

بررسی زیست سازگاری نانوالیاف الکتروریسی- شده برپایه کیتوسان در همکشتی با سلول‌های استرومایی مغز استخوان (BMSCs)

نویسندگان: عسگر امامقلی^۱، غلامرضا کاکا*^۲، مینو صدیقی^۳، سید همایون
صدراپی^۴، داوود ذوالفقاری^۵، زهرا بوربور^۶

۱. کارشناس ارشد نانو تکنولوژی پزشکی - مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم
پزشکی بقیه... (عج)، تهران، ایران

۲. استادیار - مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)، تهران، ایران

۳. استادیار - پژوهشکده فناوری های زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران

۴. دانشیار - مرکز تحقیقات علوم اعصاب و گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)
تهران، ایران

۵. کارشناس ارشد نانو تکنولوژی پزشکی - مرکز تحقیقات نانویوتکنولوژی، دانشگاه علوم
پزشکی بقیه... (عج)، تهران، ایران

۶. کارشناس ارشد میکروبیولوژی پزشکی - مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم
پزشکی بقیه... (عج)، تهران، ایران

E-mail: gh_kaka@yahoo.com

* نویسنده مسئول: غلامرضا کاکا

چکیده

مقدمه و هدف: مطالعاتی متعدد در زمینه دستیابی به داربستی منظور رشد سلول‌های بنیادی روی آن
انجام شده است. هدف از این تحقیق، ارائه داربست زیست تخریب پذیر کیتوسان- پلی اتیلن اکسید (PEO)
با بررسی توانایی رشد، تکثیر، عدم تمایز و مرگ سلولی سلول‌های استرومایی مغز استخوان (BMSCs)
روی آن است.

مواد و روش‌ها: ابتدا تشکیل نانوالیاف کیتوسان-PEO به نسبت ۹۰ به ۱۰ و ۸۰ به ۲۰ به روش
الکتروریسی، توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مورد بررسی قرار گرفت؛ این اسکافولد روی
ژلاتین ۱ درصد در پلیت ۲۴ خانه‌ای قرار گرفته، استریل شد. سلول‌های BMSCs از استخوان ران موش‌های
صحرائی بالغ استخراج و پس از سه مرحله پاساژ در خانه‌های خالی پلیت به عنوان گروه شاهد و هم
روی داربست کشت داده شد. میزان تکثیر، عدم تمایز و سلول‌های در حال مرگ، طی روزهای دوم، چهارم و
ششم مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: نتایج نشان دادند که مورفولوژی سلول‌ها روی داربست حفظ شده، با گروه شاهد، مشابه بود.
میزان تکثیر سلول‌ها روی داربست در روزهای متوالی افزایش یافته، اختلافی معنی‌دار با میزان تکثیر
سلول‌ها در کشت سلول‌ها در گروه شاهد نداشت؛ یافته‌ها همچنین نشان دادند که درصد تمایز سلول‌های
BMSCs و درصد میزان مرگ سلولی نیز در سلول‌های کشت داده شده روی داربست در مواجهه با داربست
در پایان روز ششم با گروه شاهد مشابه بود.

نتیجه‌گیری: تکثیر، عدم تمایز و عدم مرگ سلولی BMSCs روی نانوالیاف کیتوسان-PEO زیست
تخریب‌پذیر به ارائه مدلی از داربست منجر شد که می‌تواند در مهندسی بافت و سلول درمانی مورد
استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: نانوالیاف، کیتوسان، داربست، BMSCs

دریافت: ۹۱/۸/۳۰

آخرین اصلاح‌ها: ۹۱/۱۱/۷

پذیرش: ۹۱/۱۱/۱۸

مقدمه

دستاوردهای بیولوژیکی درخصوص کشت سلولی با استفاده از مواد زیست تخریب پذیر در حال حاضر، یکی از امیدبخش ترین روش‌هاست. نانوالیاف، ساختار و عملکردی مشابه ماتریکس خارج سلولی دارد و مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌ها در کنار مواد نانو ساختار غیرسمی به خوبی می‌تواند رشد و تکثیر یابد (۱). فرایندهایی مختلف به منظور ساخت نانوالیاف برای ایجاد ماتریکس‌های لیفی میکرو یا نانو مانند کشش، خودآرایی، سنتز قالبی، جداسازی فازی و الکتروریسی معرفی شده‌اند. در الکتروریسی محلول پلیمری با ویسکوزیته مناسب را میان دو قطب مخالف بار الکتریکی قرار داده، با اعمال اختلاف پتانسیل بالا به ساخت نانو الیاف اقدام می‌کنند (۲). در ساخت نانوالیاف به روش الکتروریسی از پلیمرهای سنتزی و طبیعی مختلفی استفاده شده که اغلب، پلیمرهای طبیعی ارجح‌ترند و به تازگی، تلاش‌های زیادی برای تهیه ساختارهای نانولیفی برپایه کیتوسان ارائه شده‌است که با موفقیت‌هایی نیز همراه بوده‌است (۳). کیتوسان، یکی از پلیمرهای زیست تخریب پذیر و زیست سازگار با بدن انسان بوده، ویژگی‌های خاصی نیز دارد که این پلیمر را برای بسیاری از زمینه‌های زیستی، پزشکی، دارورسانی و ژن درمانی مناسب کرده- است (۴). استفاده از PEO به همراه کیتوسان در هنگام الکتروریسی موجب می‌شود که فرایند ریسندگی، بهتر و راحت‌تر انجام شود و برای به دست آوردن ساختارهای لیفی یکدست و بدون گره، بهتر است که تریتون X-100 و دی متیل سولفوکساید به ترتیب به عنوان سورفکتانت و کمک حلال نیز به آن اضافه شود (۵). سلول‌های ایده آل برای پیوند باید خصوصیتی نظیر دستیابی آسان، قدرت تکثیر سریع در محیط کشت، قدرت حیات طولانی، عدم رد پیوند در میزبان را داشته باشند که سلول‌های BMSCs، تمامی این صفات را دارند؛ این سلول‌ها قادر به تولید انواعی از فاکتورهای رشد، فاکتورهای تروفیک و سایتوکاین‌ها بوده، در سلول‌درمانی و مهندسی بافت

بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرند (۶).

هدف از مطالعه حاضر، ارائه داربستی زیست تخریب پذیر و از نانوالیاف کیتوسان-PEO است که سلول‌های BMSCs روی آن، بیشترین تکثیر سلولی و کمترین مرگ و میر سلولی را داشته، در مواجهه با آن بدون تمایز باقی‌بمانند.

مواد و روش‌ها

مواد

کیتوسان با وزن ملکولی متوسط (Mw=190kd) با ۸۵ درصد دی استیله، PEO (Mw=900kd) و (DMSO) از شرکت سیگما. استیک اسید گلاسیال، پودر ژلاتین، تریپسین ۰/۲۵ درصد، اتیلن دی تترآ آمین ۰/۰۴ درصد (EDTA 0.04%)، معرف‌ها و رنگ‌ها از شرکت مرک آلمان. کتامین و زایلازین از شرکت آلفاسن هلند. محیط کشت α -MEM از شرکت جیبکوی انگلیس و تریتون X-100 از شرکت فلوکا خریداری شد. موش‌های رت برای استخراج (BMSCs)، از آزمایشگاه حیوانات آزمایشگاهی مرکز تحقیقات علوم اعصاب پژوهشگاه بقیه ا... (عج) تهیه شدند.

تهیه محلول‌ها برای الکتروریسی

ابتدا محلول‌های ۲ درصد وزنی- حجمی کیتوسان و ۳ درصد وزنی- حجمی PEO در اسید استیک ۰/۵ مولار حل شده، هریک جداگانه تهیه شدند؛ سپس محلول‌ها با نسبت ۸۰ به ۲۰ و ۹۰ به ۱۰ حجمی - حجمی (کیتوسان-PEO) مخلوط و به مدت ۵ ساعت به-هم زده شدند.

الکتروریسی نانوالیاف

هریک از محلول‌های تهیه شده بالا و ۲ درصد کیتوسان خالص (۱۰۰ به ۰) در سرنگ ۲ ml با سر سوزن ۰/۵ mm ریخته شد و سپس داخل دستگاه الکتروریسی (FANAVARSAN / ایران) میان دو قطب مخالف قرار داده شده، با اعمال ولتاژ با اختلاف پتانسیل ۲۲kv - ۱۸ به تهیه نانوالیاف اقدام شد. شکل و میانگین

واحد حجم و زنده و مرده بودن آنها توسط تریپان بلو، تعداد 5×10^3 سلول به هریک از پلیت‌های کشت سلولی اضافه شد و سپس در انکوباتور CO₂ ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

گروه شاهد، خانه‌هایی از پلیت بدون ژلاتین و نانوالیاف و گروه ژلاتین، خانه‌هایی از پلیت که فقط ژلاتینه شده‌اند هستند.

برای بررسی میزان رشد و تکثیر سلول‌های زنده، هریک از خانه‌های مورد نظر در روزهای دوم، چهارم و ششم با میکروسکوب اینورت (Leica / آلمان) مشاهده و توسط دوربین دیجیتال متصل به میکروسکوپ (INFINITY1 کانادا) با بزرگنمایی‌های مختلف از آنها عکس گرفته شد. به منظور شمارش سلول‌ها، پنج میدان میکروسکوپی با لنز شیئی 10x به صورت تصادفی انتخاب و تعداد سلول‌ها در هر میدان شمارش و میانگین آنها گرفته شد و این کار تا سه بار تکرار و هر دفعه در چهار خانه تکرار شد.

بررسی سلول‌های در حال مرگ

در پایان روز ششم به منظور تعیین مرگ سلولی از ماده فلورسنت آکریدین اورنج (2mg/ml) استفاده و سلول‌های با هسته نارنجی و سیتوپلاسم قرمز به عنوان سلول‌های در حال مرگ و سلول‌های با هسته و سیتوپلاسم سبز به عنوان سلول‌های زنده در نظر گرفته شدند و برای شمارش، تعداد صد سلول در دست کم سه میدان میکروسکوپی با لنز شیئی 10x به صورت تصادفی شمارش شدند که از این تعداد، سلول‌های در حال مرگ، مشخص و در نهایت، میانگین درصد سلول‌های در حال مرگ به دست آمد.

