



Evolution of M13 Bacteriophage and RGD Peptide Effects on Induction of Angiogenesis and Regenerative Potential of Mouse Primary Lymph Node Fibroblasts

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Safari Z.¹ MSc,
Soudi S.² PhD,
Zavaran Hosseini A.² PhD,
Bardania H.³ PhD,
Sadeghizadeh M.^{*1} PhD

How to cite this article

Safari Z, Soudi S, Zavaran Hosseini A, Bardania H, Sadeghizadeh M. Evolution of M13 Bacteriophage and RGD Peptide Effects on Induction of Angiogenesis and Regenerative Potential of Mouse Primary Lymph Node Fibroblasts. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(4):593-599.

¹Genetics Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²Immunology Department, Medicine Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

³Cellular & Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

*Correspondence

Address: Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran. Postal Code: 1411713116

Phone: +98 (21) 82884409

Fax: -

sadeghma@modares.ac.ir

Article History

Received: December 20, 2018

Accepted: January 26, 2019

ePublished: December 21, 2019

ABSTRACT

Aims One of the most important regenerative medical purposes is the production of alternative tissues with proper function. Fibroblast cells are one of the most important types of cells in the repair process that also play a role in the formation of blood vessels. Stimulation of fibroblastic cells requires the appearance of external signals to begin the proliferation and recall of other cells, as well as angiogenesis. The aim of this study was to investigate the effects of M13 in combination with RGD peptide on fibroblastic cells.

Materials and Methods For this study, M13 bacteriophage was first amplified and isolated. Then RGD peptide was synthesized and purified. Then, isolated mouse fibroblastic cells were culture on surfaces coated with M13 bacteriophage, bacteriophage M13 and RGD, gelatin, and surfaces without coated as a control for 48 hours. MTT assay was used to measure the proliferation and survival of cells, and then the expression of FGF-2, TGF- β 1 and VEGF-A genes was measured by real-time PCR.

Findings The results of this study showed that the M13 and RGD bacteriophage increased cell proliferation and the fibroblast cell survival rate. In addition, expression of FGF-2, TGF- β 1 and VEGF-A genes in cultured fibroblasts on the M13 and RGD bacteriophages surface increased significantly.

Conclusion Our research showed that scaffolds of M13 bacteriophage and RGD peptide are nontoxic and bio-compatible so they can be a suitable candidate for induction of repair and angiogenesis in tissue engineering.

Keywords Fibroblast; Bacteriophage M13; RGD peptide; Tissue Engineering

CITATION LINKS

[1] Chemisorbed poly (propylene sulphide)-based copolymers resist biomolecular ... [2] Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based ... [3] The extracellular matrix as a cell survival ... [4] The extracellular matrix guides the orientation of the cell division ... [5] Regional fibronectin and collagen fibril co-assembly directs cell proliferation and microtissue ... [6] Extracellular matrix revisited: Roles in tissue ... [7] Extracellular-matrix-based and Arg-Gly-Asp-modified photopolymerizing hydrogels for cartilage tissue ... [8] Decoration of RGD-mimetic porous scaffolds with engineered and devitalized extracellular matrix for adipose tissue ... [9] Engineering of M13 bacteriophage for development of tissue engineering ... [10] Enhanced cartilage tissue engineering by sequential exposure of chondrocytes to FGF-2 during 2D expansion and BMP-2 during 3D ... [11] Biological response to a synthetic ... [12] Transforming growth factor- β in stem cells and tissue ... [13] Angiogenic growth factor synergism in a murine tissue engineering model of angiogenesis and ... [14] Delivery of basic fibroblast growth factor (bFGF) from photoresponsive hydrogel ... [15] Reproducible isolation of lymph node stromal cells reveals site-dependent differences in fibroblastic reticular ... [16] RGD-peptides for tissue engineering of articular ... [17] Genetically engineered nanofiber-like viruses for tissue regenerating ... [18] Engineered phage nanofibers induce ... [19] Fabrication of engineered M13 bacteriophages into liquid crystalline films and fibers for directional growth and encapsulation of ... [20] Wound healing: An ... [21] Melanoma-stroma interactions: Structural and functional ... [22] Modulation of proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells by fibroblast growth factor 2: Potential implications for tissue engineering of tendons and ... [23] Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF- β signaling in bone ... [24] TGF- β -induced epithelial to mesenchymal ...

بررسی اثر باکتریوفاژ M13 و پپتید RGD در القای آنژیوژنز و پتانسیل ترمیم سلول‌های فیبروبلاستی غدد لنفی موشی

زهره سفری MSc

گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

سارا سعودی PhD

گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

احمد زواران حسینی PhD

گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

حسن بردانیا PhD

مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

مجید صادقی‌زاده PhD

گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

اهداف: یکی از مهم‌ترین اهداف پزشکی بازساختی، تولید بافت‌های جایگزین با عملکرد صحیح است. سلول‌های فیبروبلاستی یکی از مهم‌ترین انواع سلول‌ها در فرآیند ترمیم هستند که در تشکیل عروق خونی نیز نقش دارند. تحریک سلول‌های فیبروبلاستی برای شروع تکثیر و فراخوان دیگر سلول‌ها و همچنین آنژیوژنز نیاز به سیگنال‌های بیرونی مناسب دارد. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات باکتریوفاژ M13 در ترکیب با پپتید RGD روی سلول‌های فیبروبلاستی است.

