

بررسی رشد سلول‌های کندروسیت گاو بر روی داربست نانوالیاف الکترونیسی شده فیبروئین ابریشم / کیتوزان

آزاده جعفرزاده^۱، خسرو حسینی پژوه^۲ Ph.D.*، مهران کیانی راد^۲ Ph.D.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران

۲- پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: pajoooh@irost.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۷/۱۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۳/۲۳

چکیده

هدف: هدف این مطالعه بررسی اتصال و رشد سلول‌های غضروفی گاو بر روی داربست نانوالیاف فیبروئین ابریشم و کیتوزان طراحی و ساخته شده توسط مولفین جهت استفاده در مهندسی بافت غضروف مفصلی بود.

مواد و روش‌ها: سلول‌های کندروسیت جدا شده از غضروف ۳ گوساله به داربست مذکور منتقل شده و برای ۳۰ روز کشت داده شدند. چسبندگی و میزان رشد سلول‌ها با تصویر برداری میکروسکوپ الکترونی و روش‌های رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین و DAPI ارزیابی و غضروف زایی با رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون جهت ارزیابی تولید کلاژن و رنگ‌آمیزی سافرانین آ جهت ارزیابی تولید پروتئوگلیکان‌ها و تعیین مقدار گلیکوزآمینوگلیکان سولفاته توسط دی متیل متیلن بلو بررسی شد.

نتایج: نتایج نشان دادند که سلول‌های کندروسیت به خوبی بر روی داربست متصل شده و تکثیر یافته بودند. تعداد سلول‌های کشت داده شده پس از یک ماه ۴ تا ۵ برابر شده بودند. همچنین بررسی تولید کلاژن، پروتئوگلیکان و گلیکوزآمینوگلیکان نشان داد که بافت غضروفی به خوبی بر روی داربست تشکیل شده بود.

نتیجه‌گیری: داربست نانوالیاف کیتوزان/ فیبروئین ابریشم می‌تواند به عنوان کاندید مناسبی برای داربست‌های مهندسی بافت باشد، هم به لحاظ ایجاد دمین‌هایی برای اتصال سلولی به خاطر ماهیت پروتئینی (فیبروئین ابریشم) و پلی ساکاریدی (کیتوزان) آن و هم به لحاظ قطر نانوالیاف که نزدیک به قطر پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی بافت است.

واژگان کلیدی: مهندسی بافت، کندروسیت، داربست، فیبروئین ابریشم، کیتوزان

مقدمه

از سال ۲۰۰۰ میلادی استفاده از پلیمرهای زیست تخریب پذیر طبیعی و مصنوعی، برای ساخت نانوالیاف به منظور کاربردهای زیست پزشکی وارد عرصه ظهور شد. این پلیمرها برای برنامه‌های کاربردی به‌ویژه استفاده در مهندسی بافت و دارو رسانی در حال تست هستند (۱). الکتروریسی یک روش ساده و کارآمد است که توسط آن می‌توان داربست‌های متشکل از الیاف در مقیاس نانو تا میکرومتر تولید کرد که قابل مقایسه با قطر الیاف اجزای ضروری ماتریکس خارج سلولی سلولی یا ECM (Extracellular Matrix) است (۲). در این فرآیند از یک ولتاژ بالا برای تشکیل نانو الیاف از پلیمر محلول در حلال آلی فرار استفاده می‌شود.

از جمله پلیمرهای مورد استفاده در ساخت داربست‌های بافتی، پلیمر کیتوزان است. کیتوزان یک پلیمر کاتیونی زیست تخریب‌پذیر است که یک سطح آبدوست را برای توسعه چسبندگی سلولی، تکثیر و تمایز آن‌ها فراهم می‌کند. گلیکوزآمینوگلیکان‌های سولفات‌ه که از جمله مولکول‌های فراوان در ماتریکس خارج سلولی هستند براحتی به این پلیمر که دارای بار مثبت است متصل می‌شوند (۳، ۴). الیاف کیتوزان و کیتین به‌عنوان یک پانسمان زیست‌سازگار و یا مواد پوشش دهنده برای تسریع ترمیم زخم انسان و حیوانات آزمایش شده است (۵). این پلیمر از فعالیت ضدباکتریایی و زیست‌سازگاری خوب در برابر پاسخ میزبان برخوردار است. بنابراین ایمپلنت‌های حاصل از آن با حداقل واکنش‌های ایمنی روبروست (۳). کیتوزان ساختاری شبیه به گلیکوز آمینوگلیکان‌ها (پلی‌ساکاریدهای موجود در ECM) دارد و دارای دمین‌های زیادی برای اتصال سلول‌ها (۶) و فاکتورهای رشد می‌باشد. این پلیمر در بدن توسط آنزیم لیزوزیم براحتی تجزیه می‌شود. مشکل عمده کیتوزان خواص مکانیکی ضعیف آن است که مشکل عمده پلیمرهای طبیعی است که برای غلبه بر آن بهتر است با پلیمر دیگری با خواص مکانیکی بهتر، همراه باشد (۷).

پلیمر دیگر مورد استفاده ساخت داربست‌ها، پلیمر فیبروئین ابریشم (Silk fibroin) است. ابریشم ماده‌ای زیست‌سازگار است و سالهاست که به‌عنوان نخ بخیه استفاده می‌شود (۸). فیبروئین ابریشم یک پروتئین فیبری است که رشته‌های ابریشم را تشکیل می‌دهد و

حدود ۷۰ تا ۷۵ درصد وزن ابریشم را تشکیل می‌دهد و توسط سریسین که پروتئین چسب ماندنی است کنار هم نگه داشته می‌شوند. فیبروئین خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به فردی را داراست. سریسین خواص مکانیکی ضعیف‌تری نسبت به فیبروئین داشته و نسبت به تغییرات pH و دما حساس می‌باشد (۹). ابریشم پس از صمغ‌گیری (جداسازی سریسین) تنها حاوی فیروئین است که از اسیدهای آمینه گلایسین، آلانین و سرین تشکیل شده که در تشکیل ساختار منظم و کریستالی فیبروئین شرکت دارند (۱۰).