ایمونوسیتوشیمی

سلول‌ها در پایان روز ششم برای ثبوت به مدت ۳۰ دقیقه در معرض فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفته، سپس با PBS سه مرتبه ۵ دقیقه‌ای شسته شدند. نمونه‌ها در معرض مخلوط سرم بز ۱۰ درصد و Triton X-100 ۰/۳ درصد به مدت ۱ ساعت قرار داده شدند. پس از رقیق کردن

قطر نانوالیاف حاصل از روند الکتروریسی با استفاده از دستگاه SEM شرکت LEO مدل 1455 VP ساخت کشور انگلیس تعیین شد. به منظور تعیین میانگین ضخامت نانوالیاف، ۵ تصویر SEM از نقاط مختلف تهیه و از هر تصویر، میزان ضخامت ۱۰ نانوالیاف به دست آمد.

استخراج سلول‌های BMSCs

با رعایت اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی، سلول‌های BMSCs از استخوان‌های ران موش صحرایی بالغ نژاد ویستار با سن ۶ تا هشت هفته استخراج شدند؛ بدین ترتیب که پس از بیهوش کردن حیوان، مخلوط ۵۰ mg/kg کتامین و ۵ mg/kg زایلازین (۷) توسط محلول بتادین جراحی و الکل ۷۰ درصد اندام خلفی و پشت حیوان به طور کامل ضد عفونی شد، سپس استخوان‌ها از وسط دو نیم شدند و با استفاده از سرنگی ۵ml حاوی ۱ میلی-لیتر محیط کشت α -MEM، مغز استخوان از داخل کانال استخوان آسپیره شد. محتوی داخل سرنگ در زیر هود در پلیت ۶ سانتی حاوی محیط و 10% FBS ریخته شده، سپس در انکوباتور CO₂ (MMM/ انگلیس) قرار گرفت؛ پس از گذشت ۲۴ ساعت، محیط کشت سلولی با محیط تازه تعویض شد. سلول‌های استرومائی چسبیده به کف فلاسک باقی مانده، سلول‌های خونی شناور حذف شدند. هنگامی که تراکم سلول‌های چسبیده به کف فلاسک به ۷۰ تا ۸۰ درصد رسید، سلول‌ها توسط 0.25% Trypsin و 0.04% EDTA پاساژ داده شدند؛ این عمل تا سه پاساژ ادامه یافت؛ در این شرایط، سلول‌ها از مورفولوژی یکسانی بهره‌مند شدند.

کثرت سلول و بررسی آن

ابتدا نانوالیاف با نسبت ۹۰ به ۱۰ و ۸۰ به ۲۰ کیتوسان-PEO توسط ژلاتین ۱ درصد به کف پلیت ۲۴ خانه‌ای چسبانده شد و سپس توسط الکل ۷۰ درصد و همچنین قرار گرفتن به مدت ۱ ساعت در فاصله نیم متری از اشعه UV استریل شدند.

از سلول‌های BMSCs پاساژ سوم مرحله پیشین، سوسپانسیون سلولی تهیه و پس از بررسی تعداد در

در حد $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

ریز ساختار نانوالیاف

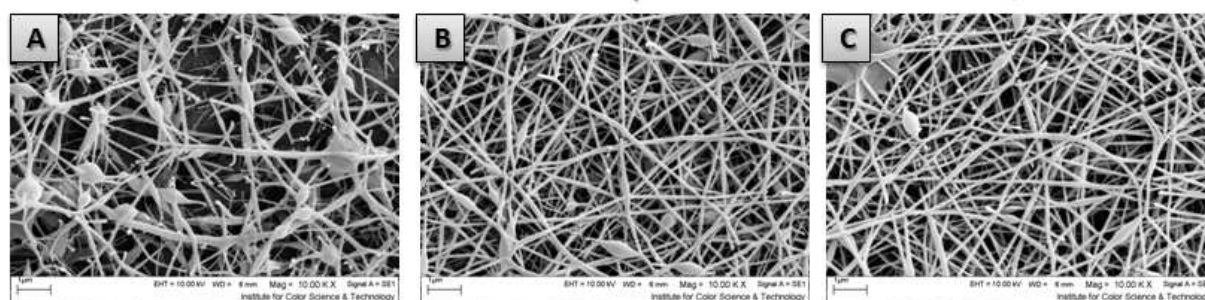
تصاویر میکروسکوپ الکترونی از نانوالیاف بیانگر این است که محلول ۲ درصد کیتوسان خالص به دلیل ویسکوزیته بالا به خوبی قابلیت تشکیل لیف را نداشته، نانو الیاف حاصل، منقطع و دارای گره فراوان است؛ اما از محلول کامپوزیتی کیتوسان/PEO با نسبت‌های ۹۰ به ۱۰ و ۸۰ به ۲۰ نانو الیاف یکدست، پیوسته و بدون گره، به ترتیب به قطر $250 \pm 10 \text{ nm}$ و $200 \pm 10 \text{ nm}$ به دست آمد؛ این موضوع نشان داد که غلظت محلول کامپوزیتی کیتوسان/PEO با نسبت‌های ۹۰ به ۱۰ و ۸۰ به ۲۰ دارای ویسکوزیته مناسب بوده، زنجیرهای پلیمری به خوبی با یکدیگر درگیری داشته‌اند که به عدم تشکیل گره در نانوالیاف منجر شده است. به نظر می‌رسد که نانوالیاف محلول کامپوزیتی کیتوسان/PEO با نسبت ۸۰ به ۲۰ یکدست تر بوده، از کیفیتی بالاتر بهره‌مند است اما به طور کلی در ضخامت این نانوالیاف، اختلافی معنی‌دار میان این دو نسبت وجود نداشت (شکل ۱).

