

# ORIGINAL ARTICLE

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

Mahdieh Ghiasi<sup>1</sup>,  
Mohammad Mehdizadeh<sup>2</sup>,  
Liela Khatib shad<sup>3</sup>

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

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

<sup>3</sup> 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 استئوژنر

مهدیه قیاثی<sup>۱</sup>

محمد مهدیزاده<sup>۲</sup>

لیلا خطیب شاد<sup>۳</sup>

### چکیده

**سابقه و هدف:** مهندسی بافت و سلول درمانی به عنوان درمان‌های امیدوار کننده، این امکان را جهت ترمیم ضایعات و نقایص استخوانی می‌تواند فراهم نماید. داربست‌های ترکیبی، پلیمرهای سنتیک و طبیعی می‌توانند بستر مناسبی برای WJ-SCs به سلول‌های استخوانی را فراهم سازند. در این مطالعه تاثیر فاکتورهای رشد خونی لیوفیلیزه در پیشبرد فرآیند استئوژنر حائز اهمیت می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** ابتدا داربست‌های نانولیفی PCL-Gel با روش الکترورسی تهیه و همچنین برای تهیه غشا، از افراد داوطلب خون جمع‌آوری و فاکتورهای رشد آن استخراج و بر روی لایه‌های نانوفیبری لود گردید. سپس در فریزر ۰-۲۰°C- به مدت ۳ روز و در نهایت فریز داری بر به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت و از لحظه ساختاری با میکروسکوپ الکترونی بررسی و با اشعه گاما استریل گردیدند. در ادامه WJ-SCs بر روی داربست‌ها کشت داده شد. به منظور بررسی ماندگاری سلول‌ها و بیان ژن‌های ALP، RUNX2، COL1 و COLX 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-SCs و بیان ژن‌های ویژه استخوانی در غلاظت بیشتر تر ترکیب فاکتورهای رشد مشتق از خون/داربست پلی کاپرولاکتون / ژلاتین به طور معنی داری بیشتر است ( $P<0.001$ ).

**استنتاج:** افزایش غلاظت فاکتورهای رشد خونی در داربست‌های طراحی شده، فرایند استئوژنر را تسهیل کرد.

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

### مقدمه

آل‌گرفت‌ها، زنو‌گرفت‌ها و مواد مصنوعی مانند سرامیک، پلیمرها و کامپوزیت‌ها می‌باشد<sup>(۲)</sup>. از آن‌جا که هر کدام از مواد طبیعی دارای معايب خاصی می‌باشند، اخیراً داربست‌های مصنوعی به عنوان جایگزینی برای استخوان آسیب دیده، مورد توجه محققان قرار گرفته‌اند<sup>(۳)</sup>.

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<sup>(۱)</sup>. روش‌های مختلفی برای بازسازی نقایص بافت استخوان بزرگ وجود دارد که شامل پیوند مواد طبیعی مانند استخوان اтолوگ،

E-mail: mahdieh.ghiasi@yahoo.com

دانشگاه علوم پزشکی تهران، مرکز تحقیقات و بانک فرآورده‌های پیوندی ایران

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

دانشیار، گروه جراحی نک و صورت،

دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران

۲. کارشناسی ارشد شیمی محض، مرکز تحقیقات و بانک فرآورده‌های پیوندی ایران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳. تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۹ تاریخ ارجاع چهت اصلاحات: ۱۴۰۰/۱۲/۸ تاریخ تصویب: ۱۴۰۰/۱۲/۳

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) و PDGF (Platelet-derived growth factor)، VEGF (Vascular endothelial growth factor) سبب افزایش سرعت ترمیم بافت‌های نرم و سخت و فالسازی پلاکت‌ها و در نهایت آزادسازی فاکتورهای رشد و سایتوکاین‌ها می‌گردد(۱۲۱۳). علاوه بر این، سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها در فرآیند بهبودی و مسیر تنظیم کننده سیستم ایمنی نقش دارند، یعنی IL-8(Interleukin-8)، IL-1 $\beta$  (Interleukin 1 beta)، MCP-1(Monocyte chemoattractant protein-1) و MCP-3(Monocyte chemoattractant protein-3)، MCP-2 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 بهسازی در مهندسی بافت دارد و می‌تواند به عنوان یک عامل کمک کننده به جهت اصلاح سطح مواد سنتیک باشد. با توجه به ضرورت بازسازی استخوان در اولین لحظات، هماutom 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 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