به‌منظور ترمیم بافت غضروف مفصلی بررسی‌هایی جهت ساخت یک داربست مناسب از نانوفیبر فیبروئین ابریشم و کیتوزان به‌روش الکتروریسی توسط مولفین انجام شد. با توجه به ویژگی‌های مطلوب به دست آمده از داربست نانوفیبر فیبروئین ابریشم و کیتوزان ساخته شده با نسبت ۵۰-۵۰ و ۷۰-۳۰، این تحقیق جهت بررسی کشت برون تنی سلول‌های کندروسیت گوساله بر روی این داربست‌ها و ارزیابی زیست‌سازگاری، توانایی تکثیر و چسبندگی سلول‌ها و در نهایت کارایی این داربست‌ها جهت استفاده در ترمیم بافت غضروف مفصلی انجام شد.

مواد و روش‌ها

داربست مورد استفاده: در این مطالعه از داربست نانوفیبر سه بعدی متخلخل فیبروئین ابریشم/کیتوزان با نسبت ۵۰-۵۰ و ۷۰-۳۰ تهیه شده به‌روش الکتروریسی که در پژوهشکده بیوتکنولوژی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران طراحی و ساخته شد استفاده شد. این داربست دارای ساختار متخلخل یکنواخت، تخلخلی حدود ۸۵ درصد و قطر فیبرهای آن نیز دارای گستره‌ای از ۵۰ تا ۱۷۰ نانومتر می‌باشد (به‌ترتیب با میانگین قطر 138.5 ± 24.51 و 148.8 ± 52.32 نانومتر). خواص مکانیکی داربست‌های مورد استفاده به‌ترتیب به شرح زیر است: مقاوت کششی (Breaking tenacity) 1.14 ± 0.03 و 2.2 ± 0.02 مگاپاسکال، ازدیاد طول تا پارگی (Elongation at break) 2.8 ± 0.04 درصد و مدول الاستیسیته یا مدول یانگ (Young's Module) 0.8 ± 0.051 و 0.2 ± 0.08

گرفتند. سلول های کندروسیت پس از پر شدن فلاسک ها، با استفاده از آنزیم تریپسین، از فلاسک جدا شد و به هر داربست تعداد 3×10^4 سلول اضافه شد و تا ۳۰ روز در شرایط CO_2 ، ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. محیط کشت شامل: DMEM L-Glucose، FBS 10%، Pen/Strep، L-proline 0.4 mM، Sodium Pyrovalate 0.1mM و Dexamethasone 0.1 μ M بود (۱۶، ۱۷). محیط کشت هر ۲ تا ۳ روز تعویض شد. داربست های کشت شده مورد بررسی های زیر قرار گرفتند.

رنگ آمیزی هماتوکسیلین / ائوزین (H&E): این رنگ آمیزی به منظور بررسی روند رشد و گسترش سلول ها در روزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ کشت از هر دو داربست (هر کدام سه تکرار) انجام گرفت. بعد از خارج کردن محیط کشت از روی داربست ها نمونه ها با PBS شستشو داده شد. به منظور فیکس کردن سلول ها، نمونه ها برای با استن برای یک شب در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قرار گرفتند و سپس با PBS شستشو داده شدند. از رنگ هماتوکسیلین برای ۵ دقیقه برای رنگ آمیزی هسته سلول ها استفاده شد. برای پاک کردن رنگ اضافی هماتوکسیلین از سیتوپلاسم سلول ها شستشو با آب مقطر و PBS انجام شد. پس از آن رنگ ائوزین به مدت ۵ دقیقه برای رنگ آمیزی سیتوپلاسم سلول ها استفاده شد. مجدداً شستشو با آب مقطر و PBS برای حذف رنگ اضافی ائوزین انجام شد. آنالیز نمونه ها توسط میکروسکوپ نوری دیجیتال (Olympus DP71) انجام گرفت. در رنگ آمیزی هماتوکسیلین / ائوزین هسته سلول را به رنگ آبی و سیتوپلاسم به رنگ صورتی دیده می شوند.

در پایان ۳۰ روز کشت، از داربست ها برش های بافتی توسط دستگاه میکروتوم صورت گرفت و با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شد. برای تهیه برش های بافتی از این داربست ها، نمونه ها پیش از بلوک گیری با پارافین، در بوئن فیکس شدند. سپس با دستگاه میکروتوم مقاطع ۵ میکرومتر از آن ها تهیه شد. پس از دپارافینه کردن لام های تهیه شده، نمونه ها تحت رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین قرار گرفتند. رنگ آمیزی مقاطع