مواد و روش‌ها: برای این مطالعات، ابتدا باکتریوفاژ M13 تکثیر و جداسازی شد. سپس پپتید RGD سنتز و خالص‌سازی شد در ادامه سلول‌های فیبروبلاستی جداسازی شده از موش، روی سطوح پوشش داده شده با باکتریوفاژ M13، باکتریوفاژ M13 و RGD، ژلاتین و سطوح کنترل به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شد. سپس برای اندازه‌گیری میزان تکثیر و بقای سلول‌ها تست MTT صورت گرفت و پس از آن میزان بیان ژن‌های *FGF-2*، *TGF-β1* و *VEGF-A* به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (Real-Time PCR) اندازه‌گیری شد. **یافته‌ها:** نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سطح باکتریوفاژ M13 و RGD موجب افزایش تکثیر سلولی و میزان زنده ماندن سلول‌های فیبروبلاست گشته است. علاوه بر این، بیان ژن‌های *FGF-2*، *TGF-β1* و *VEGF-A* در سلول‌های فیبروبلاست کشت داده شده روی سطح باکتریوفاژ M13 و RGD به طور معنی‌دار افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: تحقیق حاضر نشان داد که داربست‌هایی از جنس باکتریوفاژ M13 و پپتید RGD به دلیل عدم سمیت و زیست‌سازگار بودن می‌توانند کاندید مناسبی برای القای ترمیم و آنژیوژنز در مهندسی بافت باشند.

کلیدواژه‌ها: فیبروبلاست، باکتریوفاژ M13، پپتید RGD و مهندسی بافت

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۹/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۶

*نویسنده مسئول: sadeghma@modares.ac.ir

مقدمه

ساخت و طراحی مواد زیستی در بسیاری از زمینه‌های فناوری از جمله داروها، بیوسنسورها و داربست‌های مهندسی بافت از اهمیت زیادی برخوردار است. مدل‌های تعریف شده تا به امروز در مقیاس میکرو و نانو توسعه یافته است. به تازگی مواد زیستی مانند پپتیدها،

پلیمرها یا پروتئین‌های ماتریکس برای ساخت داربست‌ها مورد استفاده قرار گرفته است [1, 2].

در بدن، اکثر سلول‌ها روی ماتریکس خارج سلولی (ECM) رشد می‌کنند. این ماتریکس شامل پروتئین‌های فیبری و گلیکوپروآمینوگلیکان‌ها است و یک محیط ضروری برای زنده ماندن سلول‌ها فراهم می‌کند. ECM روی رفتارهای سلولی مانند چسبندگی سلولی، تکثیر و تمایز از طریق سیگنال‌های بیوشیمیایی یا فیزیکی تاثیر می‌گذارد و محیط میکروتیک سه‌بعدی را فراهم می‌کند که موجب رشد سلولی می‌شود [3-5].

اخیراً تلاش‌های زیادی برای ایجاد یک ECM مصنوعی برای مهندسی بافت در حال انجام است. برای این امر از پلیمرها و مواد زیستی زیست‌تخریب‌پذیر با سازگاری عالی، خواص فیزیکی و شیمیایی مناسب استفاده شده است [6]. پروتئین‌های چسبنده مانند فیبرونکتین و لامینین نقش مهمی در چسبندگی و تکثیر سلولی ایفا می‌کنند. به طور کلی، بسیاری از سلول‌های پستانداران به وسیله ارتباط مستقیم بین گیرنده پروتئین خود با پروتئین‌های موجود روی داربست به ECM متصل می‌شوند. فاکتور اصلی فیبرونکتین ماتریکس برای اتصال سه پپتید آرژنین-گلاسنین-اسیدآسپارتیک (RGD) به کار می‌رود. بنابراین ماتریکس‌های دارای پپتیدهای RGD می‌توانند به چسبندگی و رشد صحیح سلول‌ها کمک کنند، همچنین باعث می‌شوند که سلول‌های متصل به آنها دارای عملکرد صحیح باشند [7, 8].

مطالعات اخیر در زمینه مهندسی بافت و ساخت داربست‌ها به سمت استفاده از داربست‌های زیستی پیش رفته است زیرا به دلیل طبیعی بودن این داربست‌ها، پاسخ سیستم ایمنی بدن به آنها بسیار کمتر است. باکتریوفاژ M13، یک ویروس باکتریایی با شکل نانوفیبری است و از این رو هیچ ضرری برای سلول‌های پستانداران ندارد. مطالعات قبلی نشان داده است که باکتریوفاژ M13 می‌تواند بسیاری از پروتئین‌های مورد نظر ما را به صورت ژنتیکی یا شیمیایی روی سطح خود داشته باشد. علاوه بر این، باکتریوفاژهای M13 به علت ویژگی ساختاری خود می‌توانند به راحتی به عنوان نانوفیبر در کنار هم شکل گیرند و به صورت دو یا سه‌بعدی مورد استفاده قرار گیرند. پیشرفت‌های اخیر در شناسایی نانومواد عملیاتی، باکتریوفاژ را به عنوان یک فرصت جدید در زمینه مهندسی پزشکی معرفی کرده است [9].

فاکتور رشد تغییردهنده بتا-۱ که به اختصار $TGF-\beta 1$ و فاکتور رشد فیبروبلاست-۲ که به اختصار $FGF-2$ نامیده می‌شود، در تکثیر فیبروبلاست‌ها، تحریک تولید کلاژن، الاستین و سنتز فیبرونکتین نقش اساسی دارند [10].