۱:۱۰۰ آنتی‌بادی‌های اولیه ضد موشی Fibronectin و CD44 برای تعیین بنیادی و استرومایی بودن سلول‌ها، مدت یک شب در درجه حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سلول‌ها پس از انجام شستشو با PBS مانند گذشته مدت ۲ ساعت در دمای محیط در معرض آنتی-بادی ثانویه ضد موشی (۱:۲۰۰) کونژوگه به FITC قرار گرفتند؛ سپس شستشو با PBS انجام شد. نمونه‌ها توسط میکروسکوپ فلورسانس اینورت (Leica / آلمان) مورد بررسی قرار گرفت. برای شمارش سلول‌ها از اتیدیوم بروماید ۰/۰۱ درصد به مدت ۱ دقیقه استفاده و شستشو توسط PBS انجام شد؛ نحوه شمارش بدین ترتیب بود که از هر صد سلول شمارش شده در مناطق مختلف، تعداد سلول‌های ایمونوپوزیتیو مشخص هر گروه ثبت شد؛ این کار، روی سه خانه از پلیت ۲۴ خانه‌ای انجام و در مجموع آزمایش سه بار تکرار شد.

تجزیه و تحلیل آماری

تمام مقادیر پس از سه دفعه تکرار برحسب $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شده است. اطلاعات به دست آمده توسط روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون Tukey مورد مقایسه قرار گرفته، سطح معنی‌داری

کیتوسان خالص



شکل ۱. تصویر SEM از نانوالیاف الکتروریسی شده: (A) محلول ۲٪ کیتوسان (کیتوسان خالص) به خوبی قادر به تولید نانوالیاف نبوده و دارای گره فراوان است. (B) و (C) به ترتیب نانوالیاف حاصل از محلول ۹۰ به ۱۰ و ۸۰ به ۲۰ از کیتوسان-PEO، که به صورت یکدست، پیوسته و بدون گره می‌باشند

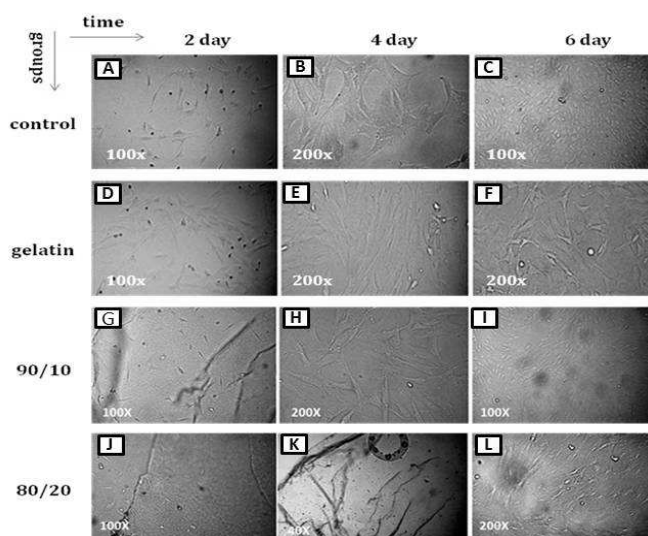
درصد و در روز چهارم (تصاویر B و E شکل ۲) ۸۵ درصد و در روز ششم (تصاویر C و F شکل ۲) به طور کامل، پر شده بود و تفاوتی مشخص از لحاظ میزان رشد

رشد و تکثیر سلول روی نانوالیاف

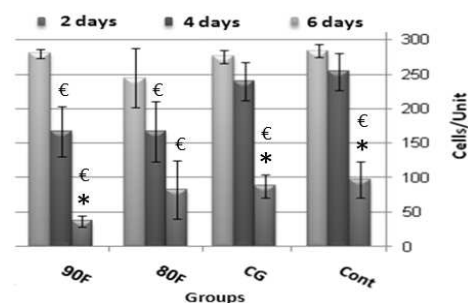
میزان رشد و تکثیر سلول‌ها در هر دو گروه شاهد و ژلاتین، در روز دوم (تصاویر A و D شکل ۲) حدود ۴۰

فشرده شده بودند. میزان رشد و تلاقی سلول‌ها در روی نانوالیاف ۸۰ به ۲۰ در روز دوم (شکل J، ۲) حدود ۲۵ درصد و در روز چهارم (شکل K، ۲) ۵۵ درصد و در روز ششم (شکل L، ۲) بیش از ۹۵ درصد از پلیت پر شده بودند (شکل ۲ و نمودار ۱)؛ اختلافی معنی‌دار نیز در این خصوص میان گروه‌ها وجود نداشت.