مگاپاسکال. میزان تخریب پذیری این داربست ها نیز $0.2/12 \pm$ درصد از کل وزن داربست پس از ۱۲ هفته بود. جداسازی سلول های کندروسیت: نمونه های غضروف مفصلی با اندازه تقریبی ۱ سانتی متر مکعب از ۳ گوساله ی تازه ذبح شده در کشتارگاه تهیه شد. بدین منظور نمونه های جدا شده در داخل محیط کشت DMEM L-Glucose (1% Pen/Step, Gibco) تا آزمایشگاه حمل شد. نمونه ها پس از شستشوی در PBS، در شرایط استریل به قطعات حدود $1mm^3$ تقسیم شدند. قطعات مربوط به هر نمونه در فالكون های جدا ریخته شد. به هر نمونه محیط DMEM حاوی w/v، ۰/۲۵ درصد آنزیم تریپسین (Gibco) افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در شیکرانکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از ۳۰ دقیقه تریپسین با محیط حاوی سرم خنثی و سانتریفیوژ شد (۱۱، ۱۲). پس از دور ریختن مایع رویی، به نمونه ها محیط DMEM حاوی آنزیم کلاژناز I (Gibco-17100017) با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر اضافه شد و مجدداً در شیکرانکوباتور برای ۱۶ ساعت انکوبه شدند (۱۳، ۱۴). پس از گذشت این زمان مجدداً سلول ها سانتریفیوژ شده و مایع رویی دور ریخته شد. به هر فالكون DMEM 5ml حاوی FBS، ۱۰ درصد و $100U/mL$ پنسیلین و 100 میکروگرو بر میلی لیتر استرپتومایسین (محیط کامل) اضافه شده و در فلاسک های ۲۵ سانتی متر مکعب در انکوباتور و در شرایط CO_2 ، ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد. هر ۲ تا ۳ روز محیط آن تعویض شد که پس از حدود ۷ روز فلاسک ها پر شدند.

کشت سلول های کندروسیت بر روی داربست

نانوالیاف: در ابتدا نانوالیاف ساخته شده در یک محلول با ترکیب اتانول / آمونیاک با غلظت ۷ و ۷۰ درصد تحت تیمار شیمیایی قرار گرفتند (۶، ۱۵). این عمل باعث تغییرات شیمیایی در نانوالیاف و نامحلول شدن نانوالیاف می شود (۶). این داربست ها سپس توسط پانچ به صورت دایره هایی با قطر ۰/۵ سانتی متر پانچ شدند. پیش از کشت سلول داربست های پانچ شده با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه استریل شدند.

داربست های پانچ شده در دو گروه ۵۰:۵۰ و ۷۰:۳۰ و برای هر تکرار چهار داربست در پلیت های ۴۸ خانه قرار

(GAG) به طور مستقیم در نمونه‌ها، از رنگ اختصاصی دی متیل متیلن بلو (sigma-341088) DMMB استفاده شد. این رنگ به طور اختصاصی به GAG سولفات‌ها بافت متصل می‌شود و در طول موج ۵۳۰ تا ۶۳۰ نانومتر بیشترین جذب نوری را دارد (۱۶). برای این منظور نمونه‌ها (روزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰) ابتدا با آنزیم پروتئیناز K طی ۲۴ ساعت هضم شده و سپس به پلیت ۹۶ خانه انتقال یافتند. سپس به هر نمونه ۲۰۰ میکرولیتر از رنگ DMMB اضافه شد. کندروئیتین سولفات A (sigma-C9819) به عنوان کنترل جهت تهیه نمودار استاندارد غلظت گلیکوزآمینوگلیکان استفاده شد (با غلظت‌های ۰/۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) (۱۸، ۱۹). با اندازه‌گیری میزان جذب کندروئیتین سولفات و رسم نمودار استاندارد، غلظت GAG در بافت تولید شده در زمان‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز برای هر دو داربست ۵۰:۵۰ و ۷۰:۳۰ اندازه‌گیری و میزان غضروف زایی این دو مقایسه شد.

آنالیز آماری

محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار spss و به روش آزمون آنوا با سطح معنی داری $p < 0/05$ انجام شد.

نتایج

مورفولوژی و اتصال سلول کندروسیت به سطح داربست

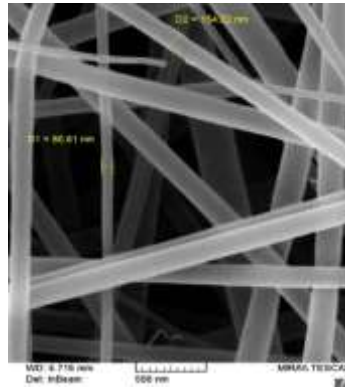
برای بررسی مورفولوژی سلول‌ها بر روی سطح داربست از تصاویر میکروسکوپ SEM استفاده شد. در شکل ۱، تصویر داربست ۵۰-۵۰ قبل از کشت و در شکل ۲ تصویر تهیه شده از داربست پس از کشت ۲۰ روزه مشاهده می‌شود. مورفولوژی کروی سلول و تشکیل ECM سلولی بر روی سطح داربست کاملاً قابل مشاهده است.

تهیه شده از داربست برای بررسی دقیق تر ساختار بافتی تشکیل شده بر روی داربست‌ها صورت گرفت.