در مطالعات گذشته نشان داده شده است که $TGF-\beta 1$ و $FGF-2$ پس از آسیب بافتی، در شرایط "محیط زنده" افزایش بیان داشته و همچنین این عوامل رشد در استرومای موضعی که در آن آسیب اتفاق افتاده است، موجب افزایش مهاجرت سلول‌ها می‌شوند. بررسی این عوامل رشد در "محیط زنده" نشان داده است [11, 12] که آنها در

استفاده از دی‌متیل‌فرمالید (DMF) و N-متیل‌پیرولیدون (NMP) صورت گرفت. کارایی کوپلینگ با استفاده از آزمون کینز نین هیدرین بررسی شد. جداسازی پپتید سنتزی نهایی از رزین به مدت ۲ ساعت با استفاده از کوکتیل شکسته حاوی تری‌فلوئور اسیدهای اسید (TFA)، آب و تری‌ایزوپروپیل سالین (TIPS) و حذف رزین توسط فیلتراسیون صورت گرفت. برای خلوص پپتید، RGD آماده‌شده در دی‌اتیل سرد و یخ خشک به مدت ۲۴ ساعت رسوب داده شد. وزن مولکولی پپتید توسط اسپکترومتری مدل LC-MS (Agilent Technology Series) تایید شد.

جداسازی و کشت سلول‌های فیبروبلاستی: ۵ سر موش بلب/سی ماده در سن ۶ تا ۸ هفتگی (موسسه پاستور؛ ایران) خریداری و در آزمایشگاه حیوانات مطابق با دستورالعمل‌های کمیسیون اخلاقی دانشگاه تربیت مدرس، نگهداری شد. برای جداسازی فیبروبلاست غدد لنفاوی ابتدا موش‌ها را به وسیله کلروفورم کشته، سپس غدد لنفاوی زیرکشاله و زیربغل آنها خارج و با روش آنژیومی کلاژناز سلول‌های فیبروبلاستی جدا شدند و در فلاسک کشت در محیط DMEM-F12 (گیبکو؛ ایالات متحده)، با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS؛ گیبکو؛ ایالات متحده) و ۱٪ پنی‌سیلین/استرپتومایسین به مدت ۲۱ روز کشت و هر دو روز یک‌بار محیط آن تعویض شد.

تایید سلول‌های فیبروبلاست: تجزیه و تحلیل فنوتیپی سلول‌های جداشده با استفاده از روش فلوسیتومتری برای نشانگرهای CD45⁺، CD80⁺ و CD31⁺ که در مطالعات قبلی به عنوان مارکرهای سطحی فیبروبلاست‌های لنفاوی شناخته شده‌اند^[15]، مورد استفاده قرار گرفت. برای این تست ابتدا سلول‌های کشت داده‌شده، ترپسینه شد سپس با آنتی‌بادی‌های علیه CD45، CD80 و CD31 که همگی کوئزوگه به رنگ فلورسنت FITC هستند به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شدند، سپس بعد از دوبرار شست‌وشو با PBS، نمونه‌ها با دستگاه فلوسایتومتری مدل BD FACS Canto II (BD Bioscience؛ ایالات متحده) در محدوده FL-1 با طول موج ۵۲۵ نانومتر اندازه‌گیری شد و داده‌ها توسط نرم‌افزار Flowing software 2.4.1 آنالیز شدند.

سنجش تکثیر و بقا سلول‌ها به وسیله تست MTT: برای بررسی سازگاری بیولوژیکی باکتریوفاژ M13 (۱۰^۶ pfu/ml) و پپتید RGD از تست MTT (استفاده از نمک ۳-۴-۵ دی‌متیل‌تيازول-۲-تیل)-۵ و ۲-دی‌فنیل‌تترازولیوم بروماید) استفاده شد. برای این تست پس از کشت سلول‌های فیبروبلاست در یک پلیت ۹۶ خانه‌ای (۳×۱۰×۵ سلول در هر خانه)، از محلول MTT (با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، ۲۰ میکرولیتر به محیط کشت سلولی هر خانه اضافه و پلیت در دمای ۳۷°C انکوبه شد. پس از ۴ ساعت، محیط رویی دور ریخته شد و ۲۰۰ میکرولیتر دی‌متیل‌سولفوکسید (سیگما آلدریج؛ ایالات متحده) به هر چاهک برای حل‌شدن بلورهای فورمازان اضافه شد و میزان رنگ بلورهای حل شده به وسیله دستگاه خوانش الیزا در طول موج ۵۴۰ نانومتر (Biotek؛ ایالات متحده) اندازه‌گیری شد.

تنظیم سنتز مولکول‌های ماتریکس نقش دارند و برای مراحل اولیه و بهبود زخم حیاتی هستند^[13, 14].

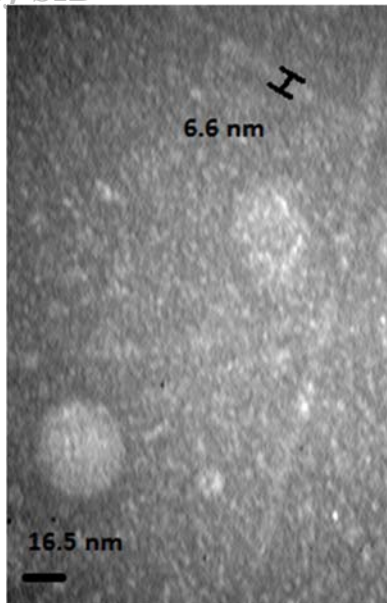
بخش بزرگی از تحقیقات در زمینه مهندسی بافت با هدف طراحی استراتژی‌هایی برای بهبود پتانسیل آنژیوژنیک بافت‌های مهندسی‌شده با استفاده از داربست‌های زیستی، انجام شده است. یکی از فاکتورهای مهم رگ‌زایی فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF_A) است. داربست‌هایی که باعث افزایش بیان این فاکتور توسط سلول‌های فیبروبلاستی و اندوتلیالی شوند می‌توانند رگ‌زایی به سمت بافت مهندسی‌شده را افزایش دهند که این امر منجر به پایداری بافت مورد نظر در بدن خواهد شد.