در حال حاضر، چالش‌های علمی مهندسی بافت استخوان، ایجاد داربست‌های سه بعدی (سه بعدی) زیست تخریب‌پذیر و زیست ساز گارپذیر در اشکال و اندازه‌های مختلف با خواص مکانیکی و تخلخل مطلوب است(۴). نانوالیاف الکتروریسی شده زیست ساز گار به علت داشتن نسبت سطح به حجم بالاتر، به طور گسترده‌ای برای تحقیقات در مهندسی بافت استفاده می‌شوند. از میان انواع نانوالیاف‌های الکتروریسی شده زیست ساز گار، می‌توان به نانوالیاف پلی کاپرولاکتون (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 ساز گارپذیری و زیست تخریب‌پذیری و تاییدیه FDA در زمینه‌های مختلف پزشکی استفاده می‌شود(۵). ژلاتین (Gel (Gelatin) هم یک ماده زیستی طبیعی و یک نوع پروتئین طبیعی با وزن مولکولی بالا است که توسط هیدرولیز اسیدی یا قلایی کلارن تولید می‌شود و به دلیل هزینه کم، عدم سمتی سلولی و غیر اینم 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 سیار، 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). در محیط فیزیولوژیک بدن، بدون اثرات نامطلوب بر متابولیسم سلولی، می‌تواند به عنوان یک بستر مناسب برای 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

بررسی مارکرهای سطحی *WJ-MSCs*  
مارکرهای CD34، CD44، CD90 و CD105 با روش فلوراسیومتری با دستگاه FACS caliber ساخت شرکت B.D انجام شد.

تمایز *WJ-MSCs* به سلول‌های استخوانی (تعیین هویت چند توانی سلول‌ها)  
 $10^4 \times 5$  بروی داربست‌ها در پلیت‌های ۶ خانه با محیط تمایزی شامل α-MEM حاوی ۱۰ درصد FBS، ۱ درصد Pen/Strep، ۲ میلی مولار α-گلوتامین، ۱۰ میلی مولار بتا-گلیسرول فسفات، ۱۰۰ نانومولار دگراماتازون و ۵۰ میکرومولار آسکوربیک اسید به مدت ۲۱ روز در دمای  $37^\circ\text{C}$  و ۵ درصد CO<sub>2</sub> انکوبه شد. برای ارزیابی تمایز، رنگ آمیزی آلیزارین رد به منظور تشخیص ذخایر کلیسمی صورت گرفت.

تمایز *WJ-MSCs* به سلول‌های غضروفی (تعیین هویت چند توانی سلول‌ها)  
 $10^4 \times 5$  بروی داربست‌ها در پلیت‌های ۶ خانه با محیط تمایزی حاوی محیط TGF-β3 و DMEM-High glucose و ۱۰ نانوگرم ITS، ۱۰ نانوگرم BMP-6، ۱ میکرومولار دگراماتازون، ۵۰ میکرومولار فسفوآسکوربات و ۱ درصد Pen/Strep به مدت ۲۱ روز در دمای  $37^\circ\text{C}$  و ۵ درصد CO<sub>2</sub> انکوبه شد. ارزیابی تمایز با روش رنگ آمیزی آلتین بلو انجام شد.

