ORIGINAL ARTICLE

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

Mahdieh Ghiasi[1],
Mohammad Mehdizadeh[2],
Liela Khatib shad[3]

[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)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.17359260.1401.32.210.9.2]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و دوم شماره ۲۱۰ تیر سال ۱۴۰۱ (۱-۱۲)

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

مهدیه قیاثی [۱]
محمد مهدیزاده [۲]
لیلا خطیب شاد [۳]

چکیده

سابقه و هدف: مهندسی بافت و سلول درمانی به عنوان درمان‌های امیدوارکننده، این امکان را جهت ترمیم ضایعات و نقایص استخوانی می‌تواند فراهم نماید. داربست‌های ترکیبی، پلیمرهای سنتتیک و طبیعی می‌توانند بستر مناسبی برای WJ-MSCs به سلول‌های استخوانی را فراهم سازند. در این مطالعه تاثیر فاکتورهای رشد خونی لیوفیلیزه در پیشبرد فرآیند استءوژنز حاءز اهمیت می باشد.

مواد و روش‌ها: ابتدا داربست‌های نانولیفی PCL-Gel با روش الکتروریسی تهیه و همچنین برای تهیه غشا، از افراد داوطلب خون جمع‌آوری و فاکتورهای رشد آن استخراج و بر روی لایه‌های نانو فیبری لود گردید. سپس در فریزر ^{o}C ۲۰- به مدت ۳ روز و در نهایت فریز دایر به‌مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت و از لحاظ ساختاری با میکروسکوپ الکترونی بررسی و با اشعه گاما استریل گردیدند. در ادامه WJ-MSCs بر روی داربست‌ها کشت داده شد. به منظور بررسی ماندگاری سلول‌ها و بیان ژن‌های ALP، RUNX2، COLX و COLI در داربست طراحی شده آزمون‌های MTT و Real-Time PCR انجام پذیرفت.

یافته‌ها: نتایج حاصل از مطالعه نشان داد ماندگاری و رشد و تکثیر WJ-MSCs و بیان ژن‌های ویژه استخوانی در غلظت بیش‌تر ترکیب فاکتورهای رشد مشتق از خون/ داربست پلی کاپرولاکتون / ژلاتین به طور معنی‌داری بیش‌تر است ($P<۰/۰۰۱$).

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

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

مقدمه

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). روش‌های مختلفی برای بازسازی نقایص بافت استخوان بزرگ وجود دارد که شامل پیوند مواد طبیعی مانند استخوان اتولوگ، آلوگرفت‌ها، زنوگرفت‌ها و مواد مصنوعی مانند سرامیک، پلیمرها و کامپوزیت‌ها می‌باشد(۲).

از آن‌جا که هر کدام از مواد طبیعی دارای معایب خاصی می‌باشند، اخیرا داربست‌های مصنوعی به عنوان جایگزینی برای استخوان آسیب دیده، مورد توجه محققان قرار گرفته‌اند(۳).

مولف مسئول: مهدیه قیاثی- تهران: دانشگاه علوم پزشکی تهران، مرکز تحقیقات و بانک فرآورده های پیوندی ایران E-mail: mahdieh.ghiasi@yahoo.com
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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.17359260.1401.32.210.9.2]