با توجه به این که باکتریوفاژ M13 قابلیت‌هایی مانند عدم سمیت و خودتجمعی دارد و همچنین وجود پپتید RGD موجب افزایش اتصال سلول‌ها به سطح می‌شود. برای افزایش رشد و تحریک آنژیوژنز و افزایش قابلیت ترمیم سلول‌های فیبروبلاستی این ماده زیستی انتخاب شد.

مواد و روش‌ها

تکثیر و جداسازی باکتریوفاژ M13: باکتریوفاژهای M13 با توجه به پروتکل استاندارد، تکثیر و جداسازی شدند. باکتری *E. coli* در ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت ytx^۲ کشت داده شد و زمانی که باکتری‌ها به مرحله میانی ورودی رشد خود رسیدند (فاز لگاریتمی) از انکوباتور خارج و سپس با یک میلی‌لیتر باکتریوفاژ M13 وحشی (۱۰^{۱۰} PFU/ml) آلوده شد. کشت‌ها به مدت ۶ ساعت در دمای ۳۷°C (تکان دادن ۲۵۰ دور) انکوبه و سپس به مدت ۳۰ دقیقه به میزان ۸۰۰۰g سانتریفیوژ شدند تا سلول‌های باکتریایی حذف شدند. در نهایت، باکتریوفاژها به وسیله سانتریفیوژ با دور ۲۰۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه جمع‌آوری شدند. رسوب فاز حاصل در محلول فسفات بافر (PBS؛ گیبکو، ایالات متحده) حل و غلظت باکتریوفاژ جداشده به روش اسپکتروفتومتری با استفاده از طول موج ۲۶۹ نانومتر تعیین شد.

تایید باکتریوفاژ M13 به وسیله میکروسکوپ الکترونی (TEM): برای تجزیه و تحلیل TEM، ۲۰ میلی‌لیتر از محلول باکتریوفاژ M13 روی یک شبکه مس مجهز به کربن ۳۰۰ مش (AGS160-3) قرار گرفت و سپس شبکه با ۲٪ اورانیل استات رنگ‌آمیزی شد. پس از رنگ‌آمیزی، شبکه با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شد. عکس‌برداری از نمونه‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره مدل EM10C (شرکت Zeiss؛ آلمان) با ولتاژ ۸۰ کیلوولت صورت گرفت. **سنتز و تایید ساختار پپتید RGD:** پپتید (RGD) با دنباله (GGGRGDS) به صورت دستی روی فاز جامد با استفاده از رزین ۲-کلروتری‌کلرید به عنوان ماده جامد، با توجه به استاندارد ۹-Fmoc) فلورومتوکسی‌کربونیل شیمی سنتز شده است. ترکیب اسیدهای آمینه با استفاده از HATU و DIEA، به عنوان واکنش‌های اتصال و پیپریدین برای فرآیند محافظت از ضایعات تهیه شد. واشرهای بین اتصال و حفاظت از دی‌اکسیدکربن با



شکل ۱) باکتریوفاز M13

تایید ساختار و جرم پپتید RGD: پپتید RGD با استفاده از مواد شیمیایی Fmoc فاز جامد تهیه شد. پپتید RGD سنتز شده توسط تجزیه LC-MS با تعیین جرم دقیق پپتید تایید شد. شکل ۲ ساختار و طیف جرمی پپتید RGD را نشان می‌دهد. توزیع دقیق جرم (m/z) برای پپتید برابر با $604/28$ بود، در حالی که جرم دقیق این ماده 605 است (شکل ۲).

شناسایی جمعیت فیبروبلاست‌ها: سلول‌های فیبروبلاست جداسازی شده از موش‌های ماده پس از کشت به وسیله آنتی‌بادی‌های anti-CD45-FITC، anti-CD31-FITC و anti-CD80-FITC رنگ‌آمیزی شد و با استفاده از فلوسایتومتری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌های جداسازی شده به میزان $95/6\%$ شاخص CD31، $95/3\%$ شاخص CD80 و $98/3\%$ شاخص CD45 از شاخص‌های ویژه سلول‌های فیبروبلاست غدد لنفاوی را در سطح خود بیان می‌کنند (نمودار ۱).

اثر باکتریوفاز M13، باکتریوفاز M13 با پپتید RGD، ژلاتین بر تکثیر و بقای سلول‌های فیبروبلاست: سلول‌های فیبروبلاست روی سطوح پلیت ۹۶ خانه پوشش داده شده با باکتریوفاز M13، باکتریوفاز M13 با پپتید RGD، ژلاتین و کنترل با تراکم سلول‌های 5×10^3 در هر خانه کشت داده شد. پس از ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از کشت سلول‌ها، فعالیت میتوکندریایی فیبروبلاست‌ها در هر گروه آزمایشی با استفاده از آزمون MTT مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که سلول‌های فیبروبلاست در گروه‌های باکتریوفاز M13، باکتریوفاز M13 با پپتید RGD در ۴۸ و ۷۲ ساعت افزایش تکثیر داشته‌اند ولی گروه ژلاتین با کنترل تفاوت معنی‌دار در هیچ یک از زمان‌ها نشان نداد. البته فعالیت میتوکندریایی فیبروبلاست‌ها در سطح باکتریوفاز M13 با پپتید RGD بیشترین افزایش را نسبت به گروه‌های دیگر نشان داد (نمودار ۲).