#### ساخت داربست *Gel/PCL - PRFM*

*Gel/PCL* با نسبت ۳۰:۷۰ در اسید استیک/اسید فرمیک با نسبت ۱:۹ آماده و جهت الکترورسی استفاده شد. نانوالیاف‌ها در بازه زمانی ۲ ساعت و سرعت ۲ ml/h و با چرخش ۲۵۰ rpm ولتاژ ۲۵ KV جمع آوری شد. در مرحله دوم نیز غشا PRFM را تهیه و به لایه‌های نانوفیری افزوده می‌شود. به این ترتیب که ابتدا از هر یک از داولیین ۲۰ میلی لیتر خون همراه با ماده ضد انعقاد سیتراته جمع آوری و پس از دو بار سانتریفیوژ با

پروفیروتیک در محل آسیب، احتمالاً به ایجاد تعادل بافت استخوانی کمک می‌کنند (۱۴-۱۶). از دیگر عناصر دخیل در مهندسی بافت، سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs(Mesenchymal Stem Cells)) هستند که دارای توانایی خود نوزایی و تمایز به انساع مختلفی از بافت‌ها بوده و می‌توان آن‌ها را از WJ-MSCs (Wharton's Jelly Mesenchymal Stromal Cells) که سلول‌های بنیادی ژله وارتون هستند و حالت میانی بین سلول‌های بنیادی جنینی (Embryonic Stem Cells: ESC) و MSCs های بالغ با حداقل واکنش ایمنی و اثرات تعديل کننده ایمنی، را نشان می‌دهند، کاندیدی ایده‌آل برای مهندسی بافت استخوان به شمار می‌رود (۱۷). با توجه به اهمیت موضوع، تمرکز مطالعه حاضر بر بررسی *WJ-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.

جاداسازی، 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 (کلاژنаз تیپ ۱  $0/075$  درصد) به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد. پس از آن با محیط FBS(Fetal bovin serum) ۱۰ درصد α-MEM حاوی ۱۰ درصد Pen/Strep و ۲۰ FBS درصد α-MEM درصد کشت داده شد. سپس در داخل انکوباتور با دمای  $37^\circ\text{C}$  و ۵ درصد CO<sub>2</sub> درصد قرار گرفت.

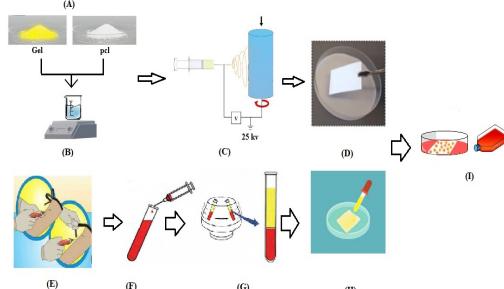
PRGF (5 ml/mg) در غلظت‌های مختلفی از MTT (50% ، 20%) با استفاده از دستگاه ELISA Reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری گردید.

تمایز به سلول‌های استخوان تمايز  $10^5$  (WJ-MSCs) 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 ویژه سلول‌های استخوانی با روش ReaTime- PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

*بررسی بیان ژن‌ها با روش ReaTime- PCR*  
بدین منظور داربست‌های تیمار شده جهت استخراج RNA استفاده شدند. در ابتدا داربست‌ها در ازت مایع خرد شده و سپس RNA‌ها با استفاده از کیت (Bioneer Co., Daedeok-gu, Daejeon, Korea) و طبق دستورالعمل مربوطه، استخراج گردیدند. RNA‌ها بالافصله 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) .Rotor Gene 6000 Real-Time PCR Machine (Corbett Life Science, Australia) انجام گرفت. در این مطالعه از ژن خانه‌داری مرجع "بنا-اکتین" استفاده شد. پرایمرهای اختصاصی ژن مرجع و ژن‌های مورد نظر توسط software, Primer version 3 (Applied Biosystems) Express USA, TX, Austin طراحی شدند (جدول شماره ۱).

سرعت ۱۸۰۰ rpm به مدت ۱۲ min تغليظ پلاکتی انجام و PRGF تهیه شد. بدین ترتیب که با افزودن  $10\text{CaCl}_2$  درصد به PRGF بر روی صفحات نانوفیری داربست چند لایه ترکیبی تشکیل شد. داربست‌ها با استفاده از اشعه UV استریل شدند (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: مراحل ساخت (A) وزن PCL-Gel/PCL-PRFM، (B) مخلوط کردن با اسید و همگن‌سازی، (C) الکتروریسی، (D) لایه‌های نانوفیری، تهیه (E) خونگیری از داوطلبین، (F) تخلیه خون در داخل لوله‌های ۹ ml، (G) سانتریفیوژ به مدت ۱۲ min و (H) قرار گیری فلکتورهای رشد مشتق از خون بر روی لایه‌های نانوفیری 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.