در حال حاضر، چالش‌های علمی مهندسی بافت استخوان، ایجاد داربست‌های سه بعدی (سه بعدی) زیست تخریب‌پذیر و زیست سازگارپذیر در اشکال و اندازه‌های مختلف با خواص مکانیکی و تخلخل مطلوب است(۴). نانوالیاف الکتروریسی شده زیست سازگار به علت داشتن نسبت سطح به حجم بالاتر، به‌طور گسترده‌ای برای تحقیقات در مهندسی بافت استفاده می‌شوند. از میان انواع نانوالیاف‌های الکتروریسی 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 پروتیین 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 این‌رو، 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(۱۱-۹). در سال‌های اخیر پلاسمای غنی از فاکتورهای رشد ((PRGF(Plasma rich in growth factors) مشتق شده از خون در پزشکی بازساختی جذابیت بسیاری به‌دست آورده‌اند. PRGF به خاطر خصوصیات ذاتی و داشتن انواعی از فاکتورهای رشد مانند TGFβ1(Transforming growth factor beta 1)، IGF-1 (insulin-like growth factor 1)، PDGR (Platelet-derived growth factor) و 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-1β (Interleukin 1 beta)، MCP-1(Monocyte chemoattractant protein-1)، MCP-2، MCP-3(Monocyte chemoattractant protein-3) و RANTES (Regulated upon Activation, Normal 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 پایین دستی nuclear factor-kB، که دخیل در پاسخ التهابی می‌باشد، صورت می‌پذیرد. از سوی دیگر، با فقدان لکوسیت‌ها، میزان عوامل پیش التهابی و

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.17359260.1401.32.210.9.2]

پروفیبروتیک در محل آسیب، احتمالاً به ایجاد تعادل بافت استخوانی کمک می‌کنند(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 بافت‌ها بوده و می‌توان آن‌ها را از منابع مختلفی جدا نمود(۱۷). از این میان، WJ-MSCs (Wharton's Jelly Mesenchymal Stromal Cells) که سلول‌های بنیادی ژله وارتون هستند و حالت میانی بین سلول‌های بنیادی جنینی(Embryonic Stem Cslls: ESC) و MSCs های بالغ با حداقل واکنش ایمنی و اثرات تعدیل‌کننده ایمنی، را نشان می‌دهند، کاندیدی ایده‌آل برای مهندسی بافت استخوان به شمار می‌رود(۱۸). با توجه به اهمیت موضوع، تمرکزمطالعه‌حاضر بر بررسیWJ-MSCs بر داربست ترکیبی PCL-Gel/PRFM تحت شرایط برون‌تنی بود.

مواد و روش‌ها

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

جداسازی، 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 ۱۸۰۰ rpm به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفیوژ 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 ۳۷C° و CO2 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 سلول‌های استخوانی (تعیین هویت چند توانی سلول ها)

WJ-MSCs (5×10^4) بر روی داربست‌ها در پلیت‌های ۶ خانه با محیط تمایزی شامل α-MEM حاوی ۱۰ درصد FBS، ۱ درصد Pen/Strep، ۲ میلی‌مولار ال-گلوتامین، ۱۰ میلی‌مولار بتا-گلیسرول فسفات، ۱۰۰ نانومولار دگزامتازون و ۵۰ میکرومولار آسکوربیک اسید به مدت ۲۱ روز در دمای ۳۷C° و ۵ درصد CO2 انکوبه شد. برای ارزیابی تمایز، رنگ آمیزی آلیزارین رد به منظور تشخیص ذخایر کلسیمی صورت گرفت.

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

WJ-MSCs (5×10^4) بر روی داربست‌ها در پلیت‌های ۶ خانه با محیط تمایزی حاوی محیط DMEM-High glucose و ۱۰ نانوگرم TGF-β3، ۱۰ نانوگرم BMP-6، ITS، ۱ میکرومولار دگزامتازون، ۵۰ میکرومولار ۲-فسفوآسکوربات و ۱ درصد Pen/Strep به مدت ۲۱ روز در دمای ۳۷C° و ۵ درصد CO2 انکوبه شد. ارزیابی تمایز با روش رنگ‌آمیزی اختصاصی آلسین بلو انجام شد.

