

مقایسه‌ی کشت سلول‌های استرومایی مغز استخوان با نانوالیاف PLGA پوشش داده شده با ژلاتین و پلی ال لایزین

داود ذوالفقاری^۱، دکتر غلامرضا کاکا^۲، دکتر مینو صدری^۳، دکتر سیدهمايون صدرایی^۴، عسگر امامقلی^۱، محمد اصغری جعفر آبادی^۵، غلامرضا حرفه دوست^۱

نویسنده‌ی مسوول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج) gh_kaka@yahoo.com

دریافت: ۹۱/۱۱/۳۰ پذیرش: ۹۲/۱۱/۷

چکیده

زمینه و هدف: پلی لاکتید کو پلی گلیکولید (PLGA = Poly D,L-lactic-co-glycolic acid) به‌عنوان پلیمری زیست سازگار و زیست تخریب پذیر شناخته شده است. این پلیمر اخیراً در مهندسی بافت بسیار مورد توجه قرار گرفته است. هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی رفتار بیولوژیک سلول‌های استرومایی مغز استخوان (Bone Marrow Stromal Cells = BMSCs) در کشت با نانوالیاف PLGA پوشش داده شده با ژلاتین و یا پلی ال لایزین می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه ابتدا به روش الکتروریسی نانوالیاف PLGA در حلال هگزا فلورو بیس پروپانول تهیه و توسط ژلاتین و پلی ال لایزین به‌طور جداگانه پوشش (Coat) داده شدند. ویژگی‌های این پلیمر با روش میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM = Scanning Electron Microscopy) و آنالیز زاویه‌ی تماسی (Contact Angle) مورد بررسی قرار گرفت. پس از استحصال سلول‌های BMSCs رت و رسیدن به پاساژ دو، سلول‌ها در چهار گروه بدون نانوالیاف، نانوالیاف PLGA، نانوالیاف PLGA پوشش داده شده با ژلاتین و نانوالیاف PLGA پوشش داده شده با پلی ال لایزین کشت داده شدند. تکثیر سلول‌ها در روزهای دوم، چهارم و ششم توسط اکریدین اورنج و مورفولوژی سلول‌ها با نانوالیاف به‌وسیله‌ی SEM مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: محدوده‌ی قطر نانوالیاف PLGA حاصل از الکتروریسی بین ۲۷۰ تا ۷۰۰ نانومتر بود. میانگین زاویه‌ی تماس برای PLGA ۱۰۷/۶۶ درجه، PLGA پوشش داده شده با ژلاتین ۶۴/۵۸ درجه و برای PLGA پوشش داده شده با پلی ال لایزین ۴۰/۱۲ درجه را نشان داد. همچنین یافته‌ها نشان دهنده‌ی کاهش معنی‌دار میزان تکثیر سلول‌ها در گروه نانوالیاف PLGA تنها ($P < 0/05$) بود. اما این میزان در گروه‌های نانوالیاف پوشش داده شده با پلی ال لایزین و ژلاتین به ترتیب افزایش یافته بود.

نتیجه گیری: کشت سلول‌های شوان با نانوالیاف PLGA پوشش داده شده با ژلاتین و به‌خصوص پلی ال لایزین منجر به ارزیابی داریستی زیست تخریب پذیر به همراه سلول شوان شد.

واژگان کلیدی: نانوالیاف PLGA، سلول‌های استرومایی مغز استخوان، پلی ال لایزین، ژلاتین

-
- ۱- کارشناس ارشد نانو تکنولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب و مرکز تحقیقات نانو بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)
 - ۲- دکترای تخصصی آناتومی، دانشیار مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)
 - ۳- دکترای تخصصی شیمی آلی، استادیار پژوهشکده فناوری‌های زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر
 - ۴- دکترای تخصصی آناتومی، دانشیار مرکز تحقیقات علوم اعصاب و گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)
 - ۵- دکترای تخصصی آمار حیاتی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی تبریز

مقدمه

سطح آن توسط موادی نظیر استفاده از کلاژن، ژلاتین، پلی اتیلن گلیکول و پلی‌الایزین به صورت کامپوزیت صورت گرفته است (۲۳ و ۲۲، ۴). هدف از اصلاح سطح ماده زیستی باز تعریف واکنش سطح این ماده است در حالی که خصوصیات کلی خود را حفظ نموده است. به عنوان مثال پوشش دادن یک پلیمر آگریز با پروتئین‌های آبدوست ممکن است خصوصیات واکنش‌پذیری آن را با سلول‌ها در مقایسه با پلیمر تنها افزایش دهد. زیست‌سازگاری سطح یک زیست ماده به طور مستقیم با ساختار شیمیایی مواد روی سطح در ارتباط است. ساختار شیمیایی سطح یک زیست ماده رطوبت‌پذیری و بار سطحی آن را تحت تاثیر قرار خواهد داد همچنین روی خصوصیات جذبی مربوط به پروتئین‌های در گیر در اتصال و مهاجرت سلولی اثر خواهد گذاشت پلی‌الایزین پلیمری پلی کاتیونیک از اسید آمینه‌های لایزین دارای گروه‌های آمینی است که می‌تواند از طریق نیروهای الکترواستاتیکی به سطح سلول‌ها بچسبد. این اتصال غیراختصاصی به علت وجود گلیکوکالیکس حاوی زنجیره‌های اولیگوساکاریدی دارای بار منفی بر روی سلول می‌باشد (۲۴). ژلاتین نیز پروتئینی است که از هیدرولیز کلاژن به دست می‌آید. کلاژن نه تنها نقش ساختاری برای بافت دارد، بلکه در اتصالات سلولی هم نقش مهمی ایفا می‌کند (۲۵). هدف از این تحقیق اصلاح سطح نانوالیاف PLGA با استفاده از دو ماده پلی‌الایزین و ژلاتین به روش پوشش‌دار کردن و بررسی این نانوالیاف روی رفتار بیولوژیک سلول‌های BMSCs می‌باشد.

