



Preparation and Characterization of Smart Poly (N-Isopropylacrylamide) Nanoparticles Containing Vascular Endothelial Growth Factor for Induction of Angiogenesis in Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Adibfar A.¹ PhD,
Amoabediny Gh.* PhD,
Baghaban Eslaminejad M.R.² PhD,
Bagheri F.³ PhD,
Zandieh Doulabi B.⁴ MD,
Mohamadi J.¹ PhD

How to cite this article

Adibfar A, Amoabediny Gh, Baghaban Eslaminejad M, Bagheri F, Zandieh Doulabi B, Mohamadi J. Preparation and Characterization of Smart Poly (N-Isopropylacrylamide) Nanoparticles Containing Vascular Endothelial Growth Factor for Induction of Angiogenesis in Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells. Pathobiology Research. 2018;21(2):65-72.

*Chemical Engineering Department, Chemical Engineering Faculty, University of Tehran, Tehran, Iran

¹Life Science Engineering Department, New Sciences & Technologies Faculty, University of Tehran, Tehran, Iran

²Stem Cells & Developmental Biology Department, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology & Technology, Tehran, Iran

³Biotechnology Department, Chemical Engineering Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

⁴Oral Cell Biology Department, Academic Centre for Dentistry Amsterdam (ACTA), University of Amsterdam & VU University, Amsterdam, The Netherlands

Correspondence

Address: Center for Modern Technologies in Engineering Sciences, NO. 4, Orouji Alley, 16 Azar Street, Tehran, Iran. Postal Code: 11155-4563
Phone: +98 (21) 66408808
Fax: +98 (21) 66406217
amoabediny@ut.ac.ir

Article History

Received: December 11, 2017
Accepted: February 26, 2018
ePublished: July 5, 2018

ABSTRACT

Aims Growth factor (GFs) delivery with the certain concentration and release kinetic is one of the main challenges in tissue engineering. The aim of this study was the preparation and characterization of smart poly (N-isopropylacrylamide) nanoparticles containing vascular endothelial growth factor for induction of angiogenesis in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells.

Materials & Methods In this experimental study, two different formulations of temperature-sensitive Poly (N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) nanoparticles (NPs) were synthesized by free radical polymerization technique. Nanoprecipitation and diffusion methods were used to load the vascular endothelial growth factor (VEGF) in PNIPAM NPs. The effects of released VEGF on the differentiation of human bone marrow stem cells (hBMSCs) into endothelial cells in angiogenic, osteogenic, and 50% angiogenic-osteogenic culture medium were investigated, using flow cytometry and light microscope. Statistical analysis was performed, using the GraphPad Prism 6 software.

Findings The nanoprecipitation process caused polymer degradation due to using the organic *N, N-Dimethylacetamide* solvent. The cumulative VEGF released after 72hours for 70%. A total of 10ng/ml VEGF released from PNIPAM nanoparticles, in 2D culture with cell density of 3×10^4 hBMSCs, after 7 days, leading to the endothelial differentiation, capillary-like tube formation, and expression of 20% vWF as angiogenic marker.

Conclusion The PNIPAM NPs have the potential to load and release the angiogenic GFs for induction of angiogenesis in hBMSCs and in osteogenic medium.

Keywords Temperature-sensitive PNIPAM Nanoparticles; Nano-precipitation; Growth Factor Delivery; Angiogenesis; Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells

CITATION LINKS

[1] Strategies for controlled delivery of growth factors and cells ... [2] Toward delivery of multiple growth factors in tissue ... [3] A novel fabrication method of temperature-responsive poly (acrylamide) composite hydrogel ... [4] Stimuli-responsive polymer ... [5] Stimuli-responsive polymers: Biomedical applications and challenges for ... [6] Poly(N-isopropylacrylamide-co-allylamine) (PNIPAM-co-ALA) nanospheres for the thermally triggered release ... [7] Dual drug encapsulated thermo-sensitive fibrinogen-graft-poly (N-isopropyl acrylamide) nanogels for ... [8] Dual pH- and temperature-responsive microparticles for protein delivery ... [9] Effect of double growth factor release on cartilage tissue ... [10] Injectable pH- and temperature-responsive poly ... [11] Kinetics of BSA release from poly ... [12] Design of Eudragit RL 100 nanoparticles ... [13] Polymer nanoparticles: Preparation techniques ... [14] Angiogenic factors in bone local [15] Endothelial cells guided by immobilized gradients of ... [16] Integrated approach to designing growth factor ... [17] Supportive angiogenic and osteogenic differentiation ... [18] Mesenchymal stem/stromal cells as a pharmacological and therapeutic ... [19] Localized delivery of growth factors for angiogenesis ... [20] Lead contami eggs and tissues from a small farm flock [21] Prevascularization of porous biodegradable ... [22] Engineering the ... [23] Osteogenic and angiogenic potentials of monocultured and ... [24] Endothelial cell tube formation assay ... [25] Synthesis and characterization of thermosensitive ... [26] Novel N-isopropylacrylamide based polymer ... [27] Nanoencapsulation I. Methods for preparation ... [28] Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal ... [29] Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified ...

ساخت و مشخصه‌یابی نانوذرات هوشمند پلی‌ان‌ایزوپروپیل‌اکریل‌آمید حاوی فاکتور رشد اندوتلیال عروقی برای القای رگ‌زایی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسانی

افسانه ادیب‌فر PhD

گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون، دانشگاه تهران، تهران، ایران

قاسم عموآبدینی PhD*

گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

محمدرضا باغبان‌اسلامی نژاد PhD

گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشگاه زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی رویان، تهران، ایران

فاطمه باقری PhD

گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

بهروز زندیه دولابی PhD

گروه زیست‌شناسی سلولی، مرکز علمی دندانبی‌شناسی آمستردام، دانشگاه آمستردام و دانشگاه وی‌یو، آمستردام، هلند

جواد محمدی PhD

گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون، دانشگاه تهران، ایران

چکیده

اهداف: یکی از چالش‌های اصلی در مهندسی بافت، رهایش فاکتورهای رشد با سرعت و غلظت مشخص به سلول‌ها است. هدف این پژوهش، ساخت و مشخصه‌یابی نانوذرات هوشمند پلی‌ان‌ایزوپروپیل‌اکریل‌آمید حاوی فاکتور رشد اندوتلیال عروقی برای القای رگ‌زایی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسانی بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی، نانوذرات پلیمر هوشمند PNIPAM، به روش پلیمریزاسیون رادیکالی، با دو فرمولاسیون (سامانه) مختلف استفاده شدند. برای بارگذاری فاکتور رشد اندوتلیالی عروقی، دو روش نانوسوی و نفوذ برای فرمولاسیون‌ها انجام شد. اثر رهایش فاکتور رشد اندوتلیالی عروقی بر تمایز به اندوتلیال سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسانی در محیط رگ‌زایی، استخوانی و محیطی شامل ۵۰٪ از هر دو محیط رگ‌زایی و استخوانی مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از بسته نرم‌افزار 6 GraphPad Prism انجام شد.

یافته‌ها: روش نانوسوی به دلیل استفاده از حلال آلی ان-ان-دی‌متیل‌استامید، موجب تخریب ساختار پلیمر شد. پس از ۲۲ ساعت حدوداً ۷۰٪ فاکتور رشد از پلیمر آزاد شد. رهایش ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد اندوتلیالی عروقی از سامانه نانوذرات هوشمند PNIPAM، در محیط دوبعدی با حضور سلول‌های بنیادی مزانشیمی با دانسیته سلولی 3×10^4 و محیط کشت تمایز استخوانی، پس از ۷ روز، منجر به تمایز به اندوتلیال، تشکیل حلقه‌های شبه‌مویرگی و بیان ۲۰ درصدی مارکر اندوتلیالی vWF شد.

