

بررسی بقا و چسبندگی سلول‌های استئوبلاست بدست آمده از سلول‌های بنیادی اندومتريال کشت داده شده بر روی داربست الکتروریسی PLGA/HA

مژده صالحی نمینی^۱، جعفر آی^۲، نسرین لطفی بخشایش^۳، شیوا ایرانی^۴، سمیه ابراهیمی باروق^{۵*}

^۱ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی
^۲ گروه مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
^۳ گروه مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
^۴ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
^۵ گروه مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

* Email: ebrahimi_s@sina.tums.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۶/۳۱

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۳/۲۱

چکیده

ساختار بافت مهندسی شده شامل سلول، مسیرهای سیگنالینگ و داربست می‌باشد. کوپلیمر پلی لاکتیک کوگلیکولیک اسید (PLGA) به همراه هیدروکسی آپاتیت (HA) برای ساخت داربست مورد توجه می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی زیست سازگاری و اثر داربست PLGA/HA بر سلول‌های استئوبلاست از پیش تمایز یافته و چسبندگی سلول‌ها روی داربست می‌باشد. سلول‌های بنیادی اندومتريال از اندومتريوم جدا و بعد از القا تمایز استئوبلاستی، سلول‌های تمایز یافته به سطح داربست الکتروریسی PLGA/HA منتقل شدند. روند تمایزی توسط تست آلكالین فسفاتاز بررسی گردید. مورفولوژی سلول‌ها بر روی داربست توسط عکسبرداری با SEM و زیست سازگاری داربست توسط تست MTT مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آلكالین فسفاتاز تمایز استئوبلاستی را تایید نمود. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره نشان دهنده خصوصیات مناسب سطح داربست و سلول‌ها توانایی اتصال و تکثیر مناسب‌تری روی نانوکامپوزیت داشتند. زیست سازگاری داربست نیز توسط تست MTT اثبات شد. داربست نانوکامپوزیتی PLGA/HA فوق دارای خصوصیات مناسب برای حمایت از اتصال و تکثیر سلول‌های تمایز یافته استئوبلاستی می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: سلول‌های بنیادی اندومتريال، داربست PLGA/HA، الکتروریسی، مهندسی بافت، تمایز استخوانی.

است [۷]. استخوان عملکردهای مهمی همچون حرکت، حمایت و حفاظت از بافت‌های نرم بدن (مانند مغز، مغز استخوان و نخاع)، ذخیره فسفات و

۱- مقدمه
 استخوان یک کامپوزیت بیولوژیک زنده و کلسیفیه شده و جز اختصاصی ترین بافت‌های همبند در بدن

[۲-۱۷-۱۸]. در مهندسی بافت، داربست در نقش ماتریکس خارج سلولی عمل کرده و به حمایت از رشد سلول می‌پردازد. هر چقدر ساختار داربست به ساختار ماتریکس طبیعی نزدیک‌تر باشد، شانس موفقیت داربست در ایجاد رفتار سلولی مناسب نیز بیشتر است. از این رو داربست در میان سه جزء مهندسی بافت نقش بسزایی دارد [۳۳-۳۷-۴۰]. پلیمرهای سنتزی به طور گسترده‌ای در مهندسی بافت برای ساخت داربست بکار می‌روند. زیست‌سازگاری و قابلیت جذب این پلیمرها زمینه استفاده گسترده آن‌ها را در مهندسی بافت به صورت داربست‌های موقتی یا به عنوان حامل برای تحویل مولکول‌های زیست‌فعال فراهم می‌کند. در این میان، کوپلیمر پلی‌لاکتیک کوگلیکولیک اسید (PLGA) به علت زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری مناسب، از جمله پلیمرهایی است که از سوی سازمان غذا و دارو (FDA) برای مطالعات مهندسی بافت مورد تأیید قرار گرفته است [۲۰-۳۶]. زیست‌تخریب‌پذیری این کوپلیمر وابسته به نسبت مونومرهای سازنده آن می‌باشد، بدین ترتیب که هر چقدر میزان پلی‌گلیکولیک اسید در ساختار این کوپلیمر بیشتر باشد تخریب‌پذیری در مدت کوتاهتری اتفاق می‌افتد [۱۹-۴۴]. داربست‌های کامپوزیت پلیمر/سرامیک از جایگاه ویژه‌ای در مهندسی بافت استخوان برخوردار هستند [۳۴]. تحقیقات نشان داده که بکارگیری سرامیک‌ها، به خصوص سرامیک‌های فسفات کلسیمی همچون هیدروکسی‌آپاتیت، در کنار مواد پلیمری، علاوه بر امکان حصول خواص مکانیکی بهتر، درجه زیست‌سازگاری و قابلیت استخوان‌سازی را نیز به میزان چشمگیری افزایش خواهد داد [۵-۳۹]. استفاده از نانوفیبرها در ساخت داربست‌ها به دلیل افزایش نسبت

کلسیم و نقش اندوکرینی در بدن دارا می‌باشد و برخلاف ظاهرش بافتی پویا و دینامیک می‌باشد [۶]. بافت استخوان به عنوان جز اصلی سیستم اسکلتی بدن، همواره در معرض آسیب‌ها و بیماری‌های گوناگون قرار دارد. با توجه به اعمال مهم بافت استخوانی در بدن، هرگونه تغییر در ساختار آن به دنبال ضایعه و بیماری‌های استخوانی مانند نکروز استخوان، تومورها، ارتوپلاستی و غیره تعادل بدن و طبیعت زندگی فرد را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۲۳]. اگر چه استخوان یکی از بافت‌هایی است که توانایی ترمیم خود را دارد ولی در صورتیکه میزان بافت از دست داده شده استخوانی بیش از حد بحرانی گردد در چنین مواردی از روش‌های مختلفی از قبیل پیوند استخوان و ایمپلنت‌های فلزی جهت ترمیم کامل استخوان استفاده می‌شود [۲۷]. پیوند استخوانی اتوگرافت به عنوان یک استاندارد طلایی برای پیوند استخوان مطرح است و بهترین بازده کلینیکی برای ترمیم استخوان و القا استخوانی است با این حال عیب‌های اصلی آن در ارتباط با عوارض محل اهدا؛ محدود بودن بافت دهنده، خطر عفونت و آسیب عصبی است. همچنین در مورد الوگرافت نیز بحث از دست رفتن خاصیت استئوژنیک در طی مراحل آماده‌سازی و پاسخ ایمنی است. پس انتخاب دیگر هم ایمپلنت‌های فلزی است که تا حدی موفقیت آمیز بوده است و عیب بزرگ آن تولید یون‌های سمی است [۴۳]. با توجه به معایب ذکر شده، محققین به انتخاب‌های جدیدی مثل سلول درمانی و مهندسی بافت توجه بیشتری می‌نمایند. مهندسی بافت ترکیبی از سلول‌ها، مولکول‌های فعال زیستی و داربست برای بازسازی استخوانی می‌باشد که یافتن منبع سلولی مناسب و طراحی داربست مناسب از اهداف مهم دانشمندان در سال‌های اخیر بوده است

اندومتريال انسانی قادر به خودتجدیدپذیری گسترده و پتانسیل تمایز به غضروف، چربی، استخوان، الیگوندروسیت و نورون هستند [۹-۱۲]. سلول‌های بنیادی - آندومتر رحم، با داشتن ویژگی‌هایی همچون جداسازی آسان، بدون ایجاد مشکلات جدی اخلاقی، گسترش سریع در محل کشت و نیز پتانسیل تمایزی منحصر به فرد، به عنوان عوامل درمانی اتولوگ، دارای برتری نسبت به سلول‌های بنیادی سایر منابع مزانشیمی هستند [۱-۳۳]. هدف از انجام این پروژه ساخت یک نانوداربیست زیست سازگار و زیست تخریب‌پذیر و بررسی روند رشد و تمایز یک منبع سلولی جدید و مناسب برای ترمیم و بازسازی نقایص استخوانی است، به طوری که به بهترین وجه ممکن بتواند تشکیل بافت جدید استخوانی را در بدن بیمار القا کند و در عین حال کمترین عوارض جانبی را نیز برای بیمار در پی داشته باشد.