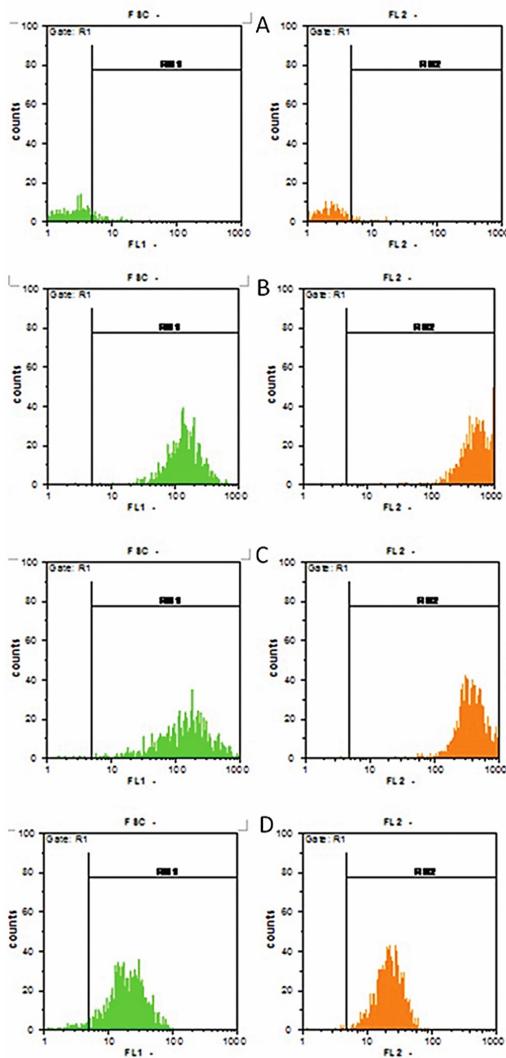
### تست MTT

MTT یک روش رنگ سنجی برای اندازه گیری میزان تکثیر و زنده ماندن سلول‌ها است (۱۹). برای به دست آوردن بهترین غلظت جهت تیمار توسط PRGF، WJ-MSCs  $(1 \times 10^5)$  بر روی داربست‌ها کشت داده شدند. پس از طی ۳ روز میزان ماندگاری سلول‌ها با

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

Size of product	Antisense strand	Sense strand	ژن
114 bp	AGGTTACAATGTGCCGAG	TGGGGTGGCTTAGGATGG	$\beta$ -actin
136 bp	TGGCAGTCACATGGCAGATT	CTTGGGTGGGGAGGATTC	RUNX2
132 bp	TGGTGGACCAGGAGTACCTT	GCTGAACGATACCAAATGCC	COLX
122 bp	GTCTCACCAACGATCACCTT	CTCCTGGAGCATCTGGAGAC	COLI
200 bp	GTACTGGCGAGACCAAGCGCA	AGGGAACTTGTCCATCTCC	ALP

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



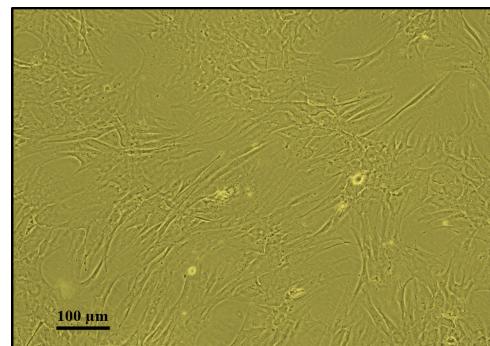
تصویر شماره ۱: بیان مارکرهای (A، CD44(B، CD34(C و CD90(D) در سلول های بنیادی ژله وارتون

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 فیبروبلاستی هستند (تصویر شماره ۲).