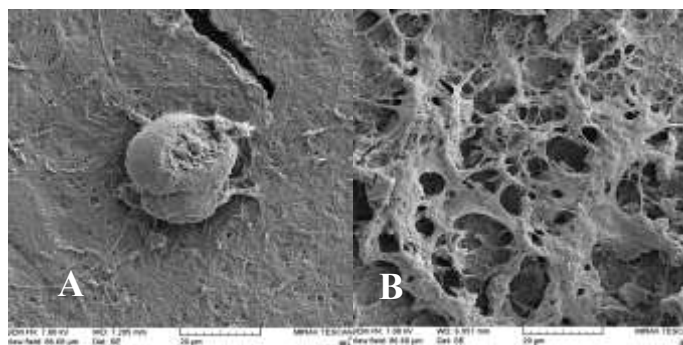
رنگ‌آمیزی هسته سلول زنده با رنگ فلورسنت DAPI
برای رنگ‌آمیزی هسته سلول زنده و شمارش آن‌ها در داربست‌ها در زمان‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز کشت (هر کدام ۳ تکرار) رنگ‌آمیزی با رنگ فلورسنت DAPI (Diaminophenylindole) صورت گرفت. این رنگ قادر است از غشای سلول زنده عبور کرده و به DNA سلول زنده متصل شود. در این بررسی رنگ DAPI بدون فیکس کردن نمونه‌ها و تنها با شستشوی آن‌ها در بافر TBS به آن اضافه شد. برای این منظور نمونه‌ها بعد از خارج کردن محیط کشت از نمونه، با بافر ۱ درصد، PBS/BSA شستشو شدند. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با رنگ DAPI (۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در تاریکی انکوبه شدند. سپس مجدداً با PBS شسته شدند و بعد از گذاشتن داربست‌ها روی لام و ریختن یک قطره گلیسرول رقیق شده با PBS با نسبت ۱ به ۱ روی بافت‌ها، لامل گذاری بر روی بافت‌ها انجام گرفت. این رنگ در محدوده ۳۶۵ نانومتر تهییج شده و در محدوده ۴۶۱ نانومتر نشر دارد. آنالیز نمونه‌ها توسط میکروسکوپ فلورسانس (Olympus BX51, Tokyo, Japan) متصل به دوربین دیجیتال (Olympus DP71) انجام شد.

رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی بافت غضروفی: برای رنگ‌آمیزی رشته‌های کلاژن به عنوان بیشترین بخش ماتریکس غضروف از رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون (در این رنگ‌آمیزی کراتین و رشته‌های عضلانی به رنگ قرمز، کلاژن به رنگ سبز یا آبی و سیتوپلاسم به رنگ صورتی دیده می‌شود) و برای بررسی تشکیل پرو تئوگلیگان‌ها از رنگ آمیزی سافرانین آ که می‌تواند به پرو تئوگلیگان‌ها متصل شود و به همین جهت برای رنگ‌آمیزی اختصاصی غضروف به کار می‌رود (ضمن اینکه با کلاژن اتصال برقرار نمی‌کند) استفاده شد. در رنگ‌آمیزی با سافرانین پروتئوگلیگان‌ها به رنگ نارنجی تا قرمز و سیتوپلاسم به رنگ سبز یا آبی دیده می‌شود. بنابراین مشاهده رنگ نارنجی یا قرمز نشان دهند تشکیل بافت غضروفی می‌باشد.

تعیین مقدار گلیکوزآمینوگلیکان سولفات (DMMB Assay): برای اندازه‌گیری مقدار گلیکوزآمینوگلیکان



شکل ۱: تصویر SEM از نانوالیاف فیبروئین ابریشم-کیتوزان با نسبت ۵۰-۵۰ بدون کشت سلول

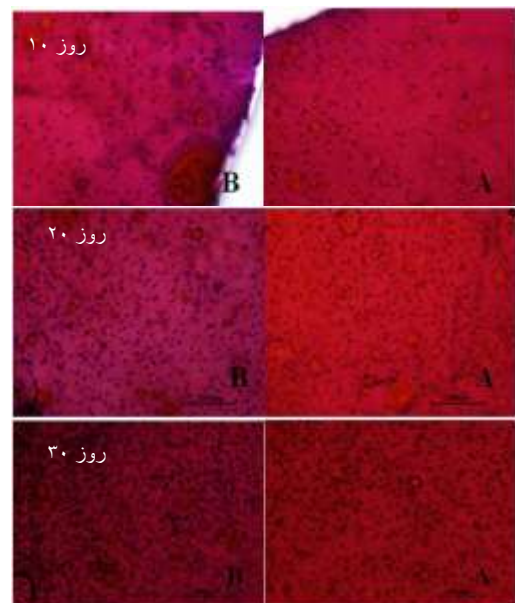


شکل ۲: تصویر SEM از نانوالیاف فیبروئین ابریشم-کیتوزان با نسبت ۵۰-۵۰ پس از کشت سلول (A) سلول کروی شکل کندروسیت بر روی سطح داربست، (B) ECM تشکیل شده بر روی سطح داربست

در ۱۰ روز اول برای داربست ۵۰ - ۵۰ بیش از داربست ۳۰:۷۰ بوده است. اما پس از گذشت ۲۰ و ۳۰ روز توزیع سلولی در هر دو داربست یکسان بوده است و سطح داربست کاملا از سلول پر شده است (شکل ۳).

رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین (H&E)

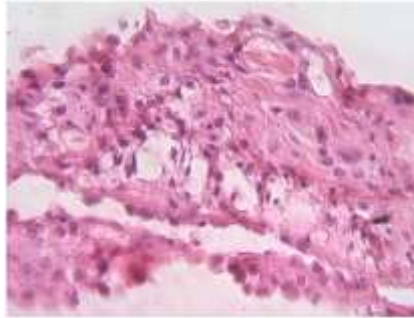
رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین نشان از اتصال و پر شدن سطح داربست با سلول های کندروسیت بود. مقایسه دو داربست نانوالیاف فیبروئین ابریشم-کیتوزان با نسبت ۳۰-۷۰ و ۵۰-۵۰ نشان داد که اتصال سلول و پرشدگی



شکل ۳: رنگ آمیزی H&E در روز ۱۰، ۲۰ و ۳۰ کشت در نمونه های بدون برش بافتی. (A) داربست ۷۰:۳۰ و (B) داربست ۵۰:۵۰. نقاط تیره رنگ هسته سلول می باشد (بزرگنمایی ۲۰۰×)

بافتی یکنواختی که توسط کندروسیت‌ها تشکیل شده قابل مشاهده است.