۲- مواد و روش‌ها:

۲-۱- جداسازی سلول‌های بنیادی اندومتريال رحم و فلوسایتومتری:

نمونه بافت اندومتر از بیماران زن در سنین باروری که به علت درمان بیماری‌های خوش خیم رحمی به درمانگاه زنان و زایمان بیمارستان ولیعصر مراجعه کرده با رضایت فرد اهدا کننده تهیه گردید. نمونه‌های بافت اندومتر در محلول Hanks (Sigma) استریل حاوی آنتی‌بیوتیک (پنیسیلین و استرپتومایسین ۱٪) (GIBCO, 100U/ml) به آزمایشگاه منتقل گردید و سپس چندین بار با بافر فسفات سالین حاوی آنتی‌بیوتیک شستشو داده شد. پس از آن بافت اندومتر با محلول کلاژناز نوع ۱ (سیگما) با غلظت ۲ mg/ml به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪

سطح به حجم و در نتیجه افزایش برهم کنش سلول با داربیست، نسبت به داربیست‌های ساخته شده با روش‌های مرسوم مزیت دارد [۱۶]. نانوفیبرها انتخاب مناسبی جهت ایفای نقش ماتریکس خارج سلولی طبیعی در شرایط آزمایشگاهی هستند. در سال‌های اخیر نانو فیبرهای الکتروورسی شده، به علت نزدیک بودن ساختار آنها با ساختار فیبری بدن و ماتریکس خارج سلولی و همچنین سطح موثر بالا برای چسبندگی و رشد سلول‌ها، مورد توجه قرار گرفته اند و علاوه بر این مطالعات بر روی این داربیست‌های نانوفیبری بسیار گسترش یافته است [۲۲-۴۲]. روش ریسندگی الکتریکی پر کاربردترین روش ساخت نانوفیبرها است. در ریسندگی الکتریکی محدودیت برای نوع پلیمر وجود ندارد و برای انواع پلیمرها به کار برده می‌شود [۴۱]. از مزیت‌های الکتروورسی، انعطاف پذیری بالا، تنوع بسترهای پلیمری، تخلخل بالا داربیست سنتز شده می‌باشد [۳۰]. محققین با اعمال تغییرات در شرایط فرآیندی، محلولی و محیطی مانند تغییر در شدت جریان خروج محلول از سرنگ، فاصله صفحه جمع کننده تا سرنگ و مقدار ولتاژ توانسته اند اندازه حفرات در این نوع داربیست‌ها را تغییر دهند. تنظیم دقیق پارامترهای این روش اجازه سنتز نانوفیبرهای با قطر ۵۰ تا ۵۰۰ نانومتر را فراهم می‌کند [۲۴]. از میان انواع سلول‌های به کار برده شده در مهندسی بافت، سلول‌های بنیادی به علت ویژگی‌های منحصر به فردی همچون تمایز به انواع سلول‌ها و خود نوزایی از نظر ترمیم بافت آسیب دیده انتخاب مناسبی بوده و مورد توجه قرار گرفته‌اند [۲۸]. یکی از منابع سلول‌های بنیادی مزانشیمی که اخیراً مورد توجه قرار گرفته، سلول‌های مزانشیمی مشتق از بافت اندومتريال رحم می‌باشد. این سلول‌های بنیادی

Dekenson و نرم‌افزار Win MDI2/8 در موسسه رویان مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۲- تمایز سلول‌های بنیادی اندومتريال به سلول‌های استئوبلاستی:

سلول‌ها بعد از پاساژ سوم برای بررسی توان تمایزی به سلول‌های استئوبلاست آماده شدند. برای بررسی تمایز به سلول‌های استئوبلاست سلول‌های بنیادی اندومتريال انسانی با غلظت 2×10^5 سلول در ظرف ۲۴ خانه ای حاوی محیط کشت DMEM/F12 و سرم ۱۰٪ کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت کشت سلول‌های بنیادی اندومتريال، تعدادی از خانه‌های ظرف به گروه تمایزی و تعدادی هم به گروه کنترل اختصاص داده شد. سپس به گروه تمایزی، محیط تمایز استخوانی و به گروه کنترل محیط DMEM/F12 حاوی ۱۰٪ (Fetal Bovine Serum, Gibco) اضافه گردید. محیط تمایز به استخوان مورد استفاده شامل DMEM/F12 حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسکوربیک اسید ۳ فسفات، ۱۰ نانوگرم دکزامتازون و ۱۰ میلی مولار بتا- گلیسرول فسفات (سیگما) بود. سلول‌ها به مدت ۲۱ روز در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ CO_2 نگهداری شدند و محیط سلول‌ها هر دو روز یک بار تعویض گردید. به منظور بررسی مورفولوژی سلول‌ها از میکروسکوپ معکوس استفاده گردید.

۲-۳- سنجش آنزیم آلکالین فسفاتاز ترشح شده توسط سلول‌ها

ابتدا حدود 10^5 سلول‌های بنیادی اندومتريال بر روی چاهک پلیت ۲۴ خانه‌ای کشت داده شد. سلول‌های گروه تمایزی به مدت ۲۱ روز تحت تیمار

دی اکسید کربن در انکوباتور برای هضم بافتی قرار گرفت. پس از هضم بافت، برای حذف تکه بافت‌های هضم نشده و ناخالصی‌های موجود فیلتراسیون توسط فیلترهای ۴۰ و ۷۰ میکرومتر انجام شد. پس از عبور از فیلترها سلول‌های تک هسته باید از محلول بدست آمده حذف شوند. بدین منظور، از فایکول استفاده گردید. سپس سلول‌های جدا شده به محیط کشت DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's F12 Medium, Gibco 12500062, USA) حاوی ۱۵٪ سرم گاوی منتقل گردید. بعد از اینکه سلول‌ها، به صورت تک لایه کف پلیت را پوشانده بودند، پاساژ اول با استفاده از تریپسین/EDTA (سیگما) انجام شد. سلول‌ها بعد از پاساژ سوم از لحاظ ویژگی‌های تمایزی و مارکرهای سطحی سلولی مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور شناسایی سلول‌های بنیادی اندومتريال رحم از روش فلوسایتومتری برای مارکرهای مزانشیمی CD105, CD90, CD146 و مارکر سلول‌های اندوتلیالی CD31 و مارکر سلول‌های هماتوپوئیتیک CD34 استفاده شد. مراحل فلوسایتومتری برای مارکرهای اختصاصی سلول‌های اندومتريال به شرح زیر بود. لازم به ذکر است که این آنتی ژن‌ها جز آنتی ژن‌های سطح سلولی می‌باشند. سلول‌ها پس از شستشو با محلول شستشو فلوسایتومتری حاوی PBS (Gibco) و سرم ۱٪ به مدت ۳۰ دقیقه با پارافرمالدهید ۴٪ فیکس شده‌اند. در مرحله بعد آنتی‌بادی‌های مورد نظر که شامل CD31, CD105, CD90, CD146 (Abcam) و CD34 که به صورت مستقیم به یک آنتی‌بادی ثانویه فلوروسانس متصل بوده‌اند به مدت یک ساعت انکوبه شده‌اند. بعد از فیکس مجدد سلول‌ها با پارافرمالدهید یک درصد، نمونه‌ها برای بررسی بیان مارکرهای سطحی توسط دستگاه فلوسایتومتری مدل Bectin

الکتروود بعدی به سطح ورقه آلومینیومی متصل شد. سرعت تزریق محلول برابر ۱ میلی‌لیتر بر ساعت و بین سوزن و جمع کننده ولتاژ قوی ۲۰ کیلو ولت و فاصله بین نوک سوزن و درام یا صفحه جمع کننده ۹ سانتی‌متر تنظیم شد. این محلول به مدت ۸ ساعت بر روی ورقه آلومینیومی بافته شد و سپس داربست حاصله به مدت ۲۴ ساعت در شرایط خلا خشک گردید.