نتیجه‌گیری: نانوذرات تهیه‌شده، قابلیت بارگذاری و رهایش فاکتور رشد برای القای پدیده رگ‌زایی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در محیط کشت تمایز استخوانی را دارند.

کلیدواژه‌ها: نانوذرات هوشمند حساس به دما، روش نانوسوی، رهایش فاکتور رشد، رگ‌زایی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسانی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۰۷

*نویسنده مسئول: amoabediny@ut.ac.ir

مقدمه

رهایش فاکتورهای رشد یکی از بخش‌های اصلی مهندسی بافت است. استراتژی‌های مختلفی برای رسانش فاکتورهای رشد زیست‌فعال مطالعه شده^[1] و روش‌های مختلفی برای رهایش کنترل‌شده فضایی-زمانی این زیست‌مولکول‌ها ارائه شده است^[2].

یکی از رویکردهای جدید ارائه‌شده برای دارورسانی هدفمند، استفاده از مواد حساس به محیط است^[3]. این مواد با تغییر یکی از متغیرهای فیزیکی، شیمیایی یا بیوشیمیایی محیط، دچار تغییر خاص می‌شوند^[4,5].

یکی از پرکاربردترین مواد حساس به محیط، پلیمرهای حساس به دما هستند. ترکیب پلی-ان-ایزوپروپیل‌اکریل‌آمید (PNIPAM) یکی از مهم‌ترین پلیمرهای حساس به دما است که در محدوده دمای فیزیولوژیک بدن، رفتار LSCT (پایین‌ترین دمای بحرانی حلالیت) از خود نشان می‌دهد^[6]. پایین‌تر از پایین‌ترین دمای بحرانی حلالیت، پلیمر آب‌دوست و بالاتر از این دما پلیمر آب‌گریز است. در نتیجه این پدیده مکانیزمی برای رهایش دارو محسوب می‌شود.

به‌تازگی این ترکیب توجه محققان زیادی را برای بررسی رهایش داروهای مختلف، به خود جلب کرده است^[7,8]. مطالعات اندکی بر رهایش فاکتورهای رشد با PNIPAM انجام شده است^[9,10]. با این وجود، بررسی سینتیک رهایش دقیق فاکتورهای رشد و همچنین اثر نوع روش سنتز و بارگذاری دارو و نیز میزان پیش‌ماده‌ها بر رهایش فاکتورهای رشد توسط این ترکیب، هنوز به‌درستی مطالعه و گزارش نشده است^[11].

نانوسوی یکی از روش‌های بارگذاری دارو در نانوذرات است. با توجه به آب‌دوست یا آب‌گریز بودن دارو، پلیمر در حلال آلی و دارو در فاز آبی یا آلی حل می‌شود و در مرحله بعد فاز آلی قطره‌قطره به محلول آبی اضافه می‌شود. نسبت حلال آلی به حلال آبی، غلظت پلیمر و دارو، سرعت هم‌زدن، دما و بسیاری پارامترهای دیگر بر خواص محصول نهایی موثر هستند^[12,13]. در مورد پلیمر هوشمند PNIPAM در صورت استفاده از عامل کراس‌لینکر در فرمولاسیون پلیمر، بر حسب نوع و غلظت کراس‌لینکر مورد استفاده، حلالیت پلیمر در حلال‌های آلی متفاوت است.