برای بررسی دقیق‌تر و تهیه تصاویر بهتر برش‌های بافتی از نمونه‌های ۳۰ روزه تهیه شد (شکل ۴). در این رنگ‌آمیزی که بر روی نمونه‌های برش خورده انجام گرفت ساختار

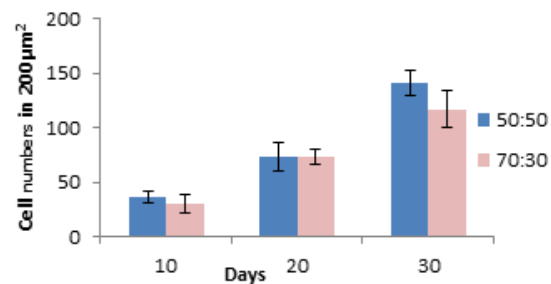


شکل ۴: رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین از برش تهیه شده از داربست ۷۰:۳۰ پس از کشت ۳۰ روزه

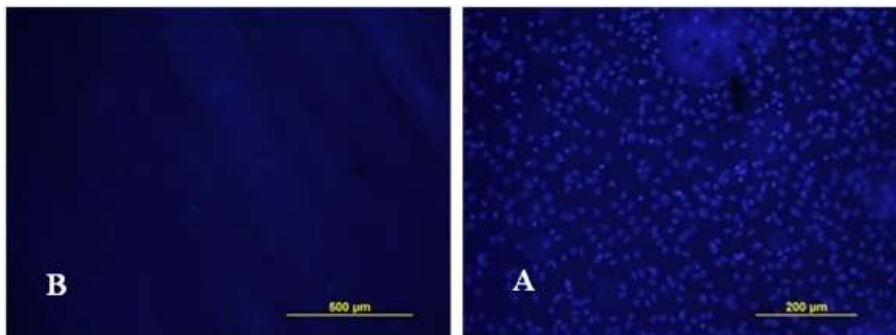
در ۲۰۰ میکرومتر مکعب از داربست کشت داده شده در روزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ در شکل ۵ و تصویر داربست رنگ‌آمیزی شده در شکل ۶ آمده است.

رنگ آمیزی DAPI برای شمارش سلول‌ها

برای شمارش سلول‌ها و به‌دست آوردن محتوی DNA از رنگ فلورسنت DAPI استفاده شد. نتایج شمارش سلولی



شکل ۵: نمودار رشد سلول‌ها در زمان‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز کشت و مقایسه رشد آن‌ها در دو داربست فیبروئین ابریشم- کیتوزان ۵۰:۵۰ و ۷۰:۳۰ (شمارش در ۲۰۰ میکرومتر مکعب)

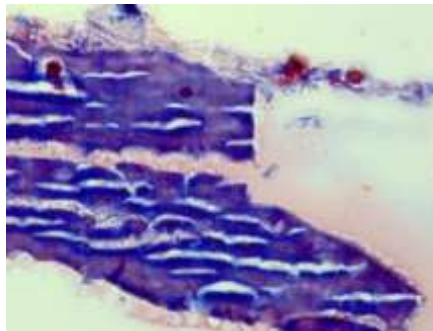


شکل ۶: تصویر (A) رنگ آمیزی هسته سلول‌های زنده بر روی داربست با رنگ فلورسنت DAPI، تصویر (B) داربست بدون سلول به‌عنوان کنترل

شد که نشانه تشکیل مقدار زیاد کلاژن در ماتریکس و ایجاد بافت غضروفی بود (شکل ۷).

رنگ آمیزی تری کروم ماسون و سافرانین آ

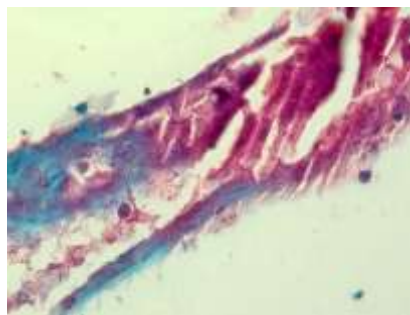
در رنگ آمیزی تری کروم ماسون داربست های برش گیری شده رشته های کلاژن به رنگ آبی به مقدار فراوان مشاهده



شکل ۷: رنگ آمیزی تری کروم ماسون. رشته های کلاژن به رنگ آبی دیده می شوند (بزرگنمایی ۲۰×)

بود (شکل ۸). با توجه به آن که این رنگ آمیزی یک ارزیابی کیفی است و تفاوت مشخصی بین داربست ۵۰-۵۰ و ۳۰-۷۰ در این رنگ آمیزی ها وجود نداشت تنها تصاویر داربست ۵۰-۵۰ در اینجا آورده شده است.

همان طور که گفته شد در رنگ آمیزی سافرانین آ رشته های پروتئوگلیکان به رنگ نارنجی تا قرمز رنگ می شوند و سیتوپلاسم به رنگ آبی یا سبز دیده می شود. در رنگ آمیزی داربست های کشت شده با این رنگ آمیزی رنگ قرمز که نشان دهنده تراکم بالای پروتئوگلیکان بوده است دیده شد که تاییدی دیگر بر تشکیل بافت غضروفی

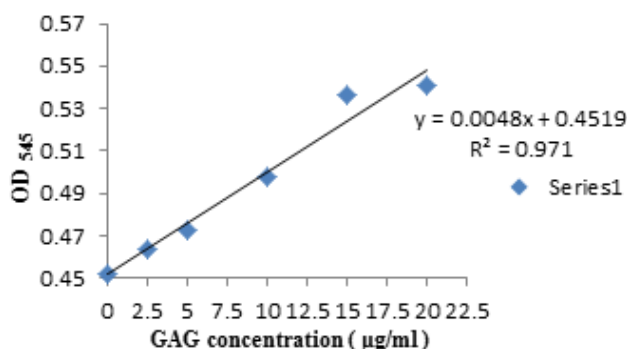


شکل ۸: رنگ آمیزی داربست کشت شده به روش سافرانین آ. رشته های پروتئوگلیکان به رنگ قرمز دیده می شوند (بزرگنمایی ۲۰×)