۲-۵- بررسی مورفولوژی داربست به کمک

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

برای بررسی مورفولوژی ساختار نانوکامپوزیتی داربست PLGA/HA تصاویر میکروسکوپ الکترونی (Philips مدل XL30) تهیه شد. به منظور آماده سازی نمونه‌ها، داربست‌ها به قطعات کوچک برش داده شد و سپس بر روی یک پایه قرا گرفت و پوششی از طلا روی آن اعمال شد و در نهایت تصاویر لازم تهیه شدند.

۲-۶- بررسی اتصال سلولی

به منظور بررسی چسبندگی و مورفولوژی سلول‌های بنیادی اندومتريال بر روی داربست تصاویر میکروسکوپ الکترونی تهیه گردید. تقریباً 3×10^5 سلول بنیادی اندومتريال به همراه محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ سرم و ۱٪ streptomycin/penicillin بر روی داربست‌های استریل شده که از قبل در محیط کشت قرار گرفته بودند کشت داده شد. سلول‌های کشت داده شده بر روی داربست به مدت ۴ روز در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2 انکوبه شد. سپس نمونه‌ها قبل از تثبیت دو بار با PBS شستشو داده

با محیط تمایزی بودند. سپس حدود ۲۰ ماکرولیتتر سوپرناتانت سلولی را بعد از ۱، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز کشت سلول‌های بنیادی اندومتريال را به صورت جداگانه از چاهک‌های تمایزی و گروه کنترل جمع‌آوری کرده و به منظور ارزیابی تولید آنزیم آلكالین فسفاتاز از کیت پارس آزمون (حاوی ماده پارانیتر و فنیل فسفاتاز و دی اتانول آمین) استفاده شد. بر طبق دستورالعمل کارخانه سازنده حدود ۸۰۰ ماکرولیتتر از محلول دی اتانول آمین را با ۲۰۰ ماکرولیتتر از محلول ماده پارانیتر و فنیل فسفاتاز (نسبت ۴:۱) ترکیب شد. سپس حدود ۲۰ ماکرولیتتر سوپرناتانت سلولی را با محلول فوق مخلوط و ترکیب حاصله را در دستگاه اسپکتروفتومتری قرار داده شد و ۶۰ ثانیه میزان جذب نوری را در طول موج ۴۰۵ نانومتر تعیین نموده و دقیقاً پس از ۳، ۲ و ۱ دقیقه پس از آن اختلاف جذب نوری را ثبت نمودیم. در صورت وجود آلكالین فسفاتاز در محیط میزان اختلاف جذب نوری وجود خواهد داشت.

۲-۴- ساخت داربست PLGA/HA

داربست PLGA/HA به روش الکترورسی ساخته شد. به این منظور محلول پلیمری PLGA/HA ۱۰٪ (w/v) تهیه شد. برای ساخت محلول پلیمری ابتدا PLGA (50:50, lactic acid to glycolic acid ratio, MW: 48,000 w, Sigma-Aldrich) در حلال (HFIP) Hexafluoroisopropanol (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) کاملاً حل شد تا تعلیق پایداری ایجاد شود. سپس به محلول پلیمری حاصله ۲۰ درصد هیدروکسی آپاتیت (Sigma, USA) اضافه شد در نهایت محلول آماده شده را درون سرنگ دستگاه الکترورسی منتقل و سپس نوک سوزن سرنگ (با قطر داخلی ۱۳ میلی‌متر) به جریان ولتاژ وصل و

Reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت. برای بهتر حل شدن کریستال‌ها می‌توان پلیت را بر روی دستگاه شیکر قرار داد (آزمایشات با سه بار تکرار و نتایج به صورت میانگین گزارش شده است).

۲-۸- آنالیز آماری

همه آزمایش‌ها حداقل با سه بار تکرار مجزای بیولوژیک (three separate biological replication) انجام پذیرفتند. برای تجزیه و تحلیل آماری جهت مقایسه گروه کنترل و گروه‌های تجربی، نرم افزار SPSS و تست آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA، به کار گرفته شد. سطح معنی داری به میزان ۰/۰۵ درصد ($p < 0.05$) انتخاب شد.

۳- نتایج

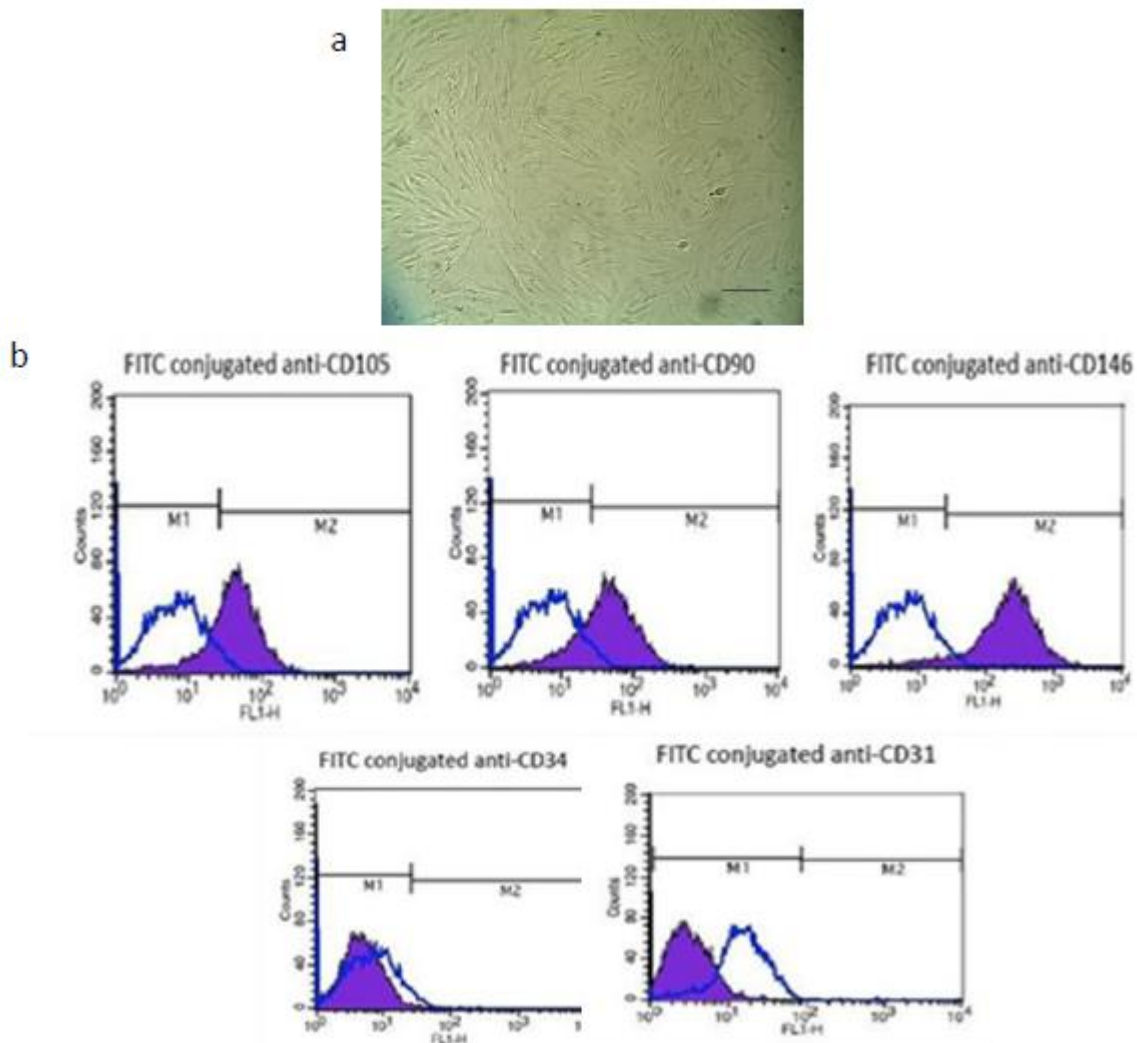
۳-۱- نتایج مربوط به جداسازی سلول‌های بنیادی اندومتريال رحم و آنالیزهای فلوسایتومتری