از طرفی رگ‌زایی مهم‌ترین چالش مهندسی بافت استخوان است. تهیه سامانه انتقال فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) یکی از رویکردهای ایجاد شبکه رگی به‌منظور بهبود داربست‌های مهندسی بافت استخوان معرفی شده است^[14-16]. یکی از عناصر اصلی القای سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تمایز آنها به سلول‌های اندوتلیال، VEGF است که در پدیده پیام‌رسانی رگ‌زایی نیز موثر است^[17,18]. میان سلول‌های اندوتلیال و استخوان، پیام‌رسانی متقابل وجود دارد. سلول‌های اندوتلیال، فاکتور رشد BMP2 (پروتئین ریخت‌زای استخوانی ۲)، BMP4 و BMP7 ترشح می‌کنند که این فاکتورها خود موجب القای تمایز به استخوان می‌شوند^[19].

پس از پیوند داربست مهندسی بافت استخوان، علاوه بر شبکه عروقی که طی ترمیم زخم تشکیل می‌شود، در داربست پیوندشده، به‌میزان کمی نئوسکولاریزاسیون نیز اتفاق می‌افتد^[20,21]. ولی به‌علت سرعت کم، داربست از ادامه حیات باز می‌ماند. مشکل دیگر سرعت کم آناستوموز است. آناستوموز بین رگ‌های داربست و میزبان، یک فرآیند آنی نیست و ممکن است چندین روز طول بکشد. طی این مدت امکان ایجاد ایسکمی در داربست وجود دارد. لذا به‌منظور زنده نگه‌داشتن سلول‌های داربست پیوندزده‌شده، تنها چند روز فرصت باقی است. یکی از استراتژی‌های حل این معضل، القای تمایز به اندوتلیال و تسریع نئوسکولاریزاسیون تا ۴ یا نهایتاً ۷ روز پس از پیوند داربست است. بنابراین انتظار می‌رود سامانه رهایش VEGF، به‌گونه‌ای طراحی شود که سینتیک رهایش آن حداقل تا ۴ روز ادامه پیدا کند و موجب القای تمایز به اندوتلیال شود^[22].

فاکتور رشد شبه انسولین انسانی نوترکیب)، hFGF (فاکتور رشد فیبروبلاستی انسانی)، VEGF، هیدروکورتیزون و FBS است. بارگذاری فاکتور VEGF به دو روش نانورسوبی و نفوذ انجام گرفت. به‌منظور بارگذاری VEGF درون نانوذرات پلیمری PNIPAM توسط روش نانورسوبی، ابتدا حلالیت دو سامانه تهیه‌شده در ۷ حلال آلی مختلف بررسی شد (جدول ۲).

جدول ۲) حلالیت سامانه ۱ و ۲ در حلال‌های آلی مختلف

سامانه ۲	سامانه ۱	حلال آلی
محلول	نامحلول	متانول
نامحلول	نامحلول	دی‌متیل‌فورمامید
نامحلول	نامحلول	دی‌متیل‌سولفوکساید
نیمه‌محلول	نیمه‌محلول	ایزوپروپانول
محلول	محلول	ان-ان-دی‌متیل‌استامید
نیمه‌محلول	نامحلول	اتانل
نامحلول	محلول	هگزان

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده و حلالیت مشابه دو سامانه مذکور، در حلال ان-ان-دی‌متیل‌استامید، فرآیند نانورسوبی با استفاده از این حلال، برای هر دو سامانه انجام گرفت. برای این منظور، ابتدا میزان ۰/۰۱ گرم پلیمر در ۲ میلی‌لیتر ان-ان-دی‌متیل‌استامید حل شد. این محلول پلیمری سپس توسط سرنگ، تحت شرایط هم‌زدن شدید، قطره‌قطره به ۸ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر اضافه شد. به این ترتیب نسبت حلال آلی به آبی ۱ به ۴ در نظر گرفته شد. پس از آن نمونه‌های تهیه‌شده، برای حذف مواد سمی، دیالیز و در نهایت برای آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی توسط دستگاه خشک‌کن انجمادی خشک شدند.