استخراج RNA و سنتز cDNA به منظور بررسی بیان ژن‌ها: بیان فاکتورهای مهم در تکثیر، ترمیم و رگ‌زایی فیبروبلاست‌ها که شامل VEGF-A، TGF- β 1، FGF-2، و GAPDH (به عنوان کنترل داخلی) در سطح mRNA در سلول‌های فیبروبلاستی پس از کشت روی سطوح باکتریوفاز M13، باکتریوفاز M13 با پپتید RGD، ژلاتین و کنترل، بعد از گذشت دو روز مورد بررسی قرار گرفت، برای این منظور RNA تام سلول‌های کشت داده شده با استفاده از محلول RiboX استخراج شد. غلظت و خلوص RNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ مورد بررسی قرار گرفت، همچنین برای اطمینان از صحت RNA استخراج شده الکتروفورز نمونه در ژل آگارز انجام شد. به منظور سنتز cDNA مقدار یک میکروگرم از RNA تحت تیمار با آنزیم ترانسکریپتاز معکوس (RT؛ تاکارا) قرار گرفت. برای اطمینان از ساختار cDNA ساخته شده، با نمونه‌های cDNA ساخته شده واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) از طریق پرایمرهای ژن خانه‌دار *GAPDH* انجام شد.

بررسی بیان ژن‌های VEGF-A و TGF- β 1، FGF-2 با استفاده از روش RT-PCR کمی: RT-PCR کمی از طریق دستگاه StepOne Real-Time PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده برای این ژن‌ها و سایبرگرین انجام شد. توالی پرایمرها در جدول ۱ نمایش داده شده است. هر کدام از نمونه‌های مورد آزمایش (باکتریوفاز M13، باکتریوفاز M13 با پپتید RGD، ژلاتین) در سه تکرار زیستی مورد بررسی قرار گرفت. برنامه چرخش دمایی به صورت 95°C به مدت ۱۰ دقیقه، سپس 40 سیکل 95°C به مدت ۳۰ ثانیه، 62°C به مدت ۳۰ ثانیه و 72°C به مدت ۷۲ ثانیه، در نهایت 72°C به مدت ۱۰ دقیقه است.

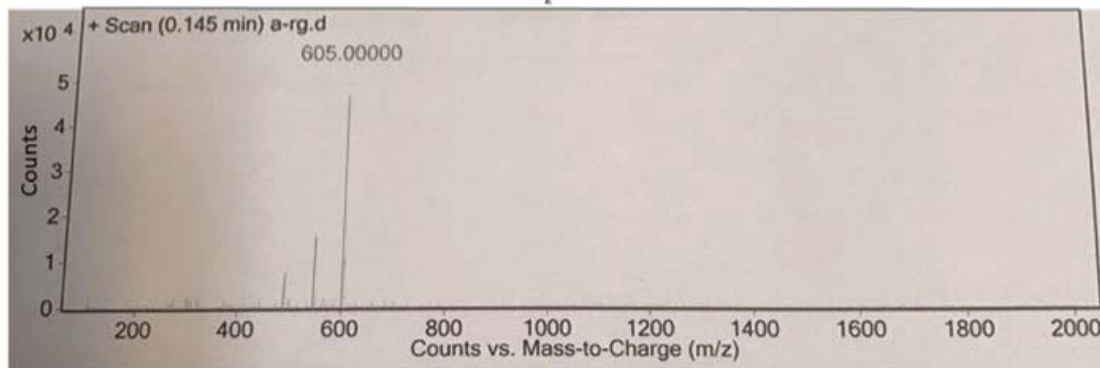
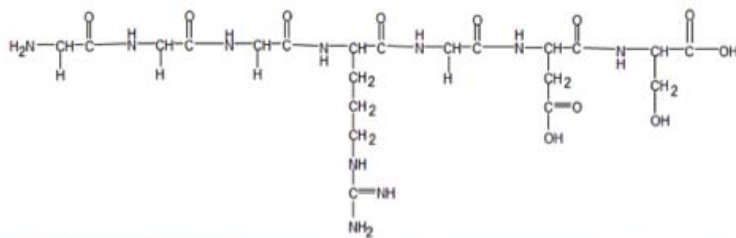
جدول ۱) پرایمرهای طراحی شده

ژن	پرایمر رفت	پرایمر معکوس
VEGF-A	GGAGATCCTTCGAGGAGC ACTT	GGCGATTTAGCAGCAGAT ATAAGAA
TGF- β 1	CGCAACAACGCCATCTAT GAG	CACATGTTGCTCCACACT TGA
FGF-2	ATGGCAGCCGGAGCATC ACCCACG	TCAGCTCTTCGACAGACAT TGGAAAG
GAPDH	CCTGGAGAAACCTGCCAA GTA	GGCATCGAAGGTGGAAGA GT

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل‌های آماری در مطالعه حاضر توسط نرم‌افزار Prism GraphPad 6 انجام شد و داده‌ها به عنوان میانگین \pm خطای استاندارد معنی‌ها ارائه شده است. اختلاف معنی‌داری با روش دلتا-دلتا CT و آنالیز واریانس یک طرفه کمتر از $0/05$ در نظر گرفته شد.