به دلیل آنکه که این سلول‌های بنیادی درصد کمی از جمعیت سلول‌های اندومتريال انسان را تشکیل می‌دهند، لذا این سلول‌ها در کشت‌های اولیه به صورت جمعیت ناخالص هستند و تعدادی سلول‌های اندوتلیالی و خونی نیز وجود دارند اما در پاساژهای بعدی به صورت خالص در می‌آیند، در کلونی‌های خالص سلول‌های بنیادی اندومتريال از لحاظ مورفولوژیکی شبیه به سلول‌های فیروبلاستی و دوکی شکل می‌باشند (شکل ۱.a). علاوه بر این نتایج فلوسایتومتری نشان داد که این سلول‌ها از پاساژ سوم به بعد نسبت به مارکرهای مزانشیمی، (CD105(79+%) و CD90 (80+%) مثبت و نسبت به مارکر اندوتلیالی (CD31(0/2%) و مارکر هماتوپوئیتیک CD34(0/4%) منفی می‌باشند (شکل ۱.b).

شدند. برای تثبیت از گلو تار آلد هید ۲٪ همراه با پارا فرمالدهید ۲/۵٪ به منظور تثبیت سلولی به مدت ۹۰ دقیقه استفاده شد. در نهایت با درصدهای مختلف الکل آبگیری انجام شد و برای SEM مورد استفاده قرار گرفتند.

۲-۷- زیست سازگاری داربست‌ها

برای بررسی زیست سازگاری داربست PLGA/HA الکترورسی شده در سه بازه زمانی مشخص (روزهای ۱، ۳ و ۷) تست ۳-[۴،۵-۲،۵-dimethylthiazol-2-yl]-۲،۵-diphenyltetrazolium bromide (MTT) بعد از کشت سلول‌ها در محیط کشت دوبعدی و سه بعدی انجام گرفت. محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با حل شدن پودر (MTT (Sigma, Germany) در PBS تهیه شد. در حدود 1×10^4 سلول بنیادی اندومتريال بر روی هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای حاوی داربست PLGA/HA در ۳ بازه‌ی زمانی ۱، ۳ و ۷ کشت داده شد. سپس پلیت‌ها داخل انکوباتور قرار داده شد و محیط کشت هر دو روز یک بار تعویض شد. در روزهای ۱، ۳ و ۷ محیط کشت را کامل خارج کرده و حدود ۱۰۰ ماکرولیتر محلول MTT با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آماده شده را بر روی سلول‌ها ریخته و به مدت ۴ ساعت پلیت در داخل انکوباتور قرار داده شد. بعد از این زمان محلول MTT خارج گردید و سپس ۱۰۰ ماکرولیتر dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma, Germany) برای حل شدن کریستال‌های ارغوانی فورمازان بر روی چاهک‌های حاوی سلول ریخته شد. در نهایت میزان جذب نوری (OD) رنگ ایجاد شده در هر نمونه که رابطه مستقیم با تعداد سلول‌های بنیادی اندومتريال فعال از لحاظ متابولیکی دارد با استفاده از دستگاه Elisa Plate



شکل ۱. (a) مورفولوژی سلول‌های بنیادی اندومتريال، بعد از پاساژ سوم که این سلول‌ها دارای ظاهر دوکی شکل و شبیه سلول‌های فیروپلاستی می‌باشند (Scale bar: 100µm). (b) بررسی فلوسایتومتريک بیان مارکرهاى مزانشیمی و غیر مزانشیمی در سلول‌های بنیادی اندومتريال انسان نسبت به مارکرهاى سلول‌های بنیادی مزانشیمال مانند CD105 (79%), CD90 (80%), CD146 (97%) و نسبت به مارکر سلول‌های اندوتلیال CD31 (0/2%) و مارکر سلول‌های هماتوپوئیتیک CD34 (0/4%) منفی هستند.

۳-۳- سنجش آنزیم آلکالین فسفاتاز

میزان تولید آنزیم آلکالین فسفاتاز در بازه زمانی ۱، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز بعد از کشت سلول‌های بنیادی اندومتريال که تحت تاثیر محیط تمایزی قرار گرفته اند در نمودار موجود در تصویر ۲ B. آمده است. نتایج حاصل از این بررسی حاکی از آن بود که میزان تولید آنزیم آلکالین فسفاتاز توسط سلول‌های استئوبلاست به دست آمده از سلول‌های اندومتريال که تحت تیمار با

۳-۲- نتایج مربوط به تمایز سلول‌های بنیادی

اندومتريال به سلول‌های استئوبلاست

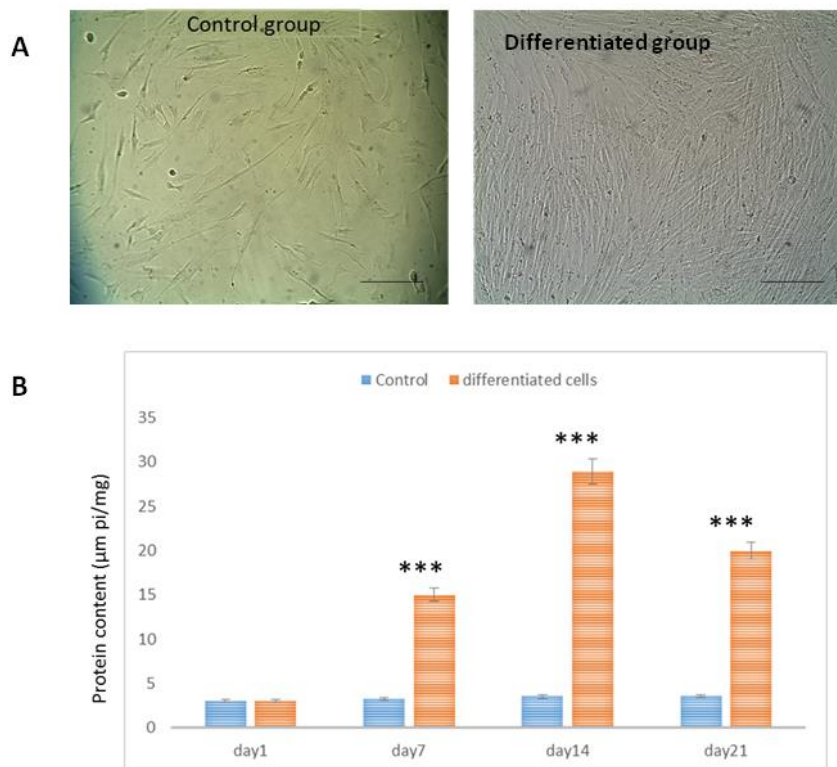
بررسی مورفولوژیکی در طول مطالعه نشان داد که ۲۱ روز پس از القاء با محیط تمایزی استخوانی، مورفولوژی سلول‌های تیمار شده کم کم شروع به تغییر کرد. در سلول‌های گروه کنترل، تغییری مشاهده نشد (شکل ۲.a).

