A, Coates PD, et al. Drug loaded homogeneous electrospun PCL/gelatin hybrid nanofiber structures for anti-infective tissue regeneration membranes. *Biomaterials* 2014; 35(34): 9395-9405.
8. Sruthi R, Balagangadharan K, Selvamurugan N. Polycaprolactone/Polyvinylpyrrolidone Coaxial Electrospun Fibers Containing Veratric Acid-Loaded Chitosan Nanoparticles for Bone Regeneration. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2020; 193: 111110.
9. Chen P, Liu L, Pan J, Mei J, Li C, Zheng Y. Biomimetic Composite Scaffold of Hydroxyapatite/Gelatin-Chitosan Core-Shell Nanofibers for Bone Tissue Engineering. *Mater Sci Eng C* 2019; 97: 325-335.
10. Huang Z, Wang W, Wang Q, Hojnacki T, Wang Y, Fu Y, et al. Coaxial Nanofiber Scaffold with Super-Active Platelet Lysate to Accelerate the Repair of Bone Defects. *RSC Adv* 2020; 10: 35776-35786.
11. Wang Q, Feng Y, He M, Zhao W, Qiu L, Zhao C. A Hierarchical Janus Nanofibrous Membrane Combining Direct Osteogenesis and Osteoimmunomodulatory Functions for Advanced Bone Regeneration. *Adv Funct Mater* 2020; 31(8): 2008906.
12. Anitua E, Pino A, Jaen P, Orive G. Plasma Rich in Growth Factors enhances wound healing and protects from photo-oxidative stress in dermal fibroblasts and 3D skin models. *Curr Pharm Biotechnol* 2016; 17(6): 556-570.
13. Anitua E. Plasma Rich in Growth Factors: Preliminary Results of Use in the Preparation of Future Sites for Implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999; 14(4): 529-535.
14. Kimura M, Miyajima K, Kono T, Hayashi A, Iwaya K, Ikeda N. Effectiveness of polyglycolic acid sheet covering and platelet-rich plasma after video-assisted thoracic surgery for spontaneous pneumothorax. *Thorac Cardiovasc Surg* 2017; 65(1): 61-64.
15. Sclafani AP, Azzi J. Platelet preparations for use in facial rejuvenation and wound healing: a critical review of current literature. *Aesthetic Plast Surg* 2015; 39(4): 495-505.
16. Anitua E, Tejero R, Zalduendo MM, Orive G. Plasma rich in growth factors promotes bone tissue regeneration by stimulating proliferation, migration, and autocrine

- secretion in primary human osteoblasts. *J Periodontol* 2013; 84(8): 1180-1190.
17. Ghiasi M, Mehdizadeh M, Mohammadsharifi A, Nasr G, Bigdelo M, Farzaneh S, et al. Use of mesenchymal adult stem cell for cartilage regeneration by hydrogel. *IJML* 2019; 6(3): 207-218.
 18. La Rocca G, Lo Iacono M, Corsello T, et al. Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells maintain the expression of key immunomodulatory molecules when subjected to osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation in vitro: new perspectives for cellular therapy. *Curr Stem Cell Res Ther* 2013; 8(1): 100-113.
 19. Ghiasi M, Kalhor N, Tabatabaei Qomi R, Sheykhasan M. The effects of synthetic and natural scaffolds on viability and proliferation of adipose-derived stem cells. *Frontiers in Life Science* 2016; 9(1): 32-43.
 20. Ghiasi M, Farzaneh S, Bigdelo M, Vosoogh M. The Effects of Allogeneic cADSCs on an Experimental Ear Auricular Defect to Evaluate Cartilage Regeneration in a Canine Model. *J Clin Med Res* 2021; 2(1): 1-11.
 21. Lin YX, Ding ZY, Zhou XB, Li ST, Xie DM, Li ZZ, et al. In vitro and in vivo evaluation of the developed PLGA/HAp/Zein scaffolds for bone-cartilage interface regeneration. *Biomed Environ Sci* 2015; 28(1): 1-12.