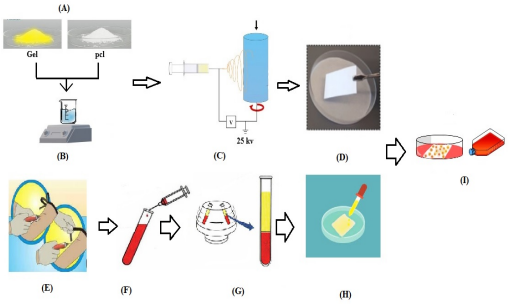
ساخت داربست PRFM - Gel/PCL

Gel/PCL با نسبت ۳۰:۷۰ در اسید استیک/اسید فرمیک با نسبت ۱:۹ آماده و جهت الکتروریسی استفاده شد. نانوالیاف‌ها در بازه زمانی ۲ ساعت و سرعت 2 ml/h و با چرخش ۲۵۰ rpm ولتاژ ۲۵ KV جمع‌آوری شد. در مرحله دوم نیز غشا PRFM را تهیه و به لایه‌های نانوفیبری افزوده می‌شود. به این ترتیب که ابتدا از هر یک از داوطلبین ۲۰ میلی‌لیتر خون همراه با ماده ضد انعقاد سیتراته جمع‌آوری و پس از دو بار سانتریفوژ با

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.17359260.1401.32.210.9.2]

سرعت ۱۸۰۰ rpm به مدت ۱۲ min تغلیظ پلاکتی انجام و PRGF تهیه شد. بدین‌ترتیب که با افزودن ۱۰$CaCl_2$ 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 GEL، (B) مخلوط کردن با اسید و همگن‌سازی، (C) الکتروریسی، (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 وارتون 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 امیرکبیر 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 (۱۰^4 ×۱) بر روی داربست‌ها کشت داده شدند. پس از طی ۳ روز میزان ماندگاری سلول‌ها با MTT (۵ ml/mg) در غلظت‌های مختلفی از PRGF (20%، 50%) با استفاده از دستگاه ELISA Reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید.

تمایز به سلول های استخوان

تمایز WJ-MSCs (۱۰^5 ×۵) 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 ReaTime- PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی بیان ژن‌ها با روش ReaTime- PCR

بدین‌منظور 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).

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

ژن ها	Sense strand	Antisense strand	Size of product
β-actin	TGGGGTGGCTTTTAGGATGG	AGGTTCACAATGTGGCCGAG	114 bp
RUNX2	CTTGGGTGGGTGGAGGATTC	TGGCAGTCACATGGCAGATT	136 bp
COLX	GCTGAACGATACCAAATGCC	TGGTGGACCAGGAGTACCTT	132 bp
COLI	CTCCTGGAGCATCTGGAGAC	GTCTCACCACGATCACCCTT	122 bp
ALP	AGGGGAACTTGTCCATCTCC	GTACTGGCGAGACCAAGCGCA	200 bp

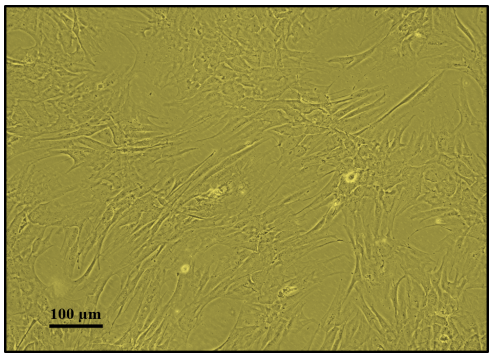
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.17359260.1401.32.210.9.2]

با استفاده از آنالیز واریانس ANOVA و تست LSD، معنی‌داری داربست‌ها بررسی گردید و سطح معنی‌داری با ارزش P<۰/۰۵ مشخص شد.

یافته‌ها

کشت WJ-MSCs

در بررسی مورفولوژی در زیر میکروسکوپ، این سلول‌ها دارای ظاهری تقریباً دوکی شکل و فیبروبلاستی هستند (تصویر شماره ۲).