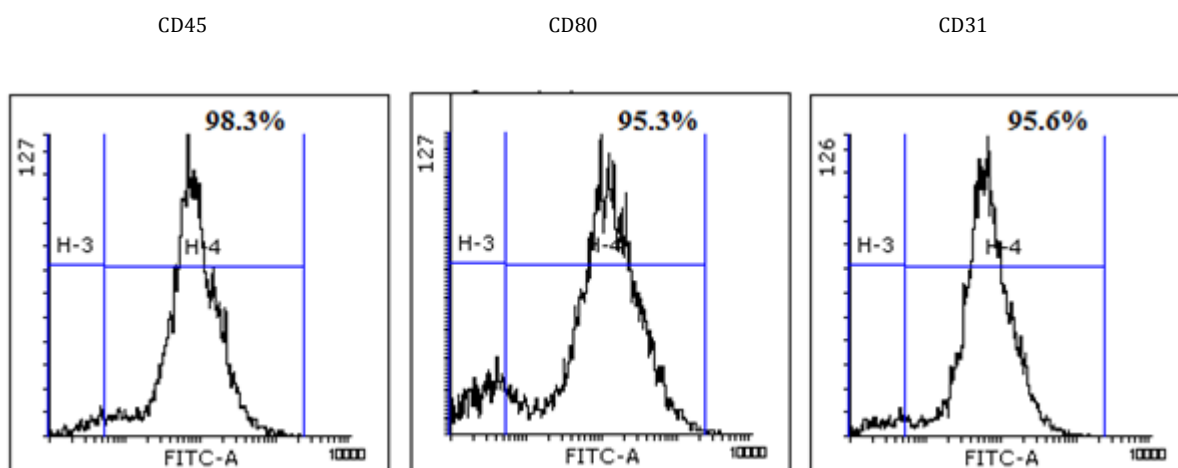
یافته‌ها

خصوصیات و سایز نانوساختارهای فاز M13: نتایج حاصل از تصویربرداری TEM نشان داد که فازهای جدا شده، مورفولوژی معمول فاز وحشی M13 با ابعاد $7/6$ نانومتر را از خود به نمایش گذاشته‌اند (شکل ۱).



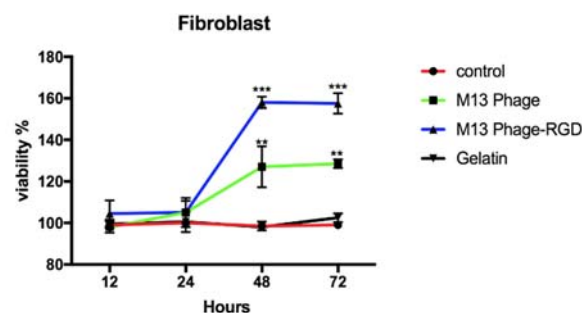
Exact mass = 604/28

شکل ۲) ساختار و توزیع جرم (m/z) پپتید RGD با تجزیه و تحلیل LC-MS



نمودار ۱) تجزیه و تحلیل فنوتیپی سلول‌های جدا شده با استفاده از جریان فلوسایتومتری برای نشانگرهای، CD80، CD45 و CD31

اثر باکتریوفاز M13، باکتریوفاز M13 با پپتید RGD و ژلاتین بر بیان ژن‌های *VEGF-A*، *TGF-β1*، *FGF-2* در سلول‌های فیبروبلاست: برای بررسی اثرات باکتریوفاز M13، باکتریوفاز M13 با پپتید RGD، ژلاتین و سطوح کنترل بر بیان و ترشح عوامل رشد و تکثیر و آنژیوژنیک در سلول‌های فیبروبلاست در ۴۸ ساعت، بیان mRNA ژن‌های *VEGF-A* و *TGF-β1*، *FGF-2*، توسط روش RT-PCR کمی اندازه‌گیری شدند. در نتایج به‌دست آمده مشخص شد که سطح باکتریوفاز M13 با پپتید RGD به‌طور قابل توجهی بیان سه ژن را نسبت کنترل افزایش داده است. گروه باکتریوفاز M13 ژن *TGF-β1* را به‌صورت معنی‌دار نسبت به کنترل افزایش داده



نمودار ۲) تغییرات سطح بقا سلول‌های فیبروبلاست کشت داده‌شده روی سطوح باکتریوفاز M13، باکتریوفاز M13 با پپتید RGD، ژلاتین و گروه کنترل $**p < 0.01$; $***p < 0.001$

سلولی آنها است. در مطالعات گذشته نشان داده‌اند که تکثیر سلول‌های فیبروبلاست، فرآیندی کلیدی در ترمیم و گسترش بافت به شمار می‌آیند [20].