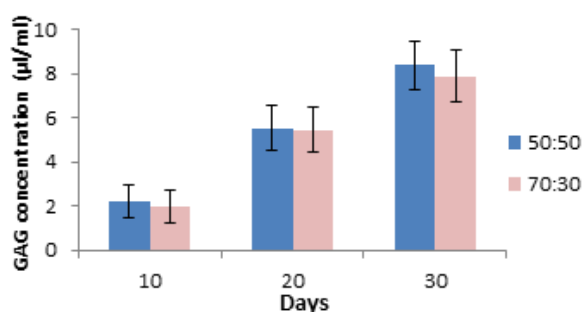
تعیین مقدار گلیکوزآمینوگلیکان (GAG)

شد. مقایسه تغییرات غلظت GAG برای هر دو نوع داربست در شکل ۱۰ نشان داده شده است.

منحنی استاندارد تهیه شده از غلظت گلیکوزآمینوگلیکان در شکل ۹ آمده است. مقادیر جذب نوری ثبت شده از نمونه های مورد بررسی با نمودار منحنی استاندارد مقایسه



شکل ۹: منحنی استاندارد گلیکوزآمینوگلیکان



شکل ۱۰: میزان تولید گلیکوزآمینوگلیکان در دو داربست ۵۰:۵۰ و ۷۰:۳۰ در زمان‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز پس از کشت

بحث

بیشتر در این داربست زمینه ساز این رشد برای سلول‌ها بوده است. برای اثبات وجود بافت غضروفی در ساختارهای حاصل از القای تمایز، روش‌های مختلف به کار می‌رود. همان‌گونه که در تحقیقات دیگر بیان شده است، وجود کلاژن نوع II و پروتئوگلیکان آگریکان نشان دهنده بافت غضروفی است. بنابراین با روش‌های ایمونوهیستوشیمی با استفاده از آنتی‌بادی‌های مربوط به ترکیبات فوق و نیز روش RT-PCR وجود بافت غضروف و القای کندروژنیک می‌تواند بررسی شود. در این مطالعه رنگ‌آمیزی تریکروم ماسون وجود رشته‌های کلاژن را در دابست به‌خوبی نشان داد. تراکم رنگ نشان از تراکم بالای کلاژن تشکیل شده و نشانه‌ای از تمایز مناسب سلول‌های مزانشیمی به بافت غضروف بود.

در این مطالعه کشت کندروسیت‌ها بدون استفاده از فاکتور رشد، برای بررسی اثر ساختار پروتئین - پلی ساکاریدی نانوالیاف بکار رفته به‌عنوان یک جایگزین برای ECM بافت غضروف بر روی داربست‌ها صورت گرفت. داربست ساخته شده در هر دو نسبت کیتوزان و فیبروئین به‌دلیل وجود کیتوزان و داشتن ساختاری مشابه گلیکوزآمینوگلیکان (GAG) و دمین‌هایی جهت اتصال سلول، بستر مناسبی را برای اتصال کندوسیت‌ها که به‌طور طبیعی جز سلول‌هایی با میزان رشد پایینی محسوب می‌شوند فراهم کرده است و این روند در اتصال سلول‌ها در ۱۰ روز کاملاً مشهود است. نمودار رشد سلول‌ها و مقایسه آن‌ها در دو داربست ۵۰:۵۰ و ۷۰:۳۰ در زمان‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز از کشت بیانگر رشد بهتر سلول‌ها بر روی داربست ۵۰:۵۰ بود. همان‌طور که گفته شد وجود پلیمر کیتوزان

استفاده کردند که میزان تولید GAG پس از سه هفته تنها $1\mu\text{g}/\text{scaffold}$ بود. در این تحقیق نیز همانند تحقیق صورت گرفته توسط Neves و همکارانش (۱۷)، از فاکتور رشد ITS استفاده شده بود.

در تحقیق دیگر انجام شده توسط Jeong و همکاران (۲۱) میزان GAG تولید شده در هر داربست پس از ۴ هفته تنها ۲ میکرولیتر گزارش شده است و این در حالی است که تعداد سلول های اولیه لود شده در هر داربست 20×10^6 سلول بوده است.

Li و همکارانش (۲۲) در بررسی میزان غضروفزایی در داربست پلی لاکتیک- کاپرولاکتون (PLCL) و پلی هیدروکسی بوتیرات - هیدروکسی والرات (PHBV) میزان تولید GAG را در بیشترین میزان، ۸ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش کرد در حالی که تعداد سلول اولیه 1×10^7 سلول بود و در مقایسه تعداد سلول گذاشته شده بر روی داربست در تحقیق حاضر تنها 3×10^4 سلول بود.

در تحقیقی که توسط Correia و همکارانش (۱۹) برای تشکیل بافت غضروف در داربست پلیمری کیتوزان - هیالورونیک اسید انجام شد، میزان تولید GAG پس از ۳۵ روز، ۸ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش شد. در این تحقیق نیز از فاکتور رشد TGF- $\beta 3$ و ITS به منظور افزایش قدرت غضروفزایی استفاده شده بود.