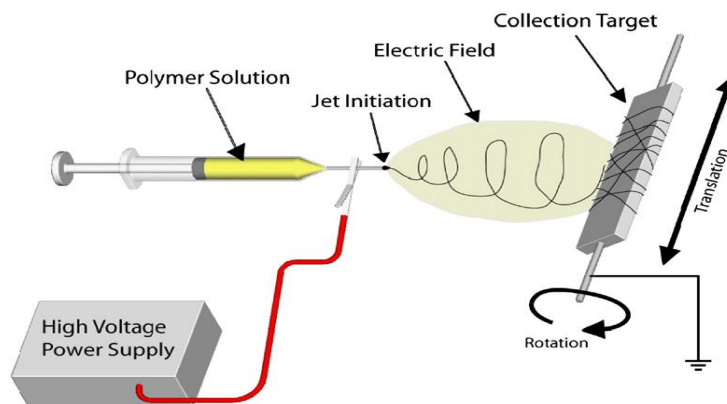
روش بررسی

PLGA با نسبت مولی لاکتید به گلیکولید ۷۵:۲۵ با وزن مولکولی ۱۰۷۰۰۰-۱۰۷۰۰۰، Mw ۶۶۰۰۰، هگزا فلورو بیس پروپانول به عنوان حلال PLGA (شرکت سیگما)، پودر ژلاتین، تریپسین ۰/۲۵٪، اتیلن دی تترا آمین (EDTA) ۰/۰۴٪، رنگ‌ها (همه

ساخت داربست مناسب زیست تخریب‌پذیر برای کشت سلول یکی از مهم‌ترین پارامترهای مهندسی بافت می‌باشد. یک داربست خوب باید بتواند ساختار فیزیکی و شیمیایی ماتریکس خارج سلولی که شبکه‌ای متخلخل از انواع فیبرها و پروتئین‌هاست را شبیه سازی نماید (۱). در این میان سنتز نانوالیاف با استفاده از تکنیک الکترورسی به علت ویژگی‌های خوب آن نظیر افزایش سطح تماس، انعطاف، تخلخل با اندازه‌های نانومتری تا چند میکرون می‌تواند جایگزین مناسبی برای ماتریکس خارج سلولی باشد (۴-۲). یکی از مهم‌ترین مواد برای این منظور استفاده از پلی استر پلی لاکتید کو پلی گلیکولید (PLGA) است که مورد تایید FDA (Food And Drug Administration) است (۵). این ماده کوپلیمری از دو پلیمر پلی لاکتیک اسید و پلی گلیکولیک اسید می‌باشد که از این دو پلیمر نیز به عنوان داربست در مهندسی بافت به تنهایی یا به صورت کامپوزیت با سایر مواد استفاده می‌گردد (۱۰-۶). PLGA علاوه بر استفاده به عنوان داربست در مهندسی بافت (۱۱)، در دارو رسانی (۱۲) و ساخت کانال‌های راهنمای عصبی استفاده می‌شود (۱۳). این ماده دارای خصوصیات نظیر زیست‌سازگاری و زیست تخریب‌پذیری بوده، می‌تواند بر اساس درصد میزان پلی لاکتیک اسید به پلی گلیکولیک اسید از چند هفته تا چند سال زمان تخریب‌پذیری آن را کنترل کرد (۱۷-۱۴). این ماده در بدن به آرامی هیدرولیز، تخریب و به مونومرهای سازنده خود شکسته و در نهایت از طریق چرخه‌ی کربس به صورت کربن دی اکسید و آب دفع می‌شود (۲۰-۱۸). حضور گروه‌های جانبی متیل در پلی لاکتیک اسید باعث آگریز شدن سطح این کوپلیمر و همچنین عدم وجود گروه‌های عاملی جهت اتصال بیولوژیکی به مولکول‌های سطحی سلول استفاده از آن را به عنوان داربست کشت سلول محدود می‌کند (۲۱ و ۱). لذا تلاش‌های فراوانی توسط محققین جهت اصلاح

سنتز نانوالیاف PLGA را نشان می‌دهد. پلیمر PLGA با نسبت ۷ درصد وزنی در حلال هگزا فلورو بیس پروپانول به مدت یک شب توسط همزن مغناطیسی حل شده و در یک سرنگ ۵ میلی‌لیتر ریخته و توسط سر سوزن شماره ۱۸ در فاصله ۱۵ سانتی‌متری جمع‌کننده در دستگاه الکتروریسی (شرکت فناوری‌سان ایران) قرار داده شد. نانو الیاف با استفاده از ولتاژ ۲۰ کیلووات با میزان تزریق یک میلی‌لیتر در ساعت تهیه گردید. شکل و میانگین قطر نانوالیاف حاصل از روند الکتروریسی با استفاده از دستگاه SEM (هیتاچی ژاپن) تعیین شد.

شرکت مرک آلمان، کتامین و زایلازین (شرکت آلفاسن هلند)، سرم و محیط کشت α -MEM (شرکت جیبکوی انگلیس) تهیه شدند. موش‌های صحرایی (رت) نر بالغ جهت استخراج سلول‌های BMSCs از آزمایشگاه حیوانات مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) تهیه گردید. همه آزمایشات و عمل‌های انجام شده بر اساس قوانین حمایت از حیوانات آزمایشگاهی که مصوب دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) بوده است، انجام گردید. الکتروریسی: شکل ۱ طرح شماتیک دستگاه الکتروریسی برای



شکل ۱: طرح شماتیک دستگاه الکتروریسی

برای تهیه‌ی SEM از نانوالیاف، ابتدا یک بخش کوچک از شبکه‌ی نانوالیاف الکتروریسی شده روی پایه‌ی نگهدارنده‌ی نمونه قرار داده شد. سپس با دستگاه لایه نشانی طلا نمونه با طلا روکش گردید. نمونه‌ها در محل مربوطه دستگاه قرار گرفته و تصاویر با بزرگنمایی‌های مختلف تهیه گردید. این کار در سه دفعه متناوب انجام و با بزرگنمایی ۲۷۰۰ برابر حداقل تعداد ۳ تصویر از قسمت‌های مختلف نمونه عکس تهیه گردید. با استفاده از نرم‌افزار هیستولب و کالیبراسیون آن حداقل تعداد ۱۸ اندازه‌گیری از ضخامت نانو الیاف انجام شد. آنالیز زاویه‌ی تماس: جهت بررسی رطوبت‌پذیری سطح نانوالیاف بدون پوشش و پوشش داده شده با ژلاتین و

اصلاح سطح نانوالیاف PLGA: نانو الیاف ابتدا توسط الکل ۷۰ درصد به مدت نیم ساعت و اشعه‌ی UV به مدت یک ساعت استریل و برای اصلاح سطح نانو الیاف از ژلاتین ۰/۵ درصد و پلی‌ال لایزین ۱ درصد استریل به مدت ۴۵ دقیقه استفاده شد. پس از خارج کردن اضافه مواد، نانوالیاف توسط محلول PBS استریل در زیر هود شستشو داده شده و در یک پلیت ۱۲ خانه‌ای تثبیت شدند. گروه‌های مورد آزمایش در چهار ردیف سه خانه‌ای پلیت کشت شامل بدون نانوالیاف، نانوالیاف PLGA، نانوالیاف PLGA پوشش داده شده با ژلاتین و با پلی‌ال لایزین آماده شدند. تهیه‌ی تصاویر با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM):

سلول‌ها توسط ۰/۲۵ درصد Trypsin و ۰/۰۴ درصد EDTA پاساژ داده شدند. این عمل تا دو پاساژ ادامه یافت، در این شرایط سلول‌ها از یک مورفولوژی دوکی شکل یکسانی برخوردار شدند.