به‌منظور بارگذاری VEGF درون نانوذرات پلیمری PNIPAM توسط روش نفوذ، ابتدا ۰/۰۲ گرم نانوذرات پلیمری ۵۰۰ میکرولیتر محلول PBS حاوی VEGF (۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) در یک میکروتیوب به حجم ۲ میلی‌لیتر با یک‌دیگر ترکیب شدند تا ژل یک‌دستی تهیه شود. میکروتیوب سپس به مدت ۳ روز در یخچال با دمای ۴°C قرار داده شد تا ذرات پلیمری، فاکتور رشد را جذب نمایند. پس از طی این مدت، میکروتیوب در دمای ۴°C با دور ۱۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شده، محلول رویی آن دور ریخته شد و ژل باقی‌مانده توسط دستگاه خشک‌کن انجمادی خشک شد.

مورفولوژی نانوذرات توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی -KYKY-EM3200 (مدال تکنولوژی؛ ایالات متحده) بررسی شد و اندازه نانوذرات توسط نرم‌افزار Microstructure Measurement مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین متوسط توزیع اندازه ذرات توسط روش تفرق نور پویا (DLS) با دستگاه Nano ZS (red badge) ZEN 3600 (Malvern؛ انگلستان) مطالعه شد. مورفولوژی سلول‌ها نیز توسط میکروسکوپ فلورسنت معکوس (Olympus؛ ژاپن) بررسی شد.

برای مطالعه مارکر vWF از آنتی‌بادی اولیه Mouse IgG (pure، Goat anti-mouse abcam ab68545) و آنتی‌بادی ثانویه Alexa 568 (A-11004) (ترموفیشر؛ ایالات متحده) استفاده شد.

به‌منظور بررسی رهایش VEGF، از نانوذرات PNIPAM با سامانه ۱ تهیه‌شده به روش بارگذاری نفوذی، پس از ۳ روز ماندگاری در ۴°C، میکروتیوب نانوذرات PNIPAM حاوی VEGF (نانوذرات VEGF-PNIPAM)، به انکوباتور ۳۷°C انتقال یافت و در زمان‌های مختلف، فرآیند نمونه‌گیری انجام شد. غلظت نمونه‌های

در این پژوهش با توجه به پتانسیل مناسب نانوذرات هوشمند PNIPAM در رهایش دارو، دو فرمولاسیون مختلف از این ترکیب تهیه شد و برای اولین بار روش بارگذاری VEGF درون نانوذرات PNIPAM و اثر بیولوژیک VEGF رهایش‌یافته در محیط دوبعدی بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسانی مورد بررسی قرار گرفت. هدف این پژوهش، ساخت و مشخصه‌یابی نانوذرات هوشمند پلی-ان-ایزوپروپیل‌آکریل‌آمید حاوی فاکتور رشد اندوتلیال عروقی برای القای رگ‌زایی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسانی بود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش تجربی، نانوذرات پلیمر هوشمند PNIPAM، به روش پلیمریزاسیون رادیکالی، با دو فرمولاسیون (سامانه) مختلف استفاده شدند^[11] (جدول ۱).

جدول ۱) مقادیر مختلف پارامترهای سنتزی در سامانه‌های تهیه‌شده

پارامترهای سنتزی	سامانه ۱	سامانه ۲
حلال (میلی‌لیتر) / مونومر (گرم)	۰/۱	۰/۰۱۴
مونومر / بیس‌آکریل‌آمید	۰/۰۲۲	۰/۱
مونومر / سدیم‌دودسیل‌سولفات	۰/۰۰۶۷	۰/۰۰۶۷
زمان (ساعت) / دما (درجه سانتی‌گراد)	۶۵/۱۶	۶۵/۱۶