و تکثیر در میان دو گروه ملاحظه نشد؛ ولی از لحاظ شکل سلولی، در محیط حاوی ژلاتین ۱ درصد سلول‌ها به‌طور کامل، پهن و بزرگ‌تر به‌نظر می‌رسیدند. درصد تلاقی و میزان تکثیر سلول‌ها در روی نانوالیاف ۹۰ به ۱۰ در روز دوم (شکل G، ۲) حدود ۱۵ درصد و در روز چهارم (شکل H، ۲) ۵۵ درصد و در روز ششم (I) تمام سطح پلیت پر و سلول‌ها به‌طور کامل به‌هم چسبیده و



شکل ۲. تصویر سلول‌های زنده با میکروسکوپ اینورت در چهار گروه شاهد، ژلاتین، نانوالیاف ۹۰ به ۱۰ و ۸۰ به ۲۰ کیتوسان-PEO در روزهای دوم، چهارم و ششم پس از کشت سلول را نشان می‌دهد. تفاوتی مشخص از لحاظ میزان رشد در میان دو گروه شاهد و ژلاتین ملاحظه نشد ولی از لحاظ شکل و حالت سلولی، در محیط حاوی ژلاتین ۱ درصد سلول‌ها به‌طور کامل، کشیده و چسبیده‌تر به‌نظر می‌رسند؛ میزان پراکندگی در تمام سطوح یکسان و سلول‌ها دوکی شکل و کشیده‌اند؛ همچنین تصاویر شکل و میزان رشد سلول‌ها در مجاورت نانوالیاف ۹۰ به ۱۰ در روز دوم (G)، روز چهارم (H) و روز ششم (I) را نشان می‌دهد. میزان رشد سلول‌ها در مجاورت نانوالیاف ۸۰ به ۲۰ مشابه ۹۰ به ۱۰ بوده و تفاوتی مشخص از لحاظ میزان رشد و شکل سلول‌ها مشاهده نشد. در روز ششم، تمام سطح پلیت پر و سلول‌ها به‌طور کامل به‌هم چسبیده و درهم‌فرورفته‌اند.



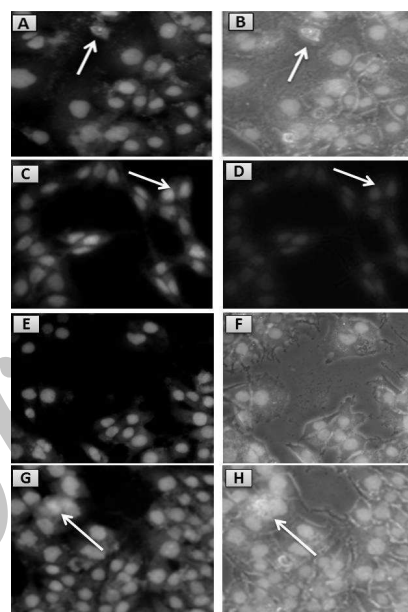
نمودار ۱. مقایسه میانگین میزان تکثیر سلول‌های BMSCs در گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد. در گروه‌های شاهد (Cont)، ژلاتین (CG) و نانوالیاف ۹۰ به ۱۰ (90F) افزایش معنی‌داری در روز چهارم نسبت به روز دوم مشاهده می‌شود؛ در حالی که این اختلاف در گروه نانوالیاف ۸۰ به ۲۰ معنی‌دار نیست. میانگین میزان تکثیر سلول‌ها در هر دو گروه از نانوالیاف ۹۰ به ۱۰ و ۸۰ به ۲۰ در روز ششم به‌طور معنی‌داری نسبت به روز چهارم بیشتر است؛ در حالی که در میان روزهای چهارم و ششم در گروه‌های شاهد و ژلاتین این‌گونه نیست.

* وجود اختلاف معنی‌دار با روز چهارم

€ وجود اختلاف معنی دار با روز ششم

بررسی مرگ سلولی

همان طور که در تصاویر مشخص است بیشتر سلولها پس از شش روز، زنده بودند و درصد کمی از سلولها به مرگ سلولی، دچار شدند که هیچ اختلاف معنی داری نیز در این خصوص میان گروهها وجود نداشت (شکل ۳).