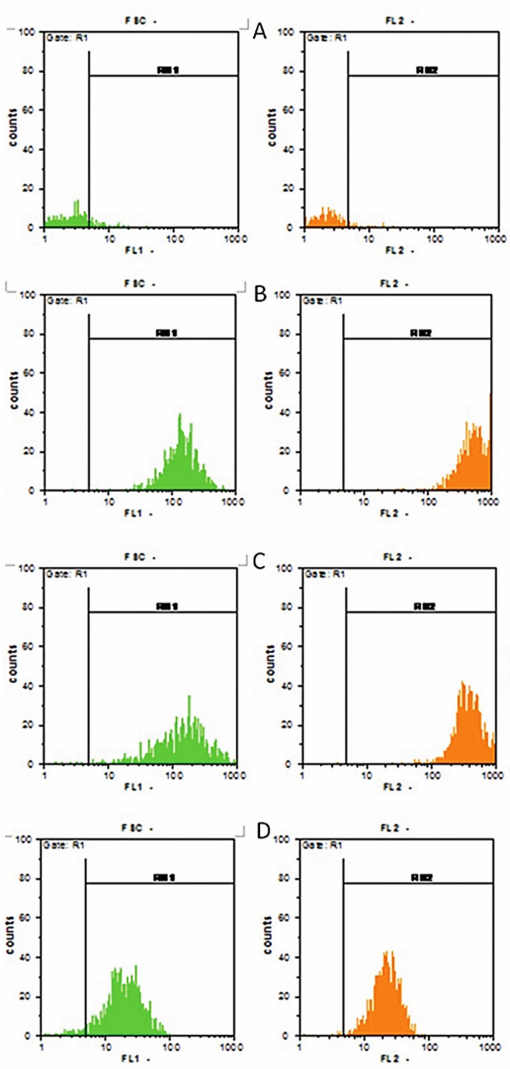
تصویر شماره ۲: بررسی مورفولوژی WJ-MSCs زیرمیکروسکوپ نوری معکوس (بزرگنمایی ۲۰X)

فلوسایتومتری

مارکرهای سلول‌های بنیادی ژله وارتون به ترتیب شامل CD34 (A, CD44(B , CD90 (C و CD105 (D. همان‌طوری که در تصویر نشان داده شده است، این سلول‌ها مارکرهای CD44، CD90 و CD105 را که از مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی ژله وارتون هست را بیان نموده‌اند (نمودار شماره ۱).

بررسی ساختار داربست های نانولیفی

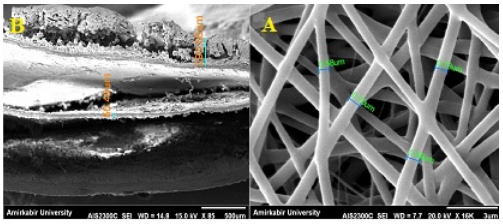
به منظور بررسی و مشاهده ساختار داربست‌های الکتروریسی شده، تصاویری از سطح الیاف تهیه شد (تصویر شماره ۳). در شکل A ابتدا PCL و Gel با روش الکتروریسی تهیه و قطر نانوالیاف با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مشخص شد. در شکل B، داربست‌های تهیه شده چند لایه مرکب از PCL و Gel و PRFM بر روی هم قرار گرفته و ضخامت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



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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-06]

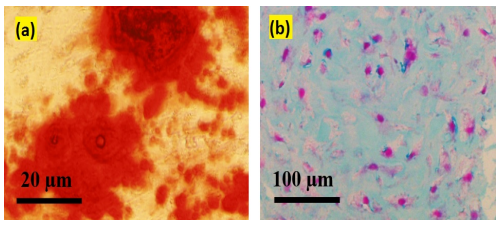
[DOR: 20.1001.1.17359260.1401.32.210.9.2]



تصویر شماره ۳ : تصاویر میکروسکوپ الکترونی: از سمت چپ به راست به ترتیب: A) Gel/PCL ۳۰/۷۰، B) PRFM– Gel/PCL