ابتدا در یک ظرف دو دهانه به‌میزان ۱۰ میلی‌لیتر آب دی‌یونیزه ریخته و روی هیتر استیرر قرار داده شد. پس از اینکه دمای محلول به ۶۵°C رسید، مقدار یک‌گرم (محلول ۱۰٪ وزنی به حجمی) مونومر PNIPAM، ۰/۲۲ گرم (محلول درصد وزنی به حجمی) بیس‌آکریل‌آمید و ۰/۰۰۶۷ گرم سدیم‌دودسیل‌سولفات در زیر هود توزین و به ظرف واکنش اضافه شد. سپس به داخل محلول حاصل، گاز نیتروژن دمیده شد. پس از ۱۰ دقیقه، ۰/۳ میلی‌لیتر از محلول ۵٪ تترامتیل‌اتیلن‌دی‌آمین و نیز ۰/۳ میلی‌لیتر از محلول ۱۰٪ آمونیوم‌پرسولفات به ظرف واکنش اضافه شد. سپس درهای ظرف به‌خوبی بسته و برای تکمیل فرآیند پلیمریزاسیون درون آن ۶۵°C قرار داده شد. پس از تکمیل واکنش پلیمریزاسیون، پلیمر حاصله برای حذف مواد باقی‌مانده، چندین بار با اتانل و آب‌مقطر شسته و تا ۱۰ روز در آب‌مقطر دیالیز شد. پلیمر حاصله به مدت ۲ روز در دمای ۲۰°C- منجمد و در نهایت توسط دستگاه فریز درایر (خشک‌کن انجمادی) خشک شد.

مونومر ان-ایزوپروپیل‌آکریل‌آمید، بیس‌آکریل‌آمید، آمونیوم‌پرسولفات، فاکتور رشد VEGF و نیز کیت الیزای VEGF (شرکت سیگما؛ ایالات متحده) و سدیم‌دودسیل‌سولفات و تترامتیل‌اتیلن‌دی‌آمین (TEMED؛ شرکت مرک؛ آلمان) مورد استفاده قرار گرفتند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسانی (بانک سلولی پژوهشگاه رویان؛ ایران)، محیط کشت رگ‌زایی (EGM2؛ شرکت لونزا؛ سوئیس) و محیط‌های کشت DMEM، aMEM (محیط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی) و نیز سرم جنین گاوی (FBS) مورد نیاز سلول‌های مزانشیمی (شرکت گیبکو؛ ایالات متحده) نیز تهیه شدند.

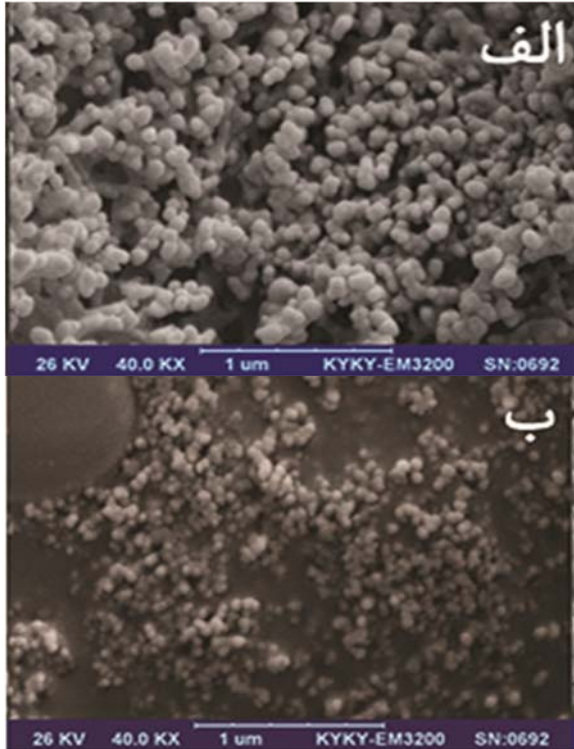
محیط کشت تمایز استخوانی شامل محیط DMEM حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اسکوربیک‌اسید، ۱۰^{-۸} دگزامتازون و ۱۰ میلی‌مولار گلیسرول‌فسفات است. محیط کشت رگ‌زایی شامل ترکیب‌های هپارین، اسکوربیک‌اسید، Ga-1000 (جنتامایسین-آمفوتریسین)، hEGF (فاکتور رشد اپیدرمی انسانی)، R3-IGF