و از قطر مناسبی برخوردارند بدین ترتیب مناسب برای مهندسی بافت استخوان می‌باشد کشت سلول‌ها بر روی داربست مورفولوژی و نحوه اتصال سلول‌ها بر روی سطح داربست PLGA/HA به وسیله تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی (تصویر شماره ۳b) مورد مطالعه قرار گرفت. تصاویر نشان دهنده اتصال مناسب سلول‌ها بر روی داربست فوق است. نکته قابل توجه جهت گیری و تمایل سلول‌ها به سمت داربست است که بیانگر رشد و تکثیر مناسب سلول‌ها بر روی داربست نانوفیبری PLGA/HA که بدلیل تخلخل و قطر مناسب نانوفیبرها و زیست سازگاری خوب داربست‌ها می‌باشد.

محیط تمایزی بوده‌اند نسبت به سلول‌های بنیادی اندومتريال شاهد که فاقد محیط تمایزی بوده افزایش معناداری دارد و همچنین با گذر زمان میزان آلكالین فسفاتاز تولید شده تا روز ۱۴ بالا می‌رود سپس میزان تولید آلكالین فسفاتاز کاهش می‌یابد.

۳-۴- بررسی خصوصیات داربست

پس از تهیه داربست‌ها و پوشش‌دهی آنها با لایه‌ای از طلا، به منظور بررسی مورفولوژی داربست نانوفیبری، به کمک میکروسکوپ الکترونی، تصاویر تهیه شد (تصویر شماره ۳a). تصاویر نشان می‌دهد که داربست نانوکامپوزیتی PLGA/HA دارای ساختار متخلخل و همچنین داربست فوق تقریباً فاقد دانه بوده

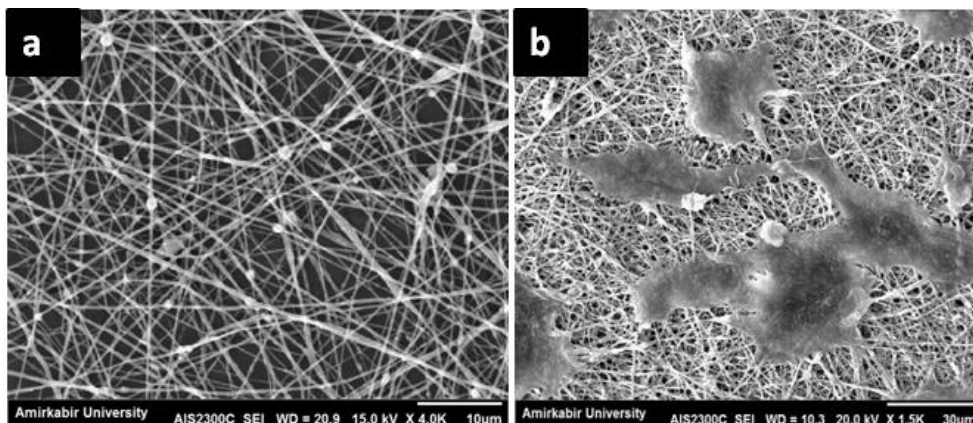


شکل ۲. (A) پتانسیل تمایز سلول‌های بنیادی اندومتر رحم به سلول‌های استئوبلاست بعد از ۲۱ روز (Scale bar: 100µm). (B) میزان تولید آنزیم آلكالین فسفاتاز توسط سلول‌های اندومتريال که تحت تیمار با محیط تمایزی بوده اند نسبت به گروه کنترل که کشت سلول‌های بنیادی اندومتريال بود در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ افزایش معناداری دارد (n=3, ***p<0.001)

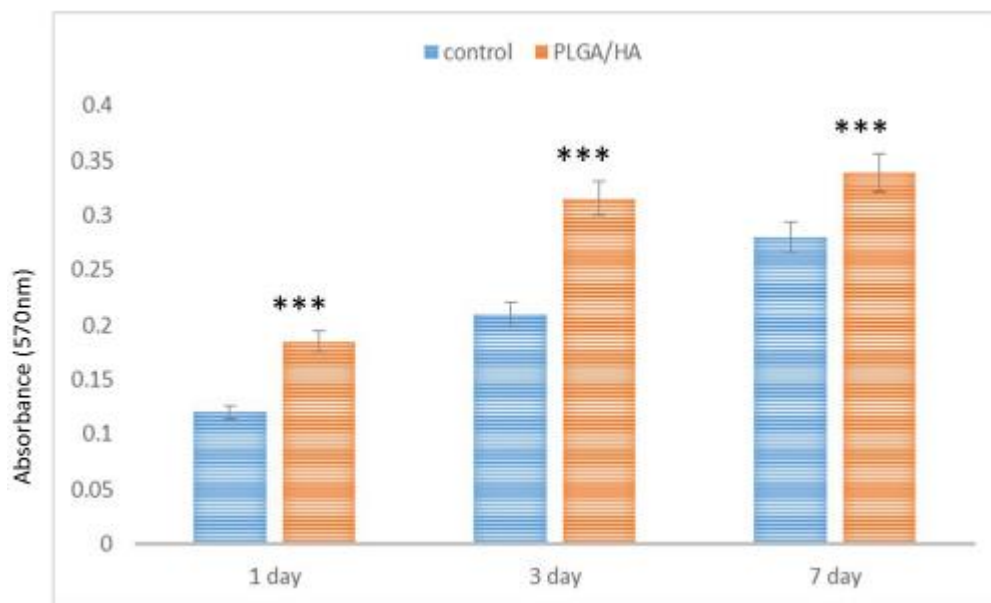
۳-۵- زیست سازگاری داربست‌ها

میزان زیست سازگاری داربست در این سنجش بر مبنای کاهش فعالیت آنزیم میتوکندریایی در سلول‌های بنیادی اندومترال مشتق شده از اندومترورم انسانی کشت شده بر روی داربست PLGA/HA، با استفاده از روش MTT تعیین شد. همان‌طور که در نمودار شماره ۴ مشخص است، میزان بقا و نرخ رشد سلول‌های

کشت شده بر روی داربست نانوکامپوزیتی PLGA/HA نسبت به سلول‌ها کشت شده بر کف پلیت پلی‌استیرن، در هر سه روز به مراتب بیشتر است. با توجه به این نمودار، حداکثر رشد و تکثیر سلولی بر روی نانو کامپوزیت در روز هفتم حاصل شده است (اخلاف معناداری در میانگین داده‌ها مشاهده شد).



شکل ۳. (a) تصاویر میکروسکوپ الکترونی. SEM_ نانو فیبر های داربست الکتروسی شده PLGA/HA. (b) سلول های بنیادی اندومترال کشت شده بر روی داربست.



شکل ۴. نمودار MTT برای بررسی میزان بقا سلول های بنیادی اندومترال بر روی داربست PLGA/HA در روزهای اول، سوم و هفتم بعد از کشت، همان‌طور که مشاهده می‌شود، در هر سه روز میزان زیست سازگاری سلول های بنیادی اندومترال بر روی داربست نانوکامپوزیتی فوق نسبت به کف پلیت پلی‌استیرن به مراتب بیشتر است. با توجه به این نمودار حداکثر رشد و تکثیر سلولی روی نانو کامپوزیت در روز هفتم حاصل شده است ($n=3, ***p<0.001$).