کشت سلول‌های BMSCs با نانو الیاف PLGA: از سلول‌های BMSCs پاساژ دوم مرحله قبل سوسپانسیون سلولی تهیه و پس از بررسی تعداد در واحد حجم و زنده و مرده بودن آن‌ها توسط رنگ تریپان بلو، تعداد 5×10^3 سلول به هر کدام از خانه‌های پلیت ۱۲ خانه‌ای مذکور اضافه شد و سپس در انکوباتور CO₂ قرار داده شد. برای بررسی میزان رشد و تکثیر سلول‌ها، هر کدام از خانه‌ها در روزهای دوم، چهارم و ششم با میکروسکوپ اینورت فلورسنس (Leica آلمان) مشاهده، توسط دوربین دیجیتال متصل به میکروسکوپ (Infinity/کانادا) با بزرگنمایی‌های مختلف عکس گرفته شد. جهت شمارش سلول‌ها، ۵ میدان میکروسکوپی مختلف با بزرگنمایی ۲۰۰ برابر به صورت تصادفی انتخاب، و تعداد سلول‌ها در هر میدان با استفاده از رنگ آمیزی آکریدین اورنج شمارش و میانگین آن‌ها محاسبه گردید.

بررسی میزان زنده بودن سلول‌های BMSCs: برای بررسی زنده بودن سلول‌های BMSCs در پایان روز ششم، به هر کدام از خانه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از تریپان بلو اضافه شد و در زیر میکروسکوپ، ۱۰۰ عدد از سلول‌ها شمارش شدند و تعداد سلول‌های مرده و زنده، در روز مورد نظر مشخص شد. در این روش رنگ به داخل سلول‌های مرده نفوذ می‌کند و به رنگ آبی در می‌آیند و سلول‌های رنگ نشده معرف سلول‌های زنده هستند که با شمارش کل سلول‌ها و سلول‌های رنگ شده؛ درصد سلول‌های زنده به دست آمد. این شمارش برای ۳ بار تکرار شد.

بررسی مرگ سلولی: در پایان روز ششم جهت تعیین مرگ سلولی از ماده‌ی فلورسنت آکریدین اورنج استفاده شد (۲۸ و ۲۷). برای این منظور، ۱۰۰ میکرولیتر از رنگ آکریدین اورنج

پلی‌الایزین از دستگاه اندازه‌گیری زاویه‌ی تماس مدل KSV گروه فیزیک دانشگاه شریف استفاده گردید. بدین منظور یک قطره آب مقطر از طریق سرنگ با سر سوزن شماره‌ی ۲۲ روی سطح نمونه‌ها قرار داده شد و پس از گذشت دو دقیقه زاویه‌ی تماس بین قطره با سطح مورد نظر در سه مکان مختلف اندازه‌گیری و میانگین آن‌ها محاسبه شد.

استخراج و کشت سلول‌های BMSCs: جهت جراحی، وسایل مخصوص جراحی ظریف قبل از جراحی تمام وسایل و گان جراحی را استریل کرده جهت جلوگیری از عفونت احتمالی در حین عمل جراحی محل برش با محلول بتادین و الکل ۷۰ درصد شستشو داده شد. برای جلوگیری از آلودگی با میکروب‌ها دو عدد چراغ الکلی روشن در طرفین محل جراحی قرار گرفت. سلول‌های BMSCs از استخوان‌های ران و درشت نی موش صحرایی بالغ نژاد ویستار استخراج گردید. بدین ترتیب که پس از بیهوش کردن حیوان مخلوط ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم کتامین و ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم زایلازین (۲۶) توسط محلول بتادین جراحی و الکل ۷۰ درصد اندام خلفی و پشت حیوان به طور کامل ضدعفونی گردید. پس از خارج کردن استخوان ران حیوان، آنرا در زیر هود و تحت شرایط استریل توسط محلول PBS شستشو داده، سپس استخوان از وسط دو نیم شده و با استفاده از یک سرنگ ۵ میلی‌لیتر حاوی یک میلی‌لیتر محیط کشت α -MEM، مغز استخوان از داخل کانال استخوان آسپیره شد. محتوی داخل سرنگ در زیر هود در فلاسک مخصوص کشت سلولی حاوی محیط کشت α -MEM حاوی ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین و ۱۰ درصد FBS (Fetus Bovine Serum) ریخته، و سپس در انکوباتور CO₂ (MMM/انگلیس) قرار گرفت. پس از گذشت ۲۴ ساعت محیط کشت سلولی با محلول PBS استریل شستشو و با محیط تازه تعویض شد. هنگامی که تراکم سلول‌های چسبیده به کف فلاسک به ۷۰ تا ۸۰ درصد رسید،

۲ میکروگرم در میلی لیتر به هر کدام از خانه‌های مورد نظر اضافه شد و در زیر میکروسکوپ فلوروسنت با فیلتر آبی با طول موج ۴۶۰ تا ۴۹۰ نانومتر، ۱۰۰ عدد از سلول‌ها شمارش شدند و با دوربین دیجیتال متصل به کامپیوتر عکسی با مساحت ۲۵۷/۰۰۰ میکرومتر مربع گرفته شد. سلول‌های با هسته‌ی نارنجی یا قرمز به‌عنوان سلول‌های در حال مرگ و سلول‌های با هسته‌ی سبز به‌عنوان سلول‌های زنده در نظر گرفته و شمارش برای ۵ بار تکرار و میانگین در نظر گرفته شد.