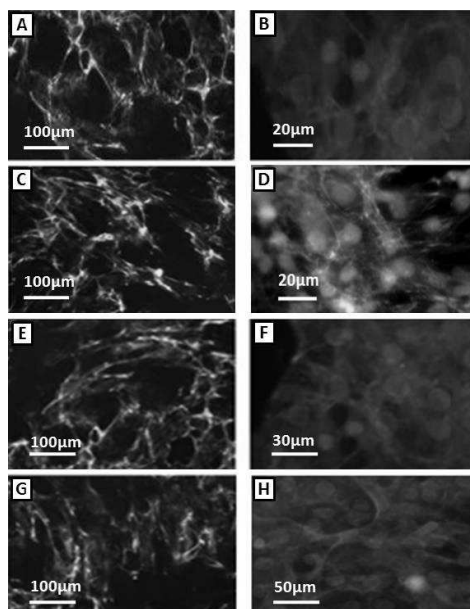
شکل ۳. رنگ آمیزی آکریدین اورنج از سلولهای BMSCs در روز ششم پس از پاساژ سوم است که هسته سلولهای زنده به رنگ سبز و سیتوپلازم سلول مرده به رنگ نارنجی دیده می شوند. تصاویر فلورسنت (A گروه شاهد؛ C گروه ژلاتین؛ E نانوالیاف ۹۰ به ۱۰ و F، D، B، G و نانوالیاف ۸۰ به ۲۰ هستند. میکروگراف (A، F، D، B، G و H تصویر فاز کنتراست همان میدان از تصاویر مقابل است. نوک پیکان سلول در حال مرگ را نشان می دهد. جدول ۱. درصد سلولهای در حال مرگ در پایان روز ششم

گروهها	میانگین درصد سلولهای در حال مرگ در روز ششم
شاهد	۳/۲±۰/۲
ژلاتین	۲/۶±۰/۵
نانوالیاف ۸۰ به ۲۰	۲/۴±۰/۳
نانوالیاف ۹۰ به ۱۰	۳/۲±۰/۶

ایمونوسیتوشیمی

به منظور ارزیابی خلوص و اثبات عدم تمایز سلولهای BMSCs، از رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی استفاده شد. شکل ۵ تصاویر فلوروسنت از رنگ آمیزی

ایمونوفلورسانس آنتی بادی اولیه آنتی Fibronectin و آنتی CD44 سلولهای BMSCs را نشان می دهد در این مرحله، سلولهای سبزرنگ با هسته های قرمز نشان-دهنده بنیادی بودن و استرومایی بودن سلولها هستند؛ همچنین، ثابت شد که سلولها در مواجه با نانوالیاف تمایز نیافتند و اختلافی مشخص میان گروهها وجود نداشت. برای مشخص شدن هسته سلولها هنگام شمارش از محلول اتیدیوم بر مایند $100 \mu\text{g/ml}$ به مدت ۱ دقیقه استفاده شد (شکل ۴).



شکل ۴. رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس آنتی بادی های اولیه Fibronectin (تصاویر سمت چپ) و CD44 (تصاویر سمت راست) از سلولهای BMSCs است. تابش نور فلورسانس مرتبط با FITC کونژوگه به آنتی بادی ثانویه ضد موشی است که به رنگ سبز دیده می شود. (A و B گروه شاهد، C و D گروه ژلاتین E و F نانوالیاف ۱۰/۹۰ و G و H نانوالیاف ۲۰/۸۰ هستند. برای مشخص شدن هسته سلولها از محلول اتیدیوم بر مایند استفاده شده است.

بحث و نتیجه گیری

سلولهای BMSCs توانستند بر روی داربست نانوالیاف کیتوسان-PEO زیست تخریب پذیر رشد و تکثیر مناسبی داشته و همچنین بدون تمایز و بدون

پروتئین در سلولها مؤید بنیادی بودن آنها بود. این روش توسط سایر محققین نیز به کار گرفته شده است (۹) در تایید خلوص سلولهای BMSCs از آنتی بادی CD44 نیز استفاده شد که نتایج مانند آنتی بادی فیبرونکتین درصد بالایی از سلولها مثبت بودند. این نتایج بر روی سلولهای بنیادی مزانشیمی توسط دیگران نیز نشان داده شد (۱۰). همچنین Lamoury و همکارانش سلولهای BMSCs حیوان و انسان را در دو محیط جداگانه کشت داده و با استفاده از آنتی بادی ضد فیبرونکتین و بیان mRNA ژن Oct-4 هویت بنیادی بودن آنها را تایید کردند (۱۱).

در مطالعه دیگری نشان داده شد که امکان تکثیر و تمایز سلولهای بنیادین مزانشیمی مغز استخوان انسانی به سمت هپاتوسیتها بر روی نانو داربستی متشکل از پلی کاپرولاکتون، کلاژن و پلی اترسولفون وجود دارد و داربست مذکور برای این منظور بسیار مناسب بوده است (۱۲) و نوع سلول استفاده شده در این تحقیق از نظر رده سلولی همان سلولهای مورد مطالعه ی ما بوده است ولی از نوع انسانی آن. که هدف اصلی آنها تمایز این سلولها به سمت سلولهای کبدی بوده است بنابراین کشت سلولها را تا روز ۲۰ و ۲۱ پیگیری کرده اند در حالی هدف ما عدم تمایز سلولی و حفظ بنیادی بودن آنها در طول مطالعه مورد تاکید بوده است زیرا پتانسیل تمایز بالای این سلولها در محیط درمانی و ترمیمی ضمن تاثیر بیشتر در درمان موجب دستیابی به این داربست در زمان بسیار کوتاهی می شود.