Silva و همکاران (۲۳) نانوالیافی از جنس پلی کاپرولاکتون - نشاسته را برای کشت کندروسیت به منظور تشکیل بافت غضروف بر روی آن ساختند. میزان تولید GAG بر روی این داربست پس از یک ماه ۲ میکروگرم بر میلی لیتر بود. در این تحقیق از انسولین و فاکتور رشد bFGF برای افزایش قدرت غضروفزایی استفاده شده بود.

مقایسه میزان گلیکوزآمینوگلیکان تولید شده در تحقیق حاضر در مقایسه با سایر تحقیقات حتی با وجود استفاده آن ها از فاکتور رشد بیشتر بوده و این

از تعیین میزان GAG نیز به عنوان شاخصی برای غضروفزایی استفاده می شود. گلیکوزآمینوگلیکان یکی از ترکیبات غضروف مفصلی محسوب می شود و تولید آن به عنوان شاخصی برای غضروفزایی کندروسیت های کشت داده شده عنوان می شود و بیانگر پویایی بافت تشکیل شده و عدم از دست دادن تمایز سلول ها است. در این بررسی نیز غلظت GAG در داربست $50:50$ بیش از داربست $70:30$ بود که این روند با توجه به رشد بیشتر سلولی بر روی این داربست قابل توجیه است. این امر می تواند به دلیل حضور بیشتر پلیمر کیتوزان در آن باشد. پلیمر کیتوزان با داشتن خواصی مشابه پروتئوگلیکان ها، بستر مناسبی را جهت اتصال سلول ها و حفظ فنوتیپ و گسترش آن ها فراهم می کند. تصاویر SEM گرفته شده پس از کشت ۲۰ روزه حضور سلول های کروی شکل بر روی داربست را تایید کرد که این امر حفظ فنوتیپ طبیعی کندروسیت ها بر روی داربست نانوالیاف فیبروئین ابریشم - کیتوزان را تایید می کند. مقایسه مقدار گلیکوزآمینوگلیکان تولید شده توسط کندروسیت ها با سایر تحقیقات صورت گرفته نشان از فعالیت غضروفزایی مطلوب این سلول ها بر روی داربست نانوالیاف فیبروئین ابریشم - کیتوزان داشته و حتی در مواردی از تحقیقاتی که در آن از فاکتورهای رشد TGF- $\beta 3$ و ITS به منظور افزایش توان غضروفزایی کندروسیت ها استفاده شده، بیشتر بوده است.

در تحقیقی که توسط Neves و همکارانش (۱۷) برای تولید بافت غضروف بر روی داربستی از جنس پلیمرهای کیتوزان - پلی کاپرولاکتون صورت گرفت، میزان تولید GAG پس از سه هفته تنها ۷ میکروگرم بر میلی لیتر بود و این در حالی بود که در تحقیق مذکور از دو فاکتور رشد ITS و TGF- $\beta 3$ که اثر مستقیمی در غضروفزایی دارد، استفاده شده بود.

Levorson و همکارانش (۲۰) به منظور تولید بافت غضروف از داربست پلی کاپرولاکتون- پلی ونیل الکل

regenerative medicine. *Advanced drug delivery reviews*. 2009; 61(12): 988-1006.

2. Tsing P. *Electrospinning natural polymers for tissue engineering applications*. 2007;

3. Puppi D, Chiellini F, Piras A, Chiellini E. *Polymeric materials for bone and cartilage repair*. *Progress in Polymer Science*. 2010; 35(4): 403-40.

4. Suh JKF, Matthew HW. *Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering :a review*. *Biomaterials*. 2000; 21(24): 2589-2598.

5. Hirano S, Zhang M, Nakagawa M, Miyata T. *Wet spun chitosan-collagen fibers, their chemical N-modifications, and blood compatibility*. *Biomaterials*. 2000; 21(10): 997-1003.

6. Chen JP, Chen SH, Lai GJ. *Preparation and characterization of biomimetic silk fibroin/chitosan composite nanofibers by electrospinning for osteoblasts culture*. *Nanoscale research letters*. 2012; 7(1): 1-11.

7. Chung C, Burdick JA. *Engineering cartilage tissue*. *Advanced drug delivery reviews*. 2008; 60(2): 243-262.

8. Kundu B, Rajkhowa R, Kundu SC, Wang X. *Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations*. *Advanced drug delivery reviews*. 2013; 65(4): 457-70.

9. Chen CH, et al. *Cartilage tissue engineering with silk fibroin scaffolds fabricated by indirect additive manufacturing technology*. *Materials*. 2014; 7(3): 2104-2119.

10. Mondal M, Trivedy K, Kumar SN. *The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, Bombyx mori Linn.,-a review*. *Caspian J Env Sci*. 2007; 5(2): 63-76.

11. Heidari M, Naghi Tahmasebi M, Etemad S, Salehkhoh S, et al. *In vitro human chondrocyte culture; a modified protocol*. *Middle-East J Sci Res*. 2011; 9(1): 102-9.

12. Mauck RL, Soltz MA, Wang CC, Wong DD, et al. *Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels*. *Journal of*

نشان از مناسب بودن بستر پروتئینی فیبروئین ابریشم و گلیکو پلی ساکاریدی کیتوزان برای اتصال و گسترش کندروسیت ها دارد. بستری که شبیه به ماتریکس خارج سلولی (پروتئین - پلی ساکارید) طراحی شده و نتایج حاصل گویای این واقعیت است که علی رغم عدم استفاده از فاکتورهای رشد، کندروسیت ها فنوتیپ و قدرت غضروف زایی خود را بر روی آن پس از گذشت ۳۰ روز از کشت به خوبی حفظ کرده اند.