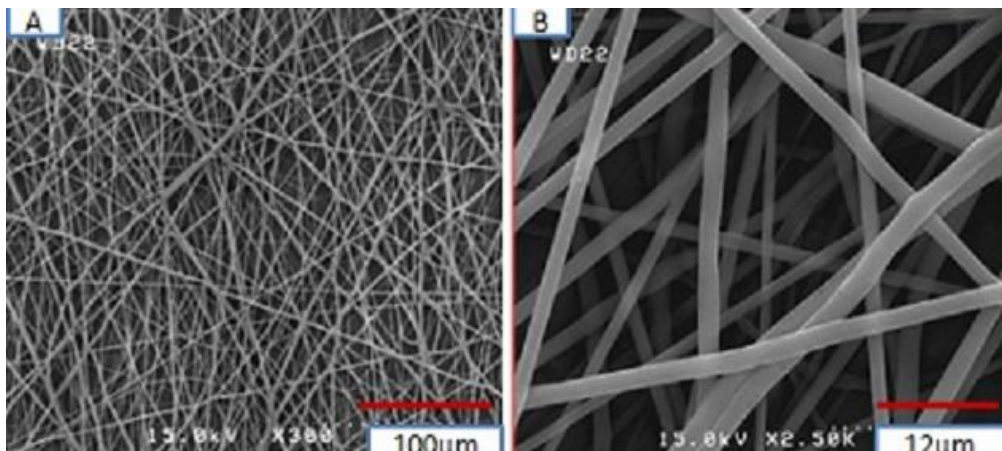
ایمونوسایتوشیمی: سلول‌ها در پایان روز ۶ جهت ثبوت به مدت ۳۰ دقیقه در معرض فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفته، سپس این سلول‌ها با PBS سه مرتبه ۵ دقیقه‌ای شسته شدند. نمونه‌ها در معرض مخلوط سرم بز ۱۰ درصد و Triton X-۱۰۰ ۳ درصد به مدت یک ساعت قرار داده شد. پس از رقیق نمودن ۱:۱۰۰ آنتی‌بادی‌های اولیه موشی Fibronectin و CD۴۴ جهت تعیین بنیادی و استرومایی بودن سلول‌ها، مدت یک شب در درجه‌ی حرارت ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. سلول‌ها پس از انجام شستشو با PBS مانند قبل مدت دو ساعت در دمای محیط در معرض آنتی‌بادی ثانویه ضد موشی

۱:۲۰۰) کونزوگه به FITC قرار گرفت. سپس شستشو با PBS انجام شد. نمونه‌ها توسط میکروسکوپ فلورسانس اینورت (Leica / آلمان) مورد بررسی قرار گرفت. جهت شمارش سلول‌ها از اتیدیوم بروماید ۰/۰۱ درصد به مدت یک دقیقه استفاده، شستشو توسط PBS انجام شد. نحوه‌ی شمارش بدین ترتیب بود که از هر ۱۰۰ 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 بر حسب میانگین \pm انحراف معیار ارایه شده است. اطلاعات به دست آمده توسط روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون Tukey مقایسه و سطح معنی‌داری در حد $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی SEM: نانو الیاف PLGA الکتروریسی شده با ضخامت‌های مختلف در چند طبقه در جهات مختلف به صورت متخلخل شکل گرفته بودند.



شکل ۲: تصاویر گرفته شده از نانو الیاف PLGA توسط میکروسکوپ الکترونی پوشش داده شده با پلی‌ال لایزین بزرگنمایی ۳۰۰ برابر (A) و بزرگنمایی ۲۵۰۰ برابر (B) نشان داده است. همان طور که در تصاویر قابل مشاهده است نانو الیاف به صورت رشته‌هایی با ضخامت‌های مختلف، پیوسته و بدون گره تشکیل شده‌اند.

مشخص کرد که به‌کار بردن دو ماده پلی‌ال لایزین و ژلاتین میزان آب دوستی آن‌را به‌طور چشمگیری افزایش داده به‌طوری‌که میزان این افزایش در گروه‌های پوشش‌دار به شدت بیش از گروه PLGA بود. مقدار زاویه‌ی تماس در گروه پلی‌ال لایزین نیز بیشتر از گروه ژلاتین بود.

نانوالیاف به دلیل خاصیت کشسانی بالا امکان جدا سازی از سطح آلومینیم را داشتند. در عکس برداری SEM از نانو الیاف توسط میکروسکوپ الکترونی قطر این الیاف بین ۲۷۰ تا ۷۰۰ نانومتر تخمین زده شد (شکل ۲).

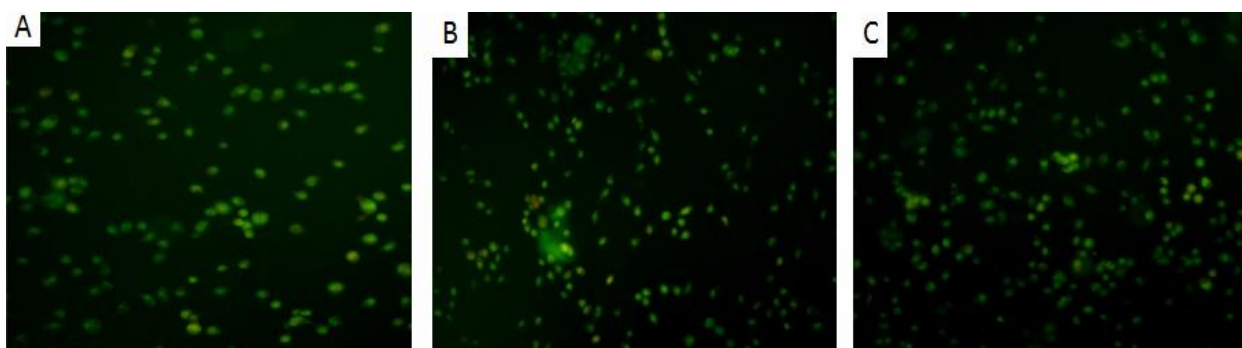
بررسی زاویه‌ی تماس: نتیجه‌ی بررسی‌های زاویه‌ی تماس

گروه‌های نانوالیاف	PLGA پوشش داده با پلی ال لایزین	PLGA پوشش داده با ژلاتین	PLGA بدون پوشش
زاویه‌ی تماس (درجه)	۴۰،۱۲	۶۴،۵۸	۱۰۷،۶۶

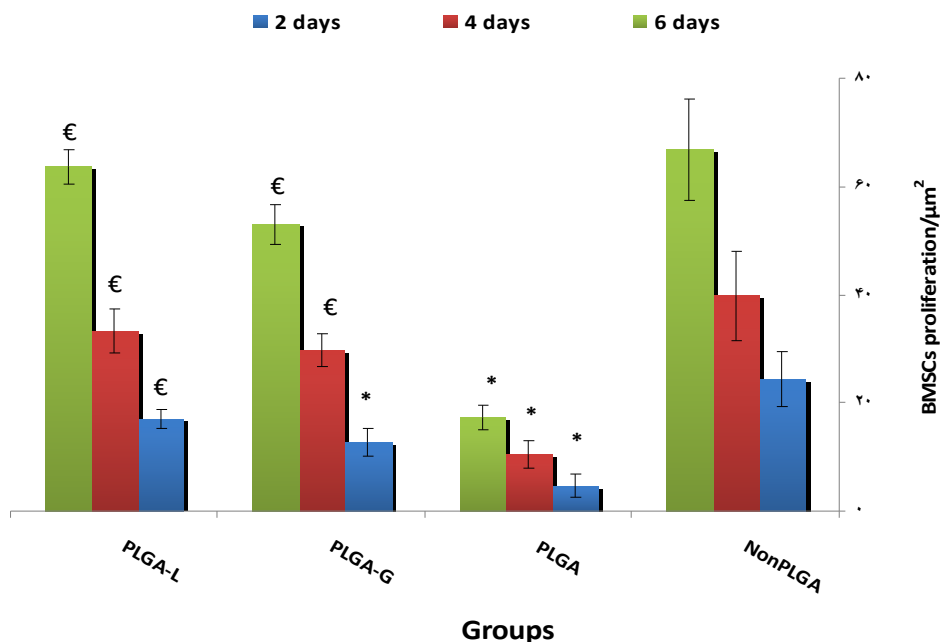
شکل ۳: میزان متوسط زاویه‌ی تماس در تصاویر فوق نشان داده شده است. همان‌طور که مشخص است میزان آب دوستی نانوالیاف با اصلاح سطح آن تغییر محسوسی می‌کند. به‌طوری‌که این میزان در نانو الیاف پوشش داده شده با پلی لایزین بیشتر از ژلاتین می‌باشد.