۴- بحث

نشان داد که، سلول‌های بنیادی اندومتريال انسانی، مارکرهای سطحی مزانشیمی CD105, CD90 و CD146 را بیان نمودند. هم چنین این سلول‌ها نسبت به بیان مارکرهای CD31 و CD34 منفی هستند. نتایج مربوط به بیان این مارکرها در راستا با مطالعات انجام شده توسط Gargett و Masuda و همچنین مطالعات ابراهیمی باروق و همکاران در سال ۲۰۱۲ نیز می‌باشد [۱۱-۱۲]. تلاش برای تمایز سلول‌های بنیادی اندومتريال به سلول‌های استخوانی توسط ابراهیمی باروق و همکارانش در سال ۲۰۱۲ مطرح گردید [۱۲]. در همین راستا مطالعات ما نیز نشان داد که حضور محیط تمایزی باعث القاء تمایز استخوانی سلول‌های بنیادی اندومتريال رحم می‌شود. بر این اساس مطالعه ی حاضر، عملکردی بودن سلول‌های شبه استئوبلاست به دست آمده از سلول‌های بنیادی اندومتريال را با سنجش میزان تولید آنزیم آلکالین فسفاتاز مورد ارزیابی قرار گرفت. یکی از تغییرات قابل بررسی در سلول‌های تمایز یافته به استئوبلاست، بررسی میزان تولید آنزیم آلکالین فسفاتاز در این سلول‌ها است. در این بررسی تمایز استئوبلاستی سلول‌ها را پس از ۱، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز تیمار تحت محیط تمایز استئوبلاستی بررسی شد. بر طبق نتایج، بیان آلکالین فسفاتاز تا روز ۱۴ پروسه تمایز به حداکثر میزان خود رسید سپس بیان این آنزیم کاهش یافت که این موضوع روند صحیح تمایز را اثبات نمود. به علت آنکه، بیان ژن این آنزیم بلافاصله پس از توقف تکثیر سلولی و در حین فاز ساخت ماتریکس به حداکثر مقدار خود رسیده و هنگام شروع مینالیزاسیون ماتریکس کاهش می‌یابد [۱۴-۳۱]. علاوه بر این، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سلول‌های استئوبلاست حاصل از تمایز

روش‌های رایج در درمان آسیب‌های استخوانی به خوبی عمل نمی‌کنند و مهندسی بافت در این راستا امیدهای تازه‌ای در جهت ساخت جایگزین‌ها و ترمیم شکستگی‌های استخوان را به وجود آورده است [۳۸]. هدف از این مطالعه، تمایز سلول‌های بنیادی اندومتريال انسان به سلول‌های استئوبلاست در حضور محیط تمایزی، و سپس بررسی زیست سازگاری داربست و رفتار سلول‌های استئوبلاست به دست آمده از سلول‌های بنیادی اندومتريال بر روی داربست PLGA/HA می‌باشد. در تحقیق حاضر از سلول‌های بنیادی اندومتريال انسان به عنوان منبع جدیدی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی که پتانسیل تمایز به انواع رده‌های سلولی از جمله غضروف، استخوان، چربی، نورو و الیگودندروسیت را دارا می‌باشند و امروزه بیشتر مورد توجه قرار گرفته است، استفاده شد [۹-۱۲]. پیدا نمودن منبع مناسبی از سلول‌های بنیادی که امکان استفاده از آن در کلینیک وجود داشته باشد، یکی از چالش بزرگی در سلول درمانی می‌باشد. با توجه به عدم تهاجمی بودن جداسازی سلول‌های بنیادی اندومتريال رحم انسانی و دسترسی آسان به این سلول‌ها و همچنین از دست رفتن خاصیت تمایز این سلول‌ها در سنین بالا، می‌توان از این سلول‌ها را به عنوان منبعی مناسب برای تمایز استخوانی استفاده نمود در واقع سلول‌های بنیادی اندومتريال، پس از ۳۴ بار پاساژ متوالی هم چنان کاربوتیپ نرمالی خواهند داشت و نسبت به سلول‌های بنیادی مغز استخوان سرعت تکثیر بالاتری دارند [۱۱]. در این مطالعه مارکرهای سطحی مربوط به سلول‌های بنیادی اندومتريال رحم انسان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه

روشی که برای سنتز داربست به کار می‌رود نیز حائز اهمیت است. در این مطالعه رفتار سلول‌های بنیادی اندومتريال انسانی بر روی داربست نانوکامپوزیتی PLGA/HA سنتز شده به روش الکتروریسی مورد بررسی قرار گرفت. روش الکتروریسی با انعطاف پذیری و قابلیت کنترل بالا، ساختارهایی را سنتز میکنند که میتوانند تقلیدی از ساختارهای نانوفیبری ماتریکس خارج سلولی طبیعی باشند [۲۲-۴۲]. از این رو هر چقدر ساختار داربست به شبکه نانوفیبری ماتریکس خارج سلولی طبیعی نزدیک‌تر باشد، در ایجاد رفتار مناسب از سلول موفق‌تر عمل می‌کند. به منظور بررسی زیست‌سازگاری و رفتار سلولی بر روی داربست نانوکامپوزیتی PLGA/HA، از کشت سلول‌های بنیادی اندومتريال و سلول‌های استئوبلاست تمایز یافته از سلول‌های بنیادی اندومتريال بر روی داربست استفاده شد. تصاویر حاصل از سلول‌های کشت شده بر روی داربست بیانگر این است که داربست نانو کامپوزیتی محیطی مناسب برای اتصال و رشد سلول‌ها فراهم کرده‌اند و سلول‌ها به سمت داربست کشیده شده‌اند و شروع به چسبیدن به داربست کردند. این نتایج نشان دهنده‌ی این است که داربست نانوکامپوزیتی PLGA/HA در ایجاد سیگنال قوی برای مهاجرت سلول‌ها، رشد و تکثیر سلول‌ها بر روی داربست مورد نظر موفق عمل کرده است. علاوه بر این با توجه به تصاویر میکروسکوب الکترونی می‌توان به این نکته نیز پی برد که سلول‌ها نه تنها قابلیت اتصال و تکثیر مناسب تری روی نانوکامپوزیت دارند، بلکه به لحاظ مورفولوژی نیز از شرایط طبیعی برخوردار هستند. در واقع حضور نانوذرات HA در سطح داربست جذب فیبرونکتین و ویترونکتین‌ها را از

سلول‌های بنیادی اندومتريال انسانی مارکرهای اختصاصی استخوانی را در هر سطح mRNA بیان نمودند که در تایید یافته‌های قبلی می‌باشد. مطالعات اعظمی و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۳ نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی اندومتريال رحم انسان، بعد از تمایز به سلول استخوانی، مارکر اختصاصی استخوانی را در سطح mRNA و نیز پروتئین بیان کرده‌اند [۳]. در مهندسی بافت، از داربست‌های پلیمری به عنوان بستری برای کشت سلول‌ها و حمایت فیزیکی از سلول‌ها و در نهایت، تشکیل بافت جدید استفاده می‌شود [۱۵]. از این رو مهم‌ترین گام در مهندسی بافت، انتخاب بیو مواد مناسب برای سنتز داربست می‌باشد [۱۵]. داربست مناسب در واقع الگویی برای بازسازی بافت است و نقش کلیدی در شکل‌گیری ساختار بافت مهندسی شده و عملکرد آن بر عهده دارد [۲۵]. بیوموادهای مورد استفاده در سنتز داربست باید از چسبندگی، رشد و تکثیر سلولی حمایت کند. بیوموادها باید چندین ویژگی ضروری همچون زیست تخریب پذیری، زیست سازگاری و فعالیت زیستی را داشته باشند [۲۶]. پلی لاکتیک کو گلیکولیک اسید (PLGA) به عنوان یک کوپلیمر از PLA و PGA بسیاری از این ویژگی‌ها را دارا می‌باشد [۳۵]. از سوی دیگر، نانو هیدروکسی آپاتیت با وجود خواص مکانیکی ضعیف، ماده‌ای زیست فعال با توانایی هدایت استخوان‌سازی و چسبندگی و تکثیر سلول‌ها است که برای استفاده به صورت کامپوزیت در مهندسی بافت استخوان مناسب می‌باشد [۳۲]. از اینرو، سنتز یک داربست نانوکامپوزیتی از پلی لاکتیک کو گلیکولیک اسید و نانو هیدروکسی آپاتیت برای دستیابی به خواص بهتر، مطلوب به نظر می‌رسد. اما