تمایز WJ-MSCs به سلول‌های استخوان و غضروف

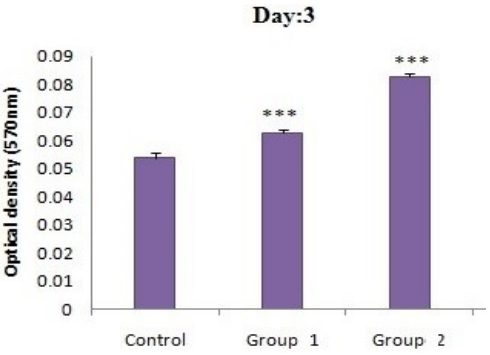
رسوب قرمز رنگ به عنوان رسوب کلسیم با رنگ‌آمیزی Alizarin Red-S در سلول‌های تمایز یافته به سلول‌های استخوانی در روز ۲۱ تشخیص داده شد. در سلول‌های بنیادی تمایز یافته به غضروف بعد از رنگ‌آمیزی با Alcian blue و ایجاد کنتراست با نوکلئار فست رد، ماتریکس خارج سلولی شدیداً آبی شده، که نشان‌دهنده حضور گلیکوزآمینوگلیکان‌های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



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

بررسی زنده‌مانی WJ-MSCs توسط آزمون MTT

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

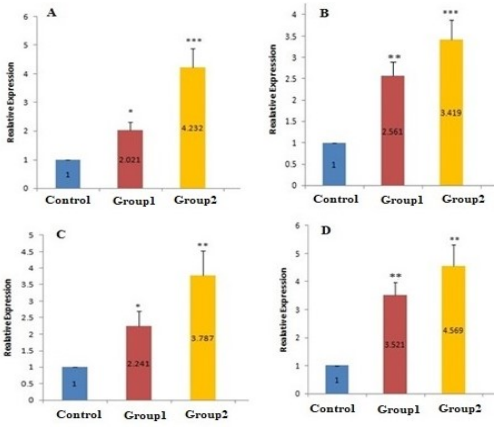


نمودار شماره ۲: بررسی WJ-MSCs تحت تاثیر غلظت های مختلف PRGF. بیشترین غلظت PRGF در روز ۳ بیش‌ترین تاثیر را بر بقاء سلول‌ها داشت (۰/۰۰۱ >P*** و ۰/۰۱ >P**، ۰/۰۵ >P*). نتایج به صورت میانگین ± SEM گزارش شده‌اند.

Control (PCL/Gel-Stem cells),
Groupe1:2nanofiber/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 ژن‌های ALP ,RUNX2 , Coll X , Coll I در گروه با غلظت ۳۶ λ نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری بیش‌تر است (نمودارش ماره ۳).



نمودار شماره ۳: بررسی تأثیرغلظت های PRGF بر بیان ژن‌ها: A) ALP ، B) RUNX2 ،C) COLX و D) COLLI. (۰/۰۰۱ >P*** و ۰/۰۱ >P**، ۰/۰۵ >P*).

Control (PCL/Gel-Stem cells),
Groupe1:2nanofiber/1PRGM (20%),
Group2:3nanofiber/2PRGM (50%)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.17359260.1401.32.210.9.2]

بحث

در سال‌های اخیر تلاش‌های بسیاری در جهت درمان مدل‌های مختلف صدمات استخوانی با سلول‌های بنیادی مزانشیمی و انواع داربست‌های سنتتیک و طبیعی انجام شده است. از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌طور گسترده به‌صورت تزریقی موضعی در مدل‌های انسانی(۲۰) و کشت این سلول‌ها بر روی داربست‌های مختلف زیست تخریب‌پذیر، 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 بیش‌ترین اثر بقاء و ماندگاری بر WJ-MSCs و بیان ژن‌های ویژه سلول‌های استخوانی دارد.