PLGA پوشش داده شده با پلی‌ال لایزین افزایش معنی‌داری نسبت به گروه PLGA بدون پوشش در تمام روزها داشت، این میزان در گروه PLGA پوشش داده شده با ژلاتین در روزهای چهارم و ششم نیز مشاهده گردید (شکل ۴ و نمودار ۱).

تکثیر سلول‌های BMSCs بر روی نانوالیاف: تکثیر سلول‌های BMSCs در تمام روزهای کشت سلولی روی PLGA کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد داشت. همچنین این کاهش در روز دوم گروه PLGA پوشش داده شده با ژلاتین نیز مشاهده گردید. تکثیر سلول‌های BMSCs در گروه



شکل ۴: رنگ آمیزی آکاردین اورنج از سلول‌های BMSCs روی نانو الیاف PLGA در روز ششم. (A) PLGA بدون پوشش، (B) PLGA پوشش داده شده با ژلاتین و (C) PLGA پوشش داده شده با پلی ال لایزین می‌باشد. بزرگ نمایی با عدسی ۲۰۰ برابر می‌باشد.



نمودار ۱: نمودار تکثیر سلول‌های BMSCs در روزهای دوم، چهارم و ششم در گروه‌های مورد آزمایش را نشان می‌دهد.

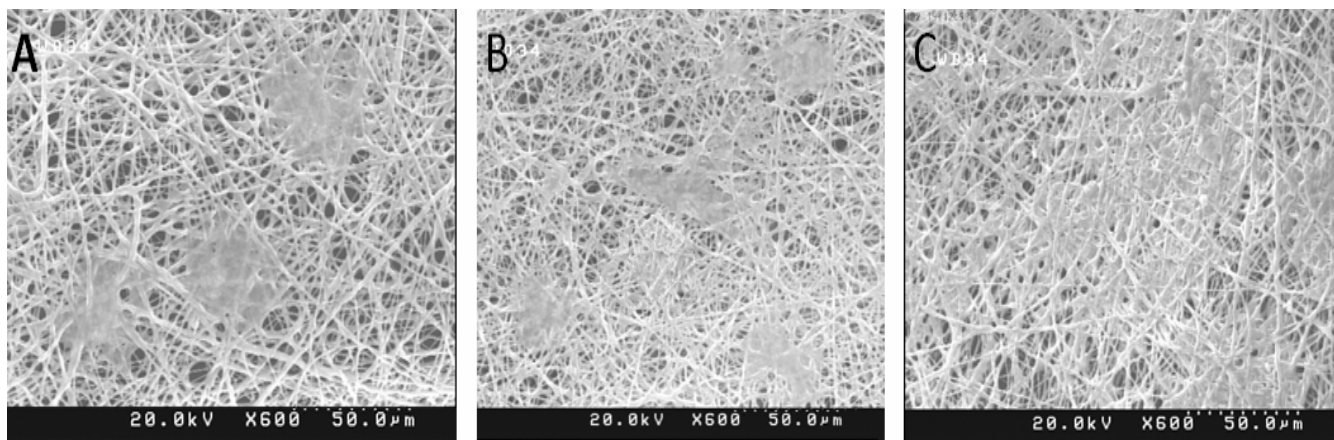
تعداد سلول بر واحد سطح $257/000$ میکرومتر مربع در نظر گرفته شده است.

€ نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار با گروه PLGA

* نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار با گروه NonPLGA

به صورت پهن با زوایا متعدد در لایه لای الیاف رشد کرده و به آن‌ها چسبیده بودند (شکل ۵).

در تصویر برداری SEM از گروه‌های نانو الیاف تفاوتی در مورفولوژی سلول‌ها مشاهده نشد. مورفولوژی سلول‌ها



شکل ۵: تصاویر میکروسکوپ الکترونی، کشت سلول‌های BMSCs روی نانو الیاف PLGA در روز ششم را نشان می‌دهد.

PLGA بدون پوشش، (A) PLGA پوشش داده شده با ژلاتین و (B) PLGA پوشش داده شده با پلی‌ال‌لایزین را نشان

می‌دهد. بزرگ‌نمایی ۶۰۰ برابر می‌باشد.

سلول‌های با هسته سبز، سلول‌های زنده و سلول‌های با هسته نارنجی یا قرمز به‌عنوان سلول‌های مرده و یا در حال مرگ می‌باشند. همانطور که در تصویر مشخص است اکثریت سلول‌ها پس از شش روز زنده بودند و درصد کمی از سلول‌ها دچار مرگ سلولی شده‌اند که هیچ اختلاف مشخصی نیز در این خصوص بین گروه‌ها وجود نداشت (شکل ۶). این میزان در جدول ۲ نشان داده شده است.