نقش فوق العاده HA در تمایز استئوبلاستی بود [۲۴]. در همین راستا، Adnan Haider و همکارانش در سال ۲۰۱۴ اثر مورفولوژیکی HA بر تکثیر سلولی، عمل استخوان سازی و آزاد سازی یون کلسیم را نشان دادند [۱۳]. این پژوهش در کنار مطالعاتی که در گذشته انجام شده است، همگی موید آن است که، مقدار و چگونگی توزیع HA بر روی داربست چسبندگی، تکثیر و تمایز سلولی را به مقدار قابل توجهی افزایش می‌دهد و نانوفیبرهای الکترورسی شده، با توجه به شباهت ساختاری آن به ماتریکس خارج سلولی طبیعی جهت ایجاد پاسخ سلولی مناسب به منظور استفاده در مهندسی بافت عملکرد مناسبی دارد که باعث جهت گیری و رشد و تمایز سلول‌ها بر روی بسترها می‌شود.

۵- نتیجه گیری

تحقیق حاضر نشان داد که سلول‌های بنیادی اندومتريال در حضور غلظت مناسبی از فاکتورهای تمایزی میتوان به سلول‌های استخوانی تمایز داد. با توجه به محدودیت‌های سایر منابع سلول‌های بنیادی مزانشیمی، می‌توان از سلول‌های بنیادی اندومتريال به عنوان یک منبع جدید از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، در تمایز سلولی استفاده کرد. همچنین، داربست نانوکامپوزیت PLGA/HA با توجه به نزدیکی شباهت ساختار آن به ماتریکس خارج سلولی طبیعی توانست از اتصال و تکثیر سلول‌های استئوبلاست به دست آمده از سلول‌های بنیادی اندومتريال حمایت کند. بنابراین به نظر می‌رسد که داربست نانوکامپوزیتی PLGA/HA کاندیدی مناسبی به منظور استفاده در مهندسی بافت استخوان هستند و امید می‌رود، بتوان در آینده در کاربردهای

سرم افزایش می‌دهد، که این امر باعث پیش برد اتصال اینتگرینی آن‌ها به غشای سلولی می‌شود، که این پیوندهای اینتگرینی بازآرایی فیبرهای F-اکتین در اسکلت سلولی را القاء می‌کند و پاسخ سلولی را به سیگنال‌های تخصصی جهت تکثیر و تمایز سلولی افزایش می‌دهد [۱۰]. همچنین در برخی مطالعات نشان داده اند، ذرات هیدروکسی آپاتیت باعث ایجاد سطوح خشن و ناهمواری در داربست‌ها می‌شود که منجر به چسبندگی اولیه مناسب سلول‌ها بر روی داربست‌های حاوی HA می‌شود [۲۱]. نمودار حاصل از تست MTT در روزهای ۱، ۳ و ۷ هم بیانگر شرایط زیستی مناسب سلول‌ها در سطح داربست میباشد. همچنین با افزایش مدت کشت نیز درصد زنده ماندن سلول‌ها بر روی نانوفیبر PLGA/HA افزایش یافت. این نتایج نشان دهنده‌ی این است که نانوفیبرهای PLGA/HA به دلیل شباهت ساختاری به ماتریکس خارج سلولی طبیعی در ایجاد رفتار سلولی مناسب عملکرد مطلوبی داشت و حضور نانو ذرات HA برای بهبود ویژگی سطحی به منظور اتصال بیشتر سلول‌ها بر روی داربست می‌باشد. علاوه بر این نمودار حاصل از تست Real time-PCR نیز نشان داد که HA تشکیل بافت استخوانی را به علت افزایش چسبندگی سلول‌ها، افزایش خاصیت استخوان‌سازی داربست و رسوب مواد معدنی حاوی کلسیم بر سطح داربست به طور قابل توجهی بهبود می‌بخشد. همچنین فریبا منصوری‌زاده و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند داربست کامپوزیتی PLLA/HA الکترورسی شده، می‌تواند تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از بند ناف جنین انسانی را به سلول‌های استئوبلاست القا کند. هدف از این مطالعه توجه به

- Journal of Molecular Neuroscience. 2013; 51 (2): 265-73.
- [10] Francis L, Venugopal J, Prabhakaran MP, Thavasi V, Marsano E, Ramakrishna S. Simultaneous electrospin-electrosprayed biocomposite nanofibrous scaffolds for bone tissue regeneration. *Acta biomaterialia*. 2010; 6 (10): 4100-9.
- [11] Gargett CE, Masuda H. Adult stem cells in the endometrium. *Molecular human reproduction*. 2010; 16 (11): 818-34.
- [12] Ghobadi F, Mehrabani D, Mehrabani G. Regenerative potential of endometrial stem cells: a mini review. *World journal of plastic surgery*. 2015;4(1):3.
- [13] Haider A, Gupta KC, Kang I-K. Morphological effects of HA on the cell compatibility of electrospun HA/PLGA composite nanofiber scaffolds. *BioMed research international*. 2014; 2014.
- [14] Hessle L, Johnson KA, Anderson HC, Narisawa S, Sali A, Goding JW, et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002; 99 (14): 9445-9.
- [15] Holzwarth JM, Ma PX. Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2011; 32 (36): 9622-9.
- [16] Hubbell JA. Biomaterials in tissue engineering. *Nature Biotechnology*. 1995; 13 (6): 565-76.
- [17] Jaiswal A. Nanofibrous scaffolds for tissue engineering applications. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2016; 59.
- [18] Jiang X, Zhao J, Wang S, Sun X, Zhang X, Chen J, et al. Mandibular repair in rats with premineralized silk scaffolds and BMP-2-modified bMSCs. *Biomaterials*. 2009; 30 (27): 4522-32.
- [19] Kim H, Kim HM, Jang JE, Kim CM, Kim EY, Lee D, et al. Osteogenic differentiation of bone marrow stem cell in poly (lactic-co-glycolic acid) scaffold loaded various ratio of hydroxyapatite. *International journal of stem cells*. 2013; 6 (1): 67.
- [20] Langer R, Tirrell DA. Designing materials for biology and medicine. *Nature*. 2004; 428 (6982): 487-92.
- [21] Lao L, Wang Y, Zhu Y, Zhang Y, Gao C. Poly (lactide-co-glycolide)/ hydroxyapatite nanofibrous scaffolds fabricated by electrospinning for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2011; 22 (8): 1873-84.

پزشکی از آن استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و تشکر خود را از کلیه دوستان و همکاران دانشگاه علوم پزشکی تهران به واسطه حمایت‌هایشان در انجام این پروژه اعلام می‌دارند.