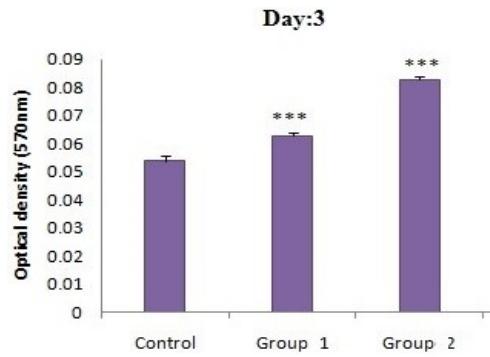


تصویر شماره ۲: بررسی مورفولوژی WJ-MSCs زیر میکروسکوپ نوری معکوس (بزرگنمایی  $\times 20$ )

### فلوسمتومتری

مارکرهای سلول های بنیادی ژله وارتون به ترتیب شامل (A) CD90 (B)، CD44(C)، CD34(D) و CD105. همان طوری که در تصویر نشان داده شده است، این سلول ها مارکرهای CD90، CD44 و CD34 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

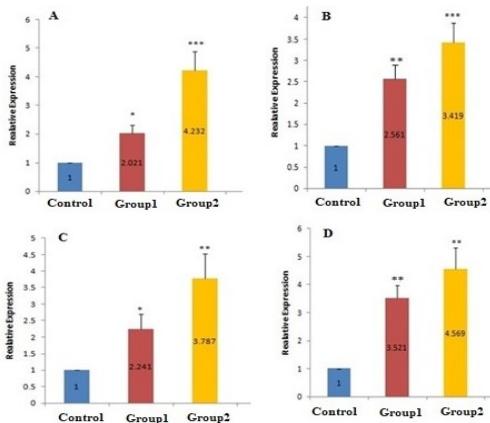


نمودار شماره ۲: بررسی WJ-MSCs تحت تأثیر غلظت‌های مختلف PRGF در روز ۳ بیشترین غلظت تأثیر را بر بقاء سلول‌ها داشت (\*P<۰.۰۰۱)، (\*\*P<۰.۰۵)، (\*\*P<۰.۰۱).

نتایج به صورت میانگین ± SEM گزارش شده‌اند.

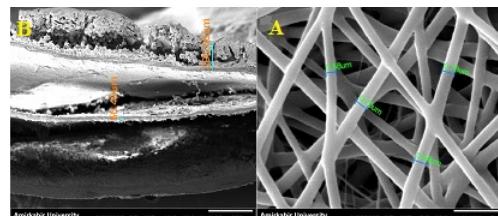
Control (PCL/Gel-Stem cells),  
Group1:2nanofiber/1PRGM (20%),  
Group2:3nanofiber/2PRGM (50%)

بررسی تمایز WJ-MSCs به استخوان توسط Real-Time PCR نتایج نشان داد که پس از ۲۱ روز بیان ژن‌های Coll I, Coll X, RUNX2, ALP در گروه با غلظت ۸ λ نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری بیشتر است (نمودارش ماره ۳).



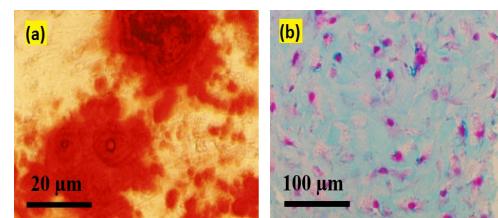
نمودار شماره ۳: بررسی تأثیر غلظت‌های PRGF بر بیان ژن‌ها: (A: COLLI, B: COLX, C: RUNX2, D: ALP). (\*\*P<۰.۰۰۱)، (\*\*P<۰.۰۵)، (\*\*P<۰.۰۱).