پلیمرهای طبیعی، هنگامی که به تنهایی استفاده می‌شود، مستعد تخریب سریع تر در مقایسه با پلیمرهای مصنوعی می‌باشد. Ren و همکاران در پژوهشی نشان دادندکه ساختارهای نانولیفی ترکیبی از PCL/Gel می‌تواند به عنوان یک غشا مناسب برای بازسازی بافت استخوان در نظر گرفته شود و مطالعه میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان دادکه الیاف مورفولوژی صاف و تصادفی داشتند(۲۲).

مطالعه Preeth نشان داد که کمپلکس کوئرستین-روی در نانو الیاف PCL/Gel می‌تواند به‌عنوان یک عامل دارویی برای درمان و تقویت و بازسازی استخوان عمل کند(۲۳). این مطالعه همراستا با نتایج مطالعه حاضر است و نشان می‌دهد که می‌توان سطح نانوفیبر را با افزودن عوامل دیگر بهبود بخشید.

Binulal و همکاران از داربست نانوفیبری PCL/Gel الکتروریسی شده به همراه سلول‌های بنیادی برای مهندسی بافت استخوان استفاده کردند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر روی آن‌هاکشت داده شدند وبا موفقیت به سلول‌های استئوبلاست تمایز یافتند که نشان‌دهنده 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 داربست‌های مختلف این را ثابت کرد که سلول‌های کشت شده بر روی الیاف‌های حاوی BMP به طور قابل توجهی تکثیر و چسبندگی سلولی را افزایش می‌دهند. 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 پلاکت‌ها مجموعه‌ای از فاکتورهای رشد مختلف را آزاد می‌کنند، عواملی مانند PDGF، TGFbeta1، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی(VEGF، اساساً VEGF-A)، فاکتور اصلی رشد فیبروبلاست (bFGF، همچنین به‌عنوان FGF-2 شناخته می‌شود)، فاکتور رشد کبدی (HGF)، فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) و IGF-1 که فرآیندهای ترمیم زخم را تنظیم می‌کنند(۲۶).

گسترش تکنیک‌های مهندسی بافت منجر به کاربرد پلاکت‌های تغلیظ شده در فرآیند بازسازی و افزایش کیفیت بهبودی بیماران تحت درمان‌های جراحی دندان و سبب تسهیل کاربرد PRGF در تمام تخصص‌های 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 برون‌تنی، ASCs سگ در حضور PRGF بررسی شدند. نتایج گویای این مطلب بود مشابه با ASCs انسانی، رشد، تکثیر، بقا و تمایز ASCs افزایش می‌یابد. براساس مطالعات آزمایشگاهی، انتظار می‌رود که ASCs فعال شده با PRGF بهبودی قابل توجه و معنی‌داری را ایجاد کنند(۲۹۳۰). موافق با این مطالعه در نتایج بدست آمده مشاهده شد که افزودن PRGF باعث افزایش بقا و ماندگاری سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از ژله وارتون شده است. همچنین در تمایز به سلول‌های استخوانی نیز تاثیرگذار است.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.17359260.1401.32.210.9.2]

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 ستفاده 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 یازسازی 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 ADSCsها 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 میتوژنیک قوی بر روی سلول های بنیادی و استئوبلاست‌ها دارد(۳۵۳۶)، TGF موثر در تولید ماتریکس خارج سلولی، VEGF در رگ زایی است(۳۷) و EGF در تحرک فیبروبلاست‌ها 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 دندانی ساخته شده از تیتانیوم را به حداکثر برساند. غشای فیبرینی کلاته مشتق از پلاسما 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 برون تنی 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.17359260.1401.32.210.9.2]

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-1α 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.17359260.1401.32.210.9.2]

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, Sheykhhasan 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 nanofber 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 e ffect 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.17359260.1401.32.210.9.2]

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, Juodzbalys 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, Kalhor N, Mehdizadeh M, Sheykhhasan 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.17359260.1401.32.210.9.2]