نتایج حاصل در این تحقیق بیانگر این است که داربست نانوالیاف فیبروئین ابریشم - کیتوزان تولید شده دارای ویژگی های برتری نسبت به سایر داربست های پلیمری طبیعی است. ترکیب پلیمر فیبروئین ابریشم با کیتوزان، خواص تخریب پذیری پلیمر کیتوزان را که سرعت تخریب بالایی دارد، بسیار بهبود بخشیده و سرعت تخریب آن را طی ۱۲ هفته بررسی تنها به ۵ درصد از وزن کل داربست کاهش داده است..

نتیجه گیری

به طور کلی مقایسه دو داربست ۵۰:۵۰ و ۷۰:۳۰ نشان می دهد که خواص مکانیکی و تخریب پذیری داربست ۷۰:۳۰ از ۵۰:۵۰ مطلوب تر اما در مقابل میزان رشد و گسترش سلولی و غضروف زایی بر روی داربست ۵۰:۵۰ بیشتر از ۷۰:۳۰ است.

بررسی درون تنی این داربست برای بررسی دقیق تر عملکرد این داربست ها در ترمیم غضروف مفصلی در حیوانات مدل در حال انجام است.

تشکر و قدر دانی

از آقای دکتر حسن مروتی استاد بخش بافت شناسی دانشکده دامپزشکی تهران که بخشی از رنگ آمیزی بافتی با کمک ایشان انجام شد قدردانی می شود.

منابع

1. Zhang X, Reagan MR, Kaplan DL. *Electrospun silk biomaterial scaffolds for*

- biomechanical engineering. 2000; 122(3): 252-60.
13. Tsai WB, Wang MC. Effects of an Avidin Biotin Binding System on Chondrocyte Adhesion and Growth on Biodegradable Polymers. *Macromolecular bioscience*. 2005; 5(3): 214-221.
14. Berninger MT, et al. Matrix-assisted autologous chondrocyte transplantation for remodeling and repair of chondral defects in a rabbit model. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2013; 21(75): p. e4422-e4422.
15. Lai G-J, Shalumon K, Chen S-H, Chen J-P. Composite chitosan/silk fibroin nanofibers for modulation of osteogenic differentiation and proliferation of human mesenchymal stem cells. *Carbohydrate polymers*. 2014; 111: 288-97.
16. McCullen SD, et al. Anisotropic fibrous scaffolds for articular cartilage regeneration. *Tissue engineering Part A*. 2012; 18(19-20): 2073-2083.
17. Neves SC, Moreira Teixeira LS, Moroni L, Reis RL, et al. Chitosan/poly (ϵ -caprolactone) blend scaffolds for cartilage repair. *Biomaterials*. 2011; 32(4): 1068-79.
18. Bhardwaj N, Nguyen QT, Chen AC, Kaplan DL, et al. Potential of 3-D tissue constructs engineered from bovine chondrocytes/silk fibroin-chitosan for in vitro cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. 2011;32(25):5773-81.
19. Correia CR, Moreira-Teixeira LS, Moroni L, Reis RL, et al. Chitosan scaffolds containing hyaluronic acid for cartilage tissue engineering. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2011;17(7):717-730.
20. Levorson EJ, Sreerekha PR, Chennazhi KP, Kasper FK, et al. Fabrication and characterization of multiscale electrospun scaffolds for cartilage regeneration. *Biomedical Materials*. 2013;8(1):014103.
21. Jeong CG, Hollister SJ. A comparison of the influence of material on in vitro cartilage tissue engineering with PCL, PGS, and POC 3D scaffold architecture seeded with chondrocytes. *Biomaterials*. 2010; 31(15): 4304-4312.
22. Li C, Zhang J, Li Y, Moran S, Khang G, Ge Z. Poly (l-lactide-co-caprolactone) scaffolds enhanced with poly (β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate) microspheres for cartilage regeneration. *Biomedical Materials*. 2013; 8(2): 025005.
23. da Silva MA, Crawford A, Mundy J, Martins A, et al. Evaluation of extracellular matrix formation in polycaprolactone and starch-compounded polycaprolactone nanofiber meshes when seeded with bovine articular chondrocytes. *Tissue Engineering Part A*. 2008; 15(2): 377-85.

Studing on chondrocytes growing on silk fibroin/ chitosan electrospun nanofibers scaffold

Jafarzadeh A, M.Sc.¹, Hoseinipajoo K, PhD^{2*}, Kiani rad M, PhD²

1. M.Sc. student, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran
2. Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran

* Email corresponding author: pajoooh@irost.ir

Received: 13 Jun. 2018

Accepted: 9 Oct. 2018

Abstract

Aim: The aim of this study was to investigate the bovine chondrocytes growth on new polymeric nanofibers silk fibroin/chitosan scaffolds, designed by authors, to form the cartilage tissue.

Material and Methods: The chondrocyte cells isolated from three calf articular cartilage were loaded on the scaffold. After a month of incubation, cells morphology was studied by SEM and the rate of cell growth by H&E and DAPI staining. To assay chondrogenesis in the culture, production of collagene was assayed by masson's trichrom staining and formation of Glycosaminoglycans (GAGs) and Proteoglycan was assayed by DMMB and "safranin O" staining.

Results: The results showed that the cells attached and proliferated to scaffolds very well. The number of cultured cells after one month proliferated by 4 to 5 times. Masson's trichrom, safranin O staining and GAG assay showed cartilage tissue production in the scaffolds.

Conclusion: According to the results, the scaffold of nanofibers Fibroin silk / chitosan could be a good scaffold candidate for cartilage tissue engineering. This is due to the nature of the proteins in silk fibroin and polysaccharides in chitosan for cellular attachment and also the diameter close to the diameter of extracellular matrix proteins in these scaffolds.

Keywords: Tissue engineering, Nanofibers, Electrospinning, Chitosan, Fibroin silk