در مطالعه ای Mengyan و همکارانش سلولهای میوبلاست رت را روی درصدهای مختلفی از نانوالیاف ژلاتین و پلی آنیلین کشت دادند و میزان رشد و تکثیر و همچنین شکل سلولها را در روزهای دو، چهار و ششم مورد بررسی قرار دادند و نتایج، تفاوت قابل ملاحظه ای را در گروههای مختلف چه از لحاظ میزان رشد و تکثیر و چه از لحاظ مورفولوژی نشان نداد که نتایج حاصله بسیار مطابقت با نتایج تحقیق ما داشت (۱۳).

مرگ سلولی باقی بمانند و بنابراین داربستی از سلول نانوالیاف به دست آمد.

در الکترورسی نانوالیاف عوامل و پارامترهای متعددی چه از لحاظ سخت افزاری مانند ولتاژ، نرخ تغذیه و فاصله بین نوک سوزن با صفحه جمع کننده و چه از لحاظ فیزیکی و شیمیایی محلول پلیمر مانند ویسکوزیته، رسانائی الکتریکی و غلظت پلیمر به شدت می تواند نحوه شکل گیری و شکل این الیاف را تحت تأثیر قرار دهد (۵).

امروزه روشهای درمانی نقص یا آسیب در بدن به ویژه زخم و آسیبهای پوستی، استفاده از لایه های بسیار نازک نانوالیاف تهیه شده از پلیمر کیتوسان می باشد. آزمایشات و تجربیات مختلف، نشان داده است که در این روش سرعت ترمیم جراحی، نسبت به سایر روشهای مرسوم، بیشتر بوده و خود کیتوسان به لحاظ زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری و عدم تحریک پاسخهای دفاعی بدن نقش موثری در ترمیم و بهبودی دارد (۸). از طرفی برای انجام سلول درمانی از منابع سلولی متفاوتی می توان استفاده کرد که از آن جمله می توان به سلولهای مزانشیمی مغز استخوان اشاره کرد. به نظر می رسد با تلفیق این دو روش درمانی بتوان راهکار مناسبی پیدا کرد تا باعث هم افزایی اثر شود.

در مطالعه ای که Bhattarai و همکارانش در سال ۲۰۰۵ انجام دادند، درصدهای مختلفی از محلولهای کامپوزیتی کیتوسان و PEO را مورد الکترورسی قرار دادند و نشان دادند که غشای نانولیفی کیتوسان-PEO با نسبت های ۹۰ به ۱۰ ساختار خود را در آب به خوبی حفظ، و چسبیدن بهتر سلولهای کندروسیت و استئوبلاست را در بر داشته است (۵).

در تحقیق حاضر برای تعیین درصد خلوص سلولهای استرومائی به دلیل وجود گلیکوپروتئین فیبرونکتین در سلولهای با منشأ مزانشیمی، سلولهای BMSCs بر علیه این گلیکوپروتئین به روش ایمونوسایتوشیمی رنگ شدند، بیان بسیار بالای این

PEO را طی روزهای متوالی تایید، و نشان داد که شکل سلول در طول مطالعه حفظ شده است. در نتیجه گیری نهایی می توان گفت با توجه به اینکه سلول های BMSCs به راحتی می توانند بر روی نانوالیاف کیتوسان-PEO رشد و تکثیر مناسب، و مرگ سلولی بسیار کمی داشتند و با توجه به اینکه سلولها در این مدت دچار تمایز نشده و همچنان بنیادی بودن خودشان را حفظ کردند، بنابراین داربستی زیست تخریب پذیر از سلول- نانوالیاف در مدت زمان کوتاه یک هفته ای بدست آمد.

در مطالعه حاضر به نظر می رسد در ۴۸ ساعت ابتدایی، سلولها بر روی نانوالیاف نسبت به روزهای بعدی و یا نسبت به گروه های شاهد و ژلاتین رشد و تکثیر کندی دارند ولی با گذشت زمان در روزهای چهارم و ششم با تطبیق خود با شرایط رشدشان به سرعت افزایش یافته است که این موضوع در تحقیق Mengyan و همکارانش نیز اینگونه بوده است (۱۳). به طور کلی تصاویر میکروسکوپ اینورت از سلول های زنده BMSCs در مطالعه حاضر افزایش رشد و چسبیدن سلول های BMSCs به نانوالیاف کیتوسان-