 22. Ren K, Wang Y, Sun T, Yue W, Zhang H. Electrospun PCL/gelatin composite nanofiber structures for effective guided bone regeneration membranes. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2017; 78: 324-332.
 23. Preeth DR, Saravanan S, Shairam M, Selvakumar N, Raja IS, Dhanasekaran A, et al. Bioactive Zinc(II) complex incorporated PCL/gelatin electrospun nanofiber enhanced bone tissue regeneration. *Eur J Pharm Sci* 2021; 160: 105768.
 24. Binulal N, Natarajan A, Menon D, Bhaskaran V, Mony U, Nair SV. PCL-gelatin composite nanofibers electrospun using diluted acetic acid-ethyl acetate solvent system for stem cell-based bone tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed* 2014; 25(4): 325-340.
 25. Kim BR, Nguyen TBL, Min YK, Lee BT. In vitro and in vivo studies of BMP-2-loaded PCL-gelatin-BCP electrospun scaffolds. *Tissue Eng Part A* 2014; 20(23-24): 3279-3289.
 26. Heijnen H, van der Sluijs P. Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules or not? *J Thromb Haemost* 2015; 13(12): 2141-2151.
 27. Anitua E, Prado R, Troya M, Zalduendo M, Fuente M, Pino A, et al. Implementation of a more physiological plasma rich in growth factor (PRGF) protocol: anticoagulant removal and reduction in activator concentration. *Platelets* 2016; 27(5): 459-466.
 28. Vilar J M, Morales M, Santana A. Controlled, blinded force platform analysis of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells associated to PRGF-Endoret in osteoarthritic dogs. *BMC Veterinary Research* 2013; 9: 131.
 29. Anitua E, Sanchez M, Orive G, Andia I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials* 2007; 28(31): 4551-4560.
 30. Schnabel LV, Mohammed HO, Miller BJ et al. Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res* 2007; 25(2): 230-240.
 31. Anitua E, Begona L, Orive G. Clinical evaluation of split-crest technique with ultrasonic bone surgery for narrow ridge expansion: status of soft and hard tissues and implant success. *Clin Implant Dent Relat Res* 2013; 15(2): 176-187.

32. Gentile P, Di Pasquali C, Bocchini I, Floris M, Eeonora T, Fiaschetti V, et al. Breast reconstruction with autologous fat graft mixed with platelet-rich plasma. *Surg Innov* 2013; 20(4): 370-376.
33. Miloro M, Haralson DJ, Desa V. Bone healing in a rabbit mandibular defect using platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg* 2010; 68(6): 1225-1230.
34. Stumbras A, Krukis MM, Januzis G, Juodzbals G. Regenerative bone potential after sinus floor elevation using various bone graft materials: a systematic review. *Quintessence Int* 2019; 50(7): 548-558.
35. Canalis E, Varghese S, McCarthy TL, Centrella M. Role of platelet derived growth factor in bone cell function. *Growth Regul* 1992; 2(4): 151-155.
36. Rydziel S, Shaikh S, Canalis E. Platelet-derived growth factor-AA and -BB (PDGF-AA and -BB) enhance the synthesis of PDGF-AA in bone cell cultures. *Endocrinology* 1994; 134(6): 2541-2546.
37. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2004; 91(1): 4-15.
38. Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen JS, MacArthur CA, Coulier F, et al. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 1996; 271(25): 15292-15297.
39. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost* 2005; 3(8): 1894-1904.
40. Irastorza I, Luzuriaga J, Martinez-Conde R, Barretxe GI, Unda F. ADHESION, integration and osteogenesis of human dental pulp stem cells on biomimetic implant surfaces combined with plasma derived products. *Eur Cell Mater* 2019; 38: 201-214.
41. Ghiasi, M, Tabatabaei Qomi R, Kallhor N, Mehdizadeh M, Sheykhasan M. Survival Potential Investigation of the Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell in the Natural Scaffolds as a Suitable Growth Medium. *Journal of Cell & Tissue (JCT)* 2015; 6(1): 23-29.