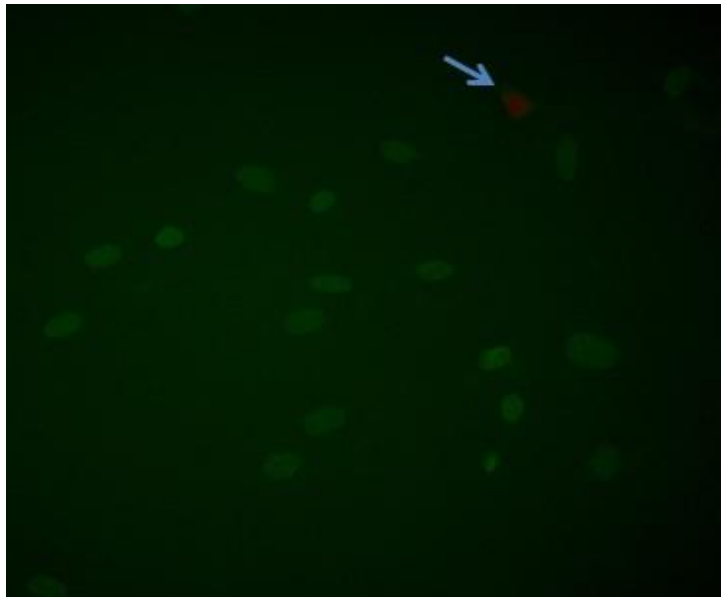
جدول ۲: درصد سلول‌های در حال مرگ در پایان روز ششم

میانگین درصد سلول‌های در حال مرگ در روز ششم	گروه‌ها
۴/۲±۰/۲	شاهد
۴/۳±۰/۳	PLGA پوشش داده با پلی‌الایزین
۴/۳±۰/۸	PLGA پوشش داده با ژلاتین
۴/۴±۰/۱	PLGA بدون پوشش

بررسی میزان زنده بودن سلول‌های BMSCs درصد سلول‌های مرده و زنده در انتهای روز ششم نشان دهنده‌ی این واقعیت بود که در پایان روز ششم پس از رنگ‌آمیزی سلول‌ها با تریپان بلو بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها زنده‌اند. در این روش رنگ به‌داخل سلول‌های مرده نفوذ کرده و به رنگ آبی دیده شدند در حالی‌که سلول‌های زنده شفاف و بدون رنگ مشاهده شدند. این میزان در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: درصد مرگ سلول‌های BMSCs

گروه‌ها	درصد سلول‌های زنده در روز ششم
شاهد	۹۷±۰/۱
PLGA پوشش داده با پلی‌الایزین	۹۶±۰/۴
PLGA پوشش داده با ژلاتین	۹۷±۰/۵
PLGA بدون پوشش	۹۴±۰/۱



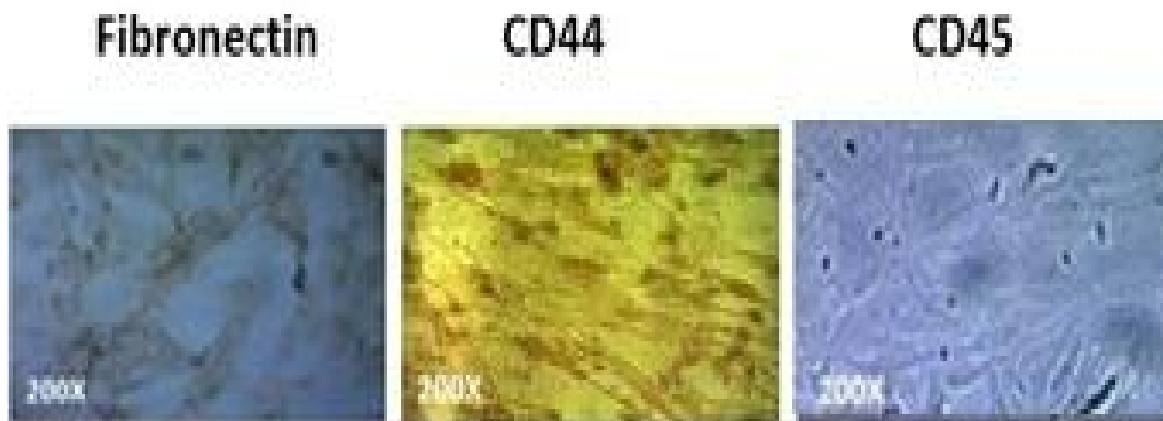
شکل ۶: سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با اکریدین اورنج هسته سلول‌های زنده به رنگ سبز و سلول‌های نشان داده شده با فلش نشان‌دهنده سلول مرده است که به رنگ نارنجی درآمده است. بزرگنمایی ۴۰۰ برابر

CD۴۴ استفاده گردید. در شکل ۷ سیتوپلاسم سلول‌ها با میکروسکوپ اینورت به رنگ قهوه‌ای دیده شد که تائیدی

ایمونوسیتوشیمی: برای اثبات استرومایی بودن و خالص بودن این سلول‌ها به ترتیب از آنتی‌بادی‌های فیبرونکتین و

وجود هرگونه سلول‌های بنیادی خون‌ساز و خالص بودن آن‌ها در پایان روز ششم است.

بر بنیادی بودن و خالص بودن سلول‌ها است. عدم پاسخ به آنتی بادی CD45 که رنگ نگرفتن آن‌ها نشان‌دهنده عدم



شکل ۷: رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس آنتی‌بادی‌های اولیه *Fibronectin* (تصویر سمت چپ) و *CD44* (تصویر وسط) و *CD45* (تصویر سمت راست) از سلول‌های *BMSCs* می‌باشد. بزرگ‌نمایی ۲۰۰ برابر می‌باشد

بحث

استخوان انسانی به سمت هیپاتوسیت‌ها بر روی نانو داربستی متشکل از پلی کاپرولاکتون، کلاژن و پلی اترسولفون وجود دارد و داربست مذکور برای این منظور بسیار مناسب بوده است (۳۰) و نوع سلول استفاده شده در این تحقیق از نظر رده‌ی سلولی همان سلول‌های مورد مطالعه‌ی 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 کرده‌اند، در حالی هدف ما عدم تمایز سلولی و حفظ بنیادی بودن آن‌ها بوده است. نانوالیاف PLGA بدلیل وجود گروه‌های جانبی متیل در پلی لاکتیک دارای سطح آبگریز بوده علیرغم دارا بودن محاسن زیاد برای کشت سلولی نیاز به اصلاح سطح دارد. در اصلاح سطح پلیمرهای آبگریز نظیر PLGA نکته‌ای که حایز اهمیت می‌باشد این است که این پلیمرها در حلال‌های آلی حل می‌شوند در حالی‌که پروتئین‌ها و سایر موادی که برای اصلاح سطح این پلیمرها استفاده می‌شوند، آبدوست بوده، در موقع انحلال با حلال آلی تشکیل یک محیط دوفازی را می‌دهند که

تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان‌دهنده‌ی وجود الیاف با قطر بین ۲۷۰ تا ۷۰۰ نانومتر بوده، با تخلخل بالا که به‌خوبی توانسته بود، الیاف ماتریکس خارج سلولی را برای سلول شبیه‌سازی نموده، چسبندگی و اتصال مناسبی با سلول‌ها داشته باشد. از نکات ضروری ساخت داربست‌ها در مهندسی بافت این است که ساختار تهیه شده باید شبیه ساختار طبیعی ماتریکس خارج سلولی باشد. ماتریکس خارج سلولی طبیعی نه تنها یک ساختار فیزیکی برای حمایت سلول ایجاد می‌کند بلکه موجب ایجاد یک شرایط خاص حاوی اتصال اختصاصی برای سلول، مهاجرت مواد درون سلولی و خارج سلولی، تنظیم تکثیر سلولی و فاکتورهای رشد مختلف می‌گردد. در آزمایشی که توسط چنگیو و همکارانش انجام شد، ثابت شد که داربست‌های نانوفیبری به‌وسیله‌ی یک مجموعه‌ی عظیمی از سوراخ‌های ریز، یک محیط مناسب برای اتصال و تکثیر سلول بوده می‌باشد (۲۹). در مطالعه‌ی دیگری نشان داده شد که امکان تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادین مزانشیمی مغز

آسان‌تر از روش‌های دیگر مانند اختلاط این مواد به صورت کامپوزیت قبل از الکتروریسی PLGA می‌باشد، چرا که این مواد می‌توانند مشکلات زیادی در فرایند الکتروریسی نظیر تغییر ویسکوزیتی محلول و امکان عدم انحلال این مواد در حلال مورد نظر و موارد دیگر را به وجود آورند. همچنین با توجه به حلالیت بالای ژلاتین در محیط‌های آبی وارد شدن آن در درون پلیمر PLGA امکان دارد ساختار آن را که به صورت‌های مختلف نظیر نانو الیاف، فیلم نازک، نانوکپسول و غیره سنتز می‌گردد، در محیط کشت و یا محیط داخلی بدن به طور کلی به هم ریخته و یا خصوصیات مکانیکی این پلیمر را کاهش دهد. این کاهش خصوصیات مکانیکی در تحقیقات جداگانه‌ای که توسط Li X و Meng Z و همکارانشان انجام شده است، مشخص گردیده است در حالی که در مطالعه‌ی حاضر به دلیل عدم اختلاط مواد با PLGA این ضعف برطرف شده است (۳۳ و ۳۲). با اصلاح سطح این پلیمر، PLGA در کنار سایر خصوصیات بی نظیر خود می‌تواند پلیمری ایده آل برای مصارف پزشکی مانند استفاده در مهندسی بافت به عنوان داربست کشت سلولی، در ساخت کانال‌های راهنمای عصبی برای درمان اعصاب قطع شده محیطی، به عنوان حامل در دارورسانی و موارد دیگر باشد.

References

- 1- Subramanian A, Krishnan UM, Sethuraman S. Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: biomaterial mediated neural regeneration. *J Biomed Sci.* 2009; 16: 108.
- 2- Han D, Gouma PI. Electrospun bioscaffolds that mimic the topology of extracellular matrix. *Nanomedicine.* 2006; 2: 37-41.
- 3- Kim TG, Park TG. Biomimicking extracellular

برای غلبه بر این مشکل محققین مجبور به استفاده از پلیمرهای دو قطبی نظیر PEG-grafted-chitosan و یا کopolymer سه بلوک PLGA-PEG هستند. از طرف دیگر PEG پیوند شده به کیتوسان می‌تواند روی سطح الیاف PLGA قرار گرفته، از اتصال سلولی به الیاف جلوگیری نماید (۳۱). نتیجه‌ی بررسی‌های زاویه تماس مشخص می‌کند که به کار بردن دو ماده پلی‌ال لایزین و ژلاتین میزان آبدوستی آن را به طور چشمگیری افزایش داده به طوری که میزان این افزایش در پلی‌ال لایزین بیشتر از ژلاتین بود. این افزایش می‌تواند نتیجه‌ی وجود گروه‌های عاملی آمینی غنی از بار مثبت در پلی‌ال لایزین باشد، در حالی که ژلاتین حاوی اسید آمینه‌های متفاوت آبدوست و آبگریز است، بررسی‌های کشت سلول‌های استرومایی مغز استخوان نشان می‌دهد، که اصلاح سطح PLGA توسط این دو ماده اختلاف معنی‌داری را در میزان رشد و تکثیر این سلول‌ها در مقایسه با نانو الیاف اصلاح نشده نشان می‌دهد، در حالی که این اختلاف در مقایسه با گروه شاهد به استثناء روز دوم در PLGA اصلاح شده با ژلاتین معنی‌دار نبود و این نشان دهنده تاثیر مثبت هر دو ماده در رشد و تکثیر سلول‌ها می‌باشد و این تاثیر در پلی‌ال لایزین کمی بهتر از ژلاتین دیده شد و همچنین این مطالعه نشان می‌دهد که پوشش دادن، روشی به مراتب ساده‌تر و

- matrix: cell adhesive RGD peptide modified electrospun poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) nanofiber mesh. *Tissue Eng.* 2006; 12: 221-33.
- 4- Müller M, Vörös J, Csucs G, et al. Surface modification of PLGA microspheres. *J Biomed Mater Res A.* 2003; 66: 55-61.
 - 5- Chan JM, Zhang L, Yuet KP, et al. PLGA- lecithin-PEG core-shell nanoparticles for

- controlled drug delivery. *Biomaterials*. 2009; 30: 1627-34.
- 6- Hao W, Dong J, Jiang M, Wu J, Cui F, Zhou D. Enhanced bone formation in large segmental radial defects by combining adipose-derived stem cells expressing bone morphogenetic protein 2 with nHA/RHLC/PLA scaffold. *Int Orthop*. 2010; 34: 1341-9.
- 7- Montjovent M-O, Mark S, Mathieu L, et al. Human fetal bone cells associated with ceramic reinforced PLA scaffolds for tissue engineering. *Bone*. 2008; 42: 554-64.
- 8- Badrossamay MR, McIlwee HA, Goss JA, Parker KK. Nanofiber assembly by rotary jet-spinning. *Nano lett*. 2010; 10: 2257-61.
- 9- Lohan A, Marzahn U, El Sayed K, et al. In vitro and in vivo neo-cartilage formation by heterotopic chondrocytes seeded on PGA scaffolds. *Histochem Cell Biol*. 2011; 136: 57-69.
- 10- Cao H, Kuboyama N. A biodegradable porous composite scaffold of PGA/ β -TCP for bone tissue engineering. *Bone*. 2010; 46: 386-95.
- 11- Wu YC, Shaw SY, Lin HR, Lee TM, Yang CY. Bone tissue engineering evaluation based on rat calvaria stromal cells cultured on modified PLGA scaffolds. *Biomaterials*. 2006; 27: 896-904.
- 12- Makadia HK, Siegel SJ. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*. 2011; 3: 1377-97.
- 13- Bae HK, Chung CP, Chung DJ. Preparation and in vitro evaluation of nerve conduit using electro-spun biodegradable polymers. *Materials Science and Engineering*. 2007; 342: 325-8.
- 14- Anderson JM, Shive MS. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Delive Rev*. 1997; 28: 5-24.
- 15- Bala I, Hariharan S, Kumar M. PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 2004; 21: 387-422.
- 16- Fulzele S, Satturwar P, Dorle A. Study of the biodegradation and in vivo biocompatibility of novel biomaterials. *Eur J Pharm Sci*. 2003; 20: 53-61.
- 17- Jamie Tsung M, Burgess DJ. Preparation and characterization of gelatin surface modified PLGA microspheres. *AAPS J Pharm Sci*. 2001; 3: 14-24.
- 18- Kempen DHR, Lu L, Zhu X, Development of biodegradable poly (propylene fumarate)/poly (lactic-co-glycolic acid) blend microspheres. II. Controlled drug release and microsphere degradation. *J Biomed Mater Res A*. 2004; 70: 293-302.
- 19- Vandrovcová M, Douglas T, Hauk D, et al. Influence of collagen and chondroitin sulfate (CS) coatings on poly-(lactide-co-glycolide)(PLGA) on MG 63 osteoblast-like cells. *Physiol Res*. 2011; 60: 797-813.
- 20- Zhao L, He C, Zhang DM, Chang J, Cui L. Comparison of electrospun PBSU and PLGA scaffolds applied in vascular tissue engineering. *J Biomimetics, Biomaterials, and Tissue Engineering*. 2009; 2: 27-38.
- 21- Krämer M, Chaudhuri JB, Ellis MJ, De Bank PA. Promotion of neurite outgrowth via