منابع

- [1] Ai J, Shahverdi AR, Barough SE, Kouchesfehiani HM, Heidari S, Roozafzoon R, et al. Derivation of adipocytes from human endometrial stem cells (EnSCs). *Journal of Reproduction & Infertility*. 2012; 13 (3): 151.
- [2] Athanasiou KA, Zhu C, Lanctot DR, Agrawal CM, Wang X. Fundamentals of biomechanics in tissue engineering of bone. *Tissue Eng*. 2000; 6 (4): 361-81.
- [3] Azami M, Ai J, Ebrahimi-Barough S, Farokhi M, Fard SE. In vitro evaluation of biomimetic nanocomposite scaffold using endometrial stem cell derived osteoblast-like cells. *Tissue and Cell*. 2013; 45 (5): 328-37.
- [4] Chen G, Ushida T, Tateishi T. Scaffold design for tissue engineering. *Macromolecular Bioscience*. 2002; 2 (2): 67-77.
- [5] Chuenjitkuntaworn B, Osathanon T, Nowwarote N, Supaphol P, Pavasant P. The efficacy of polycaprolactone/ hydroxyapatite scaffold in combination with mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2016; 104 (1): 264-71.
- [6] Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol*. 2008; 61 (5): 577-87.
- [7] Downey PA, Siegel MI. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Phys Ther*. 2006; 86 (1): 77-91.
- [8] Ebrahimi-Barough S, Javidan AN, Saberi H, Joghataei MT, Rahbarghazi R, Mirzaei E, et al. Evaluation of motor neuron-like cell differentiation of hEnSCs on biodegradable PLGA nanofiber scaffolds. *Molecular neurobiology*. 2015; 52 (3): 1704-13.
- [9] Ebrahimi-Barough S, Kouchesfehiani HM, Ai J, Massumi M. Differentiation of human endometrial stromal cells into oligodendrocyte progenitor cells (OPCs).

- [22] Lee TC, Niederer P. Basic engineering for medics and biologists: An ESEM primer: IOS Press; 2010.
- [23] LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. Clin Orthop Relat Res. 2002 (395): 81-98.
- [24] Mansourizadeh F, Miri V, Sagha M, Asadi A, Golmohammadi MG. A comparison of the Growth and Differentiation of the Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells on the Poly-L-lactic acid/Hydroxyapatite Composite Scaffold with Pure Poly-L-lactic Acid Scaffold. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2015; 24 (120): 133-47.
- [25] Ma PX. Biomimetic materials for tissue engineering. Advanced drug delivery reviews. 2008;60(2):184-98.
- [26] Marolt D, Campos IM, Bhumiratana S, Koren A, Petridis P, Zhang G, et al. Engineering bone tissue from human embryonic stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012; 109 (22): 8705-9.
- [27] Marolt D, Knezevic M, Novakovic GV. Bone tissue engineering with human stem cells. Stem Cell Res Ther. 2010; 1 (2):10.
- [28] Mobarakeh ZT, Ai J, Yazdani F, Sorkhabadi SMR, Ghanbari Z, Javidan AN, et al. Human endometrial stem cells as a new source for programming to neural cells. Cell biology international reports. 2012; 19 (1): 7-14.
- [29] Meng X, Ichim TE, Zhong J, Rogers A, Yin Z, Jackson J, et al. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. Journal of translational medicine. 2007; 5 (1): 57.
- [30] Meng Z, Wang Y, Ma C, Zheng W, Li L, Zheng Y. Electrospinning of PLGA/gelatin randomly-oriented and aligned nanofibers as potential scaffold in tissue engineering. Materials Science and Engineering: C. 2010; 30 (8): 1204-10.
- [31] Miao D, Scutt A. Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in decalcified bone and cartilage. Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 2002; 50 (3): 333-40.
- [32] Michel J, Penna M, Kochen J, Cheung H. Recent advances in hydroxyapatite scaffolds containing mesenchymal stem cells. Stem Cells International. 2015.
- [33] Pham QP, Sharma U, Mikos AG. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. Tissue engineering. 2006; 12 (5): 1197-211.
- [34] Reed CR, Han L, Andrady A, Caballero M, Jack MC, Collins JB, et al. Composite tissue engineering on polycaprolactone nanofiber scaffolds. Annals of plastic surgery. 2009; 62 (5): 505-12.
- [35] Seal B, Otero T, Panitch A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. Materials Science and Engineering: R: Reports. 2001; 34 (4): 147-230.
- [36] Sharma B, Elisseeff JH. Engineering structurally organized cartilage and bone tissues. Annals of biomedical engineering. 2004; 32 (1): 148-59.
- [37] Shattil SJ, Newman PJ. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. Blood. 2004;104 (6): 1606-15.
- [38] Thavorniyutikarn B, Chantarapanich N, Sitthiseripratip K, Thouas GA, Chen Q. Bone tissue engineering scaffolding: computer-aided scaffolding techniques. Progress in biomaterials. 2014; 3 (2-4): 61-102.
- [39] Wei G, Ma PX. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials. 2004; 25 (19): 4749-57.
- [40] Wu S-C, Chang W-H, Dong G-C, Chen K-Y, Chen Y-S, Yao C-H. Cell adhesion and proliferation enhancement by gelatin nanofiber scaffolds. Journal of Bioactive and Compatible Polymers. 2011; 26 (6): 565-77.
- [41] Xie Z. Biomedical Materials Based on Electrospun Polymeric Fibers: Auburn University; 2010.
- [42] Yoo SJ, Kim J, Lee C-S, Nam Y. Simple and novel three dimensional neuronal cell culture using a micro mesh scaffold. Experimental neurobiology. 2011; 20 (2): 110-5.
- [43] Yousefi AM, James PF, Akbarzadeh R, Subramanian A, Flavin C, Oudadesse H. Prospect of Stem Cells in Bone Tissue Engineering: A Review. Stem Cells International. 2016; 2016: 6180487.
- [44] Zhang P, Hong Z, Yu T, Chen X, Jing X. In vivo mineralization and osteogenesis of nanocomposite scaffold of poly (lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with poly (L-lactide). Biomaterials. 2009; 30 (1): 58-70.

Evaluation of adhesion and viability of endometrial stem cells-derived osteoblast-like cells cultured on PLGA/HA electrospun nanofiber scaffold

Salehi M.¹, Ai J.², Lotfibakhshaiesh N.³, Irani S.⁴, Ebrahimi-Barough S.^{5*}

¹ Department of Biology Islamic Azad University of Tehran, Science and Research Branch, Tehran, Iran.

² Department of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

³ Department of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

⁴ Department of Biology Islamic Azad University of Tehran, Science and Research Branch, Tehran, Iran;

⁵ Department of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

* Email: ebrahimi_s@sina.tums.ac.ir

Received: 18 June 2018

Accepted: 22 September 2018

Abstract

The engineered tissue structure includes three components: cells, signaling pathway and scaffold. The polylactide-co-glycolide/hydroxyapatite (PLGA/HA) has attracted much attention due to their optimal properties because of using PLGA polymer and hydroxyapatite. The aim of this study was to evaluate the biocompatibility effect of PLGA/HA scaffold on osteoblast differentiated from hEnSCs. We aimed to evaluate the adhesion of cells on scaffolds. hEnSCs were isolated from human endometrium tissue and induced the osteogenic differentiation, then the differentiated cells were cultured on PLGA/HA synthetic scaffolds. A nanocomposite scaffolds based on PLGA/HA were fabricated by electrospinning method and behavior of differentiated osteoblast cells was evaluated after seeding cells on this scaffold. Osteogenesis was investigated in terms of attachment, alkaline phosphatase activity and gene expression. Morphogenic of cells in scaffold was evaluated by SEM and biocompatibility of this scaffold was confirmed by MTT assay. The alkaline phosphatase activity confirmed osteoblast differentiation. SEM studies showed that the surface properties of scaffold were desirable and the cells had the ability to attach and proliferate better on the nanocomposite scaffolds. It has been shown that the nanocomposite scaffolds have appropriate properties to support the attachment of differentiated osteoblast cells.

Keywords: endometrial stem cells, PLGA/HA scaffold, electrospinning, Tissue engineering, bone differentiation.