در این پژوهش، افزایش بیان VEGF-A در سطح mRNA در گروه فاز M13 و ترکیب فاز M13 و RGD نشان داده شده است. در مطالعات گذشته نشان داده‌اند که فیبروبلاست‌ها یک منبع غنی از عوامل رشد برای تحریک خود و نیز برای فعال کردن انواع دیگر سلول‌ها هستند. فیبروبلاست‌های فعال دارای عوامل رشد آنژیوژنیک مانند VEGF هستند [21]. در مطالعه حاضر نشان داده شد که فیبروبلاست‌های کشت داده‌شده روی سطح پوشش داده‌شده با فاز M13 و RGD دارای ترشح فاکتور رشد عروق بالاتری نسبت به دیگر گروه‌ها هستند. همچنین بیان قابل توجه ژن‌های FGF-2 و TGF-β1 در سلول‌های فیبروبلاست کشت داده‌شده روی سطح فاز M13 و RGD در این پژوهش نشان داده شده است. همان‌طور که در تحقیقات پیشین بیان شده است، فاکتور رشد فیبروبلاست (FGF) یک عامل رشد است که اثرات بالقوه بر ترمیم و بازسازی بافت‌ها دارد [22]. نقش‌های متعددی برای فاکتور TGF-β1 مشخص شده است، یکی از نقش‌های اصلی آن فراخواندن سلول‌های بنیادی ویژه ترمیم و بازسازی بافت‌ها است، بنابراین در روند ترمیم بافت بسیار مهم به شمار می‌آید [23, 24]. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش، می‌توان گفت که داربست‌های حاوی باکتریوفاز M13 و پپتید RGD می‌توانند با افزایش بیان فاکتورهای FGF-2 و TGF-β1 از سلول‌های فیبروبلاستی موجب افزایش قدرت ترمیم و بازسازی بافت و از طریق افزایش VEGF-A باعث افزایش آنژیوژنز شوند. آنژیوژنز در تشکیل و ترمیم بافت‌ها فاکتور بسیار مهمی به شمار می‌آید. بنابراین استفاده از این نوع داربست‌ها در مهندسی بافت می‌تواند بسیار کارآمد باشد.

نتیجه‌گیری

عملکرد سلول‌های فیبروبلاستی به‌طور قابل توجهی با قرارگرفتن در معرض گروه فاز M13 و RGD به نسبت دیگر گروه‌ها تغییر کرده است. نتایج ما نشان می‌دهد که فاز M13 و RGD موجب افزایش پتانسیل تکثیر، مهاجرت و افزایش پتانسیل آنژیوژنیک سلول‌های فیبروبلاستی می‌شود. به‌طور خلاصه، این مطالعه مواد زیستی جدیدی را برای ساخت داربست‌های مهندسی بافت معرفی می‌کند که می‌توانند در زمینه ترمیم و بازسازی بافت بسیار مفید باشند.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از دانشگاه تربیت مدرس به‌دلیل

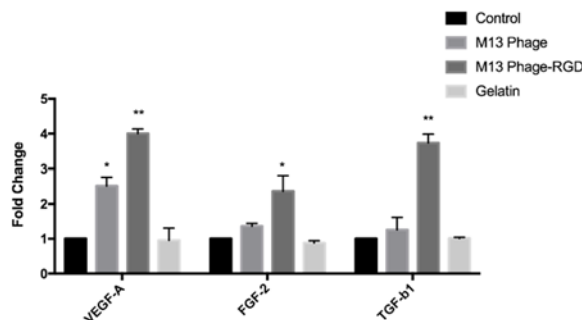
فراهم کردن امکانات انجام تحقیق حاضر قدردانی می‌شود.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: زهره سفری (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۳۰٪)؛ سارا صعودی

است و اما گروه کنترل بیان هیچ‌کدام از ژن‌ها را به نسبت کنترل تغییر نداده است. نتایج در نمودار ۳ نشان داده شده است.



نمودار ۳) تغییرات بیان ژن در سلول‌های فیبروبلاست کشت داده‌شده روی سطوح باکتریوفاز M13، باکتریوفاز M13 با پپتید RGD، ژلاتین و گروه کنترل $p < 0.05$; $p < 0.01$

شکل

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که احتمالاً باکتریوفاز M13 دارای پپتید RGD می‌تواند توانایی ترمیم، تکثیر و آنژیوژنز را در سلول‌های فیبروبلاست افزایش دهد. در مطالعات گذشته نشان داده شده است که پپتید RGD توانایی افزایش فعالیت‌های سلولی از جمله چسبندگی سلولی، تکثیر و تمایز را دارد در نتیجه به‌طور گسترده‌ای برای طراحی مواد زیستی برای مهندسی بافت استفاده شده است [16]. همچنین نشان داده شده است که فاز M13 دارای ویژگی‌های منحصربه‌فرد در مقایسه با سایر انواع نانو ساختارها است، یکی از این ویژگی‌ها داشتن توانایی خودتجمعی است که با توجه به آن می‌توان از آن به‌عنوان یک بلوک ساختمانی برای ساخت نانو ساختارهای ویژه استفاده کرد [17]. در مطالعات گذشته که روی تحریک آنژیوژنز فاز M13 صورت گرفته، نشان داده است که این ماده زیستی توانایی تحریک رگ‌زایی را هم در شرایط "محیط زنده" و هم در شرایط "درون شیشه" را دارد [18]. در دیگر مطالعات نشان داده‌اند که داربست‌های سه‌بعدی و دوبعدی مبتنی بر فاز دارای سازگاری مناسبی برای سلول‌های یوکاریوتی هستند. این داربست‌ها ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی مناسب منطبق بر الگوهای رشد سلول‌ها را نشان می‌دهند [19]. در مطالعه حاضر، مشخص شد که پپتید RGD و باکتریوفاز M13 می‌توانند در القای ترشح فاکتورهای دخیل در فرآیند ترمیم بافت از فیبروبلاست‌ها موثر باشند. علاوه بر این، در این مطالعه مشخص شد که فاکتور M13 در ترکیب با پپتید RGD می‌تواند احتمالاً تکثیر، ترمیم و آنژیوژنز را بیشتر از فاز M13 و ژلاتین افزایش دهد.