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، ۳۰/۷۰ Gel/PCL (B)، WJ-MSCs به سلول‌های استخوان و غضروف تمایز

رسوب قرمز رنگ به عنوان رسوب کلسیم با رنگ آمیزی 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 رنگ آمیزی با Alcian blue و ایجاد کنترast با نوکلئار فست رد، ماتریکس خارج سلولی شدیداً آبی شده، که نشان‌دهنده حضور گلیکوز‌آمنو‌گلیکان‌های 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 ۲۰ X (b) رنگ آمیزی با Alcian blue روی سلول‌های تمایز یافته به سلول‌های غضروفی با بزرگنمایی ۲۰ X

بررسی زندگانی WJ-MSCs توسط آزمون MTT اثر غلظت‌های مختلف PRGF در روز ۳ بر میزان زندگانی سلول‌های 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 خدمات استخوانی با سلول های بنیادی مزانشیمی و انواع داربست های سنتیک 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 نانوفیر ترکیبی با PRGM با غلظت ۵۰ درصد بیشترین اثر بقاء و ماندگاری بر WJ-MSCs و بیان ژن های ویژه سلول های استخوانی دارد.

پلیمر های طبیعی، هنگامی که به تنها بی استفاده می شود، مستعد تخریب سریع تر در مقایسه با پلیمر های 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 رویشی نشان داد که الیاف مورفولوژی صاف و تصادفی داشتند (۲۲). مطالعه Preeth نشان داد که کمپلکس کوئرسین - 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 نانوفیر را با افزودن عوامل دیگر بهبود بخشید.

Binulal و همکاران از داربست نانوفیری PCL/Gel الکترونی شده به همراه سلول های بنیادی برای مهندسی بافت استخوان استفاده کردند. سلول های بنیادی مزانشیمی بر روی آنها 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

دو فازی برای تحویل ۲ BMP 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 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، TGFbeta1، فاکتور رشد اندوتیال عروقی (VEGF)، اساساً VEGF-A، فاکتور اصلی FGF-2 رشد فیربولاست (bFGF)، همچنین به عنوان ۲ FGF-1 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 تغییل 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 استئوآرتیت 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 (۲۹). 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.

دخلی هستند(۳۸). علاوه بر این، فیبرین، در اتصال، رشد و تکثیر سلولی و در رگزایی از طریق تحریک رشد سلول‌های اندوتیال 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 اتلوجیک می‌تواند تمایز سلول‌های استئوبلاست از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تولید ماتریکس استخوانی کلسفیه و ادغام استخوانی ایمپلنت‌های دندانی ساخته شده از تیتانیوم را به حداکثر برساند. غشاء 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 بلاکت پیشتر 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 به عنوان یک عامل کمک‌کننده در افزایش کیفیت نانوفیبر PCL/Gel می‌باشد و می‌تواند به استخوانی در 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

- Majidinia M, Sadeghpour A, Yousefi B. The roles of signaling pathways in bone repair and

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

نتایج یک مطالعه مشخص کرد که PDGFs و قتی هماره با Bovine bone mineral(BBM) 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 تنایی نشان دادند. جالب توجه است، استفاده از PRGF به طور قابل توجهی باعث افزایش قابل توجه تماس بیومواد با استخوان شد. علاوه بر این، در مقایص درمان شده با BBM/PRGF در مقایسه با گروه بهبود یافته خودبخودی پس از ۲ و ۸ هفته پس از پیوند تشکیل استخوان جدید بیش تری مشاهده شد(۳۳). نتیجه بررسی یک مقاله مروری این بود که PRGF هماره 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 بلاکت‌ها آزاد می‌شوند و این پروتئین‌های فعال بیولوژیکی نقش مهمی در بازسازی بافت ایفا می‌کنند: مشخص شده است که PDGF اثر میتوژنیک قوی بر روی سلول‌های بنیادی و استئوبلاست‌ها دارد(۳۵-۳۶)، TGF موثر در تولید ماتریکس خارج سلولی، VEGF در رگزایی است(۳۷) و EGF در تحرک فیبروبلاست‌ها و پیش استئوبلاست‌ها

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, Source 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 $\alpha$  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, Sheykhhassan 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 JM, 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, 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, Sheykhsan 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.