منابع

- Teixeira AI, Abrams GA, Bertics PJ, Murphy CJ, Nealey PF. Epithelial contact guidance on well-defined micro- and nanostructured substrates. *J Cell Sci.* 2003; 116(3):1881-92.
- Han D, Gouma PI. Electrospun bioscaffolds that mimic the topology of extracellular matrix. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* 2006;2(1):37-41.
- Jayaraman K, Kotaki M, Zhang YZ. Recent advances in polymer nanofibers. *J Nanosci Nanotechnol.* 2004; 4: 52-65.
- Khora E, Yong L. Implantable applications of chitin and chitosan. *J Biomaterials.* 2003; 24(3):2339-2349.
- Bhattaraia N, Edmondson D, Veiseha O, Matsenb FA, Zhang M. Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. *J Biomaterials.* 2005; 67(1): 6176-6184.
- Tohill M, Mantovani C, Wiberg M, Terenghi G. Rat bone marrow mesenchymal stem cells express glial markers and stimulate nerve regeneration. *Neurosci Lett.* 2004; 362(2): 200-203.
- Seung Y. The survival and migration pattern of the Bone marrow stromal cells after intracerebral transplantation in Rats. *J Korean Neurosurg.* 2004; 36(1):400-404.
- Hua X, Yashodhan S, Jeffrey S and Brian S. Use of a chitosan-based hemostatic dressing in laparoscopic partial nephrectomy. *J Journal of Biomedical Materials.* 2008 Apr;85(1):267-71.
- Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol.* 2002 Mar;174(1):11-20.
- Bossolasco P, Cova L, Calzarossa C, Rimoldi SG, Borsotti C, Deliliers GL, Silani V, Soligo D, Polli E. Neuro-glial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro. *Exp Neurol.* 2005 Jun;193(2):312-25.
- Lamoury FM, Croitoru-Lamoury J, Brew BJ. Undifferentiated mouse mesenchymal stem cells spontaneously express neural and stem cell markers Oct-4 and Rex-1. *Cytotherapy.* 2006; 210(2):228-42.
- Kazemnejad S, Allameh A, Soleimani M, Ahmad G, Mohammadi Y, Amirzadeh N, et al. Development of a novel three-dimensional biocompatible nanofibrous scaffold for the expansion and hepatogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *J Biotechnology.* 2007; 4(3):201-211.
- Mengyan Li, Yi Guo, Yen Wei, Alan G. MacDiarmid, Peter I and Lelkes. Electrospinning polyaniline-contained gelatin nanofibers for tissue engineering applications. *J Biomaterials* 2006; 27(2):2705-2715.

Daneshvar

Medicine

*Scientific-Research
Journal of Shahed
University
Twentieth Year,
No.102
December 2012,
January 2013*

Received: 2012/11/20

Last revised: 2013/1/26

Accepted: 2013/2/6

Study of biocompatibility of electrospun chitosan-based nanofiber co-cultured with bone marrow stromal cells

Asgar Emamgholi¹, Gholam Reza Kaka^{2*}, Minoos Sadri³, Seyed Homayoon Sadraie⁴, Davood Zolfaghari⁵, Zahra Borbor⁶

1. M.Sc. of medical nanobiotechnology- Neuroscience Research Center- Baqiyatallah University of Medical Sciences - Tehran
2. Ph D of Neuroscience Research Center- Baqiyatallah University of Medical Sciences - Tehran
3. Ph D of Department of Biochemistry and Biophysics, Education and Research Center of Science and Biotechnology, Malek Ashtar University- Tehran
4. Ph D of Neuroscience Research Center and Department of Anatomy- Baqiyatallah University of Medical Sciences Department of Anatomy- Tehran
5. M. SC of medical nanobiotechnology- Nanobiotechnology Research Center- Baqiyatallah University of Medical Sciences – Tehran
6. M. Sc. of Microbiogy- Neuroscience Research Center -Baqiyatallah University of Medical Sciences - Tehran

* Corresponding author: GR Kaka Ph D of Neuroscience Research Center- Baqiyatallah University of Medical Sciences - Tehran

E-mail: gh_kaka@yahoo.com

Background and Objective: Several studies have been performed to achieve a scaffold for growing stem cells. The purpose of the study was to provide a biodegradable scaffold of chitosan - poly ethylene oxide (PEO) with the ability for growing, proliferation, un-differentiation and apoptosis of bone marrow stromal cells (BMSCs).

Materials and Methods: First, formation of chitosan-PEO nanofibers composed of 90 to 10 and 80 to 20 per electro technique were studied by scanning electron microscope (SEM). These scaffolds were located on 1% gelatin in 24-well plates and were then sterilized. Femoral BMSCs of rats were cultured on scaffolds after two passages from the house empty plate as controls. BMSCs proliferation, differentiation and apoptosis were studied in days II, IV and VI.

Results: The results showed that the morphology of cells was maintained on scaffolds similar to controls. The rate of cell proliferation on the scaffold on consecutive days increased in cultured cells of control group but the differences were not significant. The results also showed that at the end of the six days, BMSCs differentiation and the percentage of cell death on the scaffold were similar with cultured cells in control group.

Conclusion: Proliferation, un-differentiation and no apoptosis of BMSCs on biodegradable chitosan-PEO nanofiber are obtained as a model that can be used in tissue engineering and cell therapy.

Key words: Nanofibers, Chitosan, Scaffolds, Bone Marrow Stromal Cells