نتایج تحقیق حاضر نشان داده است که سطوح فاز M13 و RGD بیش از گروه‌های فاز M13، ژلاتین و سطوح کنترل تکثیر سلولی را تحت تاثیر قرار داده است. با استفاده از این مشاهدات، می‌توان فرض کرد که فاز M13 در ترکیب با موتیف RGD قادر به افزایش قدرت ترمیم سلول‌های فیبروبلاستی از طریق افزایش و القای تکثیر

cultivation. *J Cell Biochem.* 2001;83(1):121-8.

11- Trinkaus-Randall V, Nugent MA. Biological response to a synthetic cornea. *J Control Release.* 1998;53(1-3):205-14.

12- Xu X, Zheng L, Yuan Q, Zhen G, Crane JL, Zhou X, et al. Transforming growth factor- β in stem cells and tissue homeostasis. *Bone Res.* 2018;6:2.

13- Rophael JA, Craft RO, Palmer JA, Hussey AJ, Thomas GPL, Morrison WA, et al. Angiogenic growth factor synergism in a murine tissue engineering model of angiogenesis and adipogenesis. *Am J Pathol.* 2007;171(6):2048-57.

14- Andreopoulos FM, Persaud I. Delivery of basic fibroblast growth factor (bFGF) from photoresponsive hydrogel scaffolds. *Biomaterials.* 2006;27(11):2468-76.

15- Fletcher AL, Malhotra D, Acton SE, Lukacs-Kornek V, Bellemare-Pelletier A, Curry M, et al. Reproducible isolation of lymph node stromal cells reveals site-dependent differences in fibroblastic reticular cells. *Front Immunol.* 2011;2:35.

16- Jeschke B, Meyer J, Jonczyk A, Kessler H, Adamietz P, Meenen NM, et al. RGD-peptides for tissue engineering of articular cartilage. *Biomaterials.* 2002;23(16):3455-63.

17- Merzlyak A, Indrakanti Sh, Lee SW. Genetically engineered nanofiber-like viruses for tissue regenerating materials. *Nano Lett.* 2009;9(2):846-52.

18- Yoo SY, Shrestha KR, Jeong SN, Kang JI, Lee SW. Engineered phage nanofibers induce angiogenesis. *Nanoscale.* 2017;9(43):17109-17.

19- Chung WJ, Merzlyak A, Lee SW. Fabrication of engineered M13 bacteriophages into liquid crystalline films and fibers for directional growth and encapsulation of fibroblasts. *Soft Matter.* 2010;6(18):4454-9.

20- Zielins ER, Atashroo DA, Maan ZN, Duscher D, Walmsley GG, Hu M, et al. Wound healing: An update. *Regen Med.* 2014;9(6):817-30.

21- Ruiter D, Bogenrieder T, Elder D, Herlyn M. Melanoma-stroma interactions: Structural and functional aspects. *Lancet Oncol.* 2002;3(1):35-43.

22- Hankemeier S, Keus M, Zeichen J, Jagodzinski M, Barkhausen T, Bosch U, et al. Modulation of proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells by fibroblast growth factor 2: Potential implications for tissue engineering of tendons and ligaments. *Tissue Eng.* 2005;11(1-2):41-9.

23- Crane JL, Cao X. Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF- β signaling in bone remodeling. *J Clin Invest.* 2014;124(2):466-72.

24- Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* 2009;19(2):156-72.

(نویسنده دوم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۲۰٪): احمد زواران حسینی (نویسنده سوم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۲۰٪): حسن بردانیا (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪): مجید صادقی‌زاده (نویسنده پنجم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)
منابع مالی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

منابع

- 1- Bearinger JP, Terrettaz S, Michel R, Tirelli N, Vogel H, Textor M, et al. Chemisorbed poly (propylene sulphide)-based copolymers resist biomolecular interactions. *Nat Mater.* 2003;2(4):259-64.
- 2- Falconnet D, Csucs G, Grandin HM, Textor M. Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays. *Biomaterials.* 2006;27(16):3044-63.
- 3- Meredith Jr JE, Fazeli B, Schwartz MA. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell.* 1993;4(9):953-61.
- 4- Théry M, Racine V, Pépin A, Piel M, Chen Y, Sibarita JB, et al. The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nat Cell Biol.* 2005;7(10):947-53.
- 5- Sevilla CA, Dalecki D, Hocking DC. Regional fibronectin and collagen fibril co-assembly directs cell proliferation and microtissue morphology. *PloS One.* 2013;8(10):e77316.
- 6- Kim Y, Ko H, Kwon IK, Shin K. Extracellular matrix revisited: Roles in tissue engineering. *Int Neurolog J.* 2016;20(Suppl 1):S23-9.
- 7- Kim HD, Heo J, Hwang Y, Kwak SY, Park OK, Kim H, et al. Extracellular-matrix-based and Arg-Gly-Asp-modified photopolymerizing hydrogels for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 2015;21(3-4):757-66.
- 8- Rossi E, Guerrero J, Aprile P, Tocchio A, Kappos EA, Gerges I, et al. Decoration of RGD-mimetic porous scaffolds with engineered and devitalized extracellular matrix for adipose tissue regeneration. *Acta Biomater.* 2018;73:154-66.
- 9- Jin HE, Lee SW. Engineering of M13 bacteriophage for development of tissue engineering materials. In: Wege Ch, Lomonosoff GP, editors. *Virus-derived nanoparticles for advanced technologies.* New York: Springer; 2018. pp. 487-502.
- 10- Martin I, Suetterlin R, Baschong W, Heberer M, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Enhanced cartilage tissue engineering by sequential exposure of chondrocytes to FGF-2 during 2D expansion and BMP-2 during 3D