incorporation of poly-L-lysine into aligned PLGA nanofibre scaffolds. *European Cells and Materials*. 2011; 22: 53.

22- Croll TI, O'Connor AJ, Stevens GW, Cooper-White JJ. Controllable surface modification of poly (lactic-co-glycolic acid)(PLGA) by hydrolysis or aminolysis I: Physical, chemical, and theoretical aspects. *Biomacromolecules*. 2004; 5: 463-73.

23- Fahmy TM, Samstein RM, Harness CC, Mark Saltzman W. Surface modification of biodegradable polyesters with fatty acid conjugates for improved drug targeting. *Biomaterials*. 2005; 26: 5727-36.

24- Rao SS, Winter JO. Adhesion molecule-modified biomaterials for neural tissue engineering. *Front Neuroeng*. 2009; 2: 6-10.

25- Herbst TJ, McCarthy JB, Tsilibary EC, Furcht LT. Differential effects of laminin, intact type IV collagen, and specific domains of type IV collagen on endothelial cell adhesion and migration. *J Cell Biol*. 1988; 106: 1365-73.

26- Yeu IS, Lee HJ, Yi JS, Yang JH, Lee IW, Lee HK. The survival and migration pattern of the bone marrow stromal cells after intracerebral transplantation in rats. *J Korean Neurosurg Soc*. 2004; 36: 400-4.

27- Prins JB, Niesler CU, Winterford CM, et al. Tumor necrosis factor- α induces apoptosis

of human adipose cells. *Diabetes*. 1997; 46: 1939-44.

28- Farka R. Easy and fast detection of vacuoles in cell death committed prepupal salivary glands of *Drosophila melanogaster* by acridine orange. *Dros Inf Serv*. 2001; 84: 172-74.

29- Xu C, Inai R, Kotaki M, Ramakrishna S. Electrospun nanofiber fabrication as synthetic extracellular matrix and its potential for vascular tissue engineering. *Tissue Eng*. 2004; 10: 1160-8.

30- Kazemnejad S, Allameh A, Soleimani M, et al. Development of a novel three-dimensional biocompatible nanofibrous scaffold for the expansion and hepatogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Iran J Biotechnol*. 2007; 5: 201-11.

31- Du H, Chandaroy P, Hui SW. Grafted poly-(ethylene glycol) on lipid surfaces inhibits protein adsorption and cell adhesion. *Biochim Biophys Acta*. 1997; 1326: 236-48.

32- 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. *Mater Sci Eng*. 2010; 30: 1204-10.

33- Li X, Cai S, Liu B, et al. Characteristics of PLGA-gelatin complex as potential artificial nerve scaffold. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2007; 57: 198-203.

Study of the Coculture of Bone Marrow Stromal Cells (BMSCs) with PLGA Nanofibers Coated with Gelatin and Poly-L-lysine

Zolfagari D¹, Kaka G², Sadri M³, Sadraie H², Emamgoli A¹, Asghari Jafarabadi M⁶, Herfedoost Gh¹

¹Neuroscience Research Center and Nano-Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

²Dept. of Neuroscience Research Center and Anatomy, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³Biological Technology Research Institute, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

⁴Medical Education Research Center, Dept. of Statistics and Epidemiology, Faculty of Health, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

Corresponding Author: Kaka G, Dept. of Neuroscience Research Center and Anatomy, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

E-mail: gh_kaka@yahoo.com

Received: 18 Feb 2013 **Accepted:** 27 Jan 2014

Background and Objective: Poly D,L-lactic-co-glycolic acid (PLGA) is known as biodegradable and biocompatible polymer. These polymers have recently received much attention in tissue engineering. The aim of this study was to investigate the biological behavior of the bone marrow stromal cells (BMSCs) in culturing with PLGA nanofibers coated with poly-L-lysine or gelatin.

Materials and Methods: In this study, the electrospinning of PLGA nanofibers was performed with hexafluoro-2-propanol (HFIP) as solvent and coated with gelatin and poly-L-lysine, separately. The properties of polymers were investigated with scanning electron microscopy (SEM) analysis and contact angles were studied. After culturing BMSCs and reaching passage two, cells in the four groups of nanofibers, nanofibers PLGA, PLGA nanofibers coated with poly-L-lysine, and PLGA nanofibers coated with gelatin, were grown. Cell proliferation during the second, fourth and sixth days were examined by Acridin Orange and morphology of the cells seeded on nanofibers were investigated via SEM.

Results: The mean diameter of PLGA nanofibers were between 270 - 700 nm. The average contact angles were 107.66° for PLGA, 64.58 for PLGA coated with gelatin and 40.12 for poly-L-lysine-coated PLGA, respectively. The results showed significant reduction in cell proliferation in PLGA nanofibers alone ($P < 0.05$). But this number increased in groups of nanofibers coated with poly-L-lysine and gelatin.

Conclusion: Culture of Schwann cells with PLGA nanofibers coated with gelatin and particularly coated with poly-L-lysine provide a biodegradable scaffold associated with Schwann cells.

Keywords: PLGA nanofiber, Bone marrow stromal cells (BMSCs), Gelatin, Poly-L-lysine