جمع‌آوری شده توسط کیت الایزای VEGF بررسی شد. بارگذاری دارو و بازده انکسپوله‌شدن در نانوذرات هوشمند PNIPAM توسط روابط ۱ و ۲ محاسبه شدند:

بارگذاری دارو = (مقدار داروی موجود در نانوذرات) / (وزن نانوذرات) (رابطه ۱)
 (رابطه ۲) = بازده انکسپوله‌شدن دارو
 (مقدار داروی اولیه) / (مقدار داروی موجود در نانوذرات)

یافته‌ها

در تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی، دو سامانه مختلف پلیمر حساس به دمای PNIPAM منجر به تولید ذرات کروی شکل با ابعاد ۱۰۰-۱۵۰ نانومتر شد (شکل ۱).



شکل ۱) تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوذرات PNIPAM سنتز شده با الف) سامانه ۱ و ب) سامانه ۲

بررسی و مقایسه تصاویر مختلف میکروسکوپ الکترونی روبشی سامانه ۱ و سامانه ۲ پس از انجام فرآیند نانوسوی با تصاویر نمونه‌ها قبل از انجام فرآیند نانوسوی، نشان داد که این فرآیند نه تنها تاثیری بر کوچک‌تر شدن اندازه ذرات نداشته، بلکه موجب آگلومره شدن بیشتر ذرات، از بین رفتن توزیع اندازه ذرات مناسب آنها و تخریب ساختار نیز شده است. هر چند ذرات بسیار ریز هم در این تصاویر مشاهده شد اما با توجه به از بین رفتن ساختار کروی شکل نانوذرات، برای ادامه بررسی‌ها از روش نفوذ برای بارگذاری VEGF در نانوذرات PNIPAM استفاده شد (شکل ۲).

انتخاب سامانه بهینه، براساس اندازه ذرات نانومتری، میزان بیس آکریل آمید و حالت فیزیکی ژل پلیمری بود. سامانه ۲، به دلیل میزان بسیار کم نسبت مونومر به حلال در فرآیند سنتز (جدول ۱)، علی‌رغم داشتن مقدار کراس‌لینکر بیس آکریل آمید بیشتر، حالت محلول رقیق شیرینی داشت که اگر چه اندازه ذرات نانومتری داشت، اما به منظور بارگذاری دارو و بررسی‌های بیشتر، محدودیت ایجاد می‌کرد. در نتیجه به دلیل میزان کمتر بیس آکریل آمید در سامانه ۱ و نیز شکل فیزیکی مناسب و ابعاد نانومتری ذرات، این سامانه برای ادامه مطالعات انتخاب شد.

به منظور بررسی اثر بیولوژیک VEGF رهائش‌یافته از نانوذرات VEGF-PNIPAM (سامانه ۱)، از سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان استفاده شد. قبل از شروع آزمایش‌ها، ابتدا سلول‌ها به دو قسمت تقسیم شدند. ۲۰٪ سلول‌ها به سمت تمایز رگی و ۸۰٪ آنها به سمت تمایز به استخوان پریم شدند. برای تمایز رگی به مدت نیم‌ساعت سلول‌ها تحت تماس با محلول حاوی ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر VEGF در محیط کشت αMEM در انکوباتور ۳۷°C قرار گرفتند. به منظور پریم استخوانی، سلول‌های تحت تماس با محیط کشت تمایز به استخوان در انکوباتور ۳۷°C قرار داده شدند. پس از طی این زمان، سلول‌ها با ۱۲۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتیفریژ شدند و محلول رویی دور ریخته شد [23]. از این سلول‌ها به نسبت ۲۰:۸۰ برای انجام آزمون‌های بیولوژیک به صورت زیر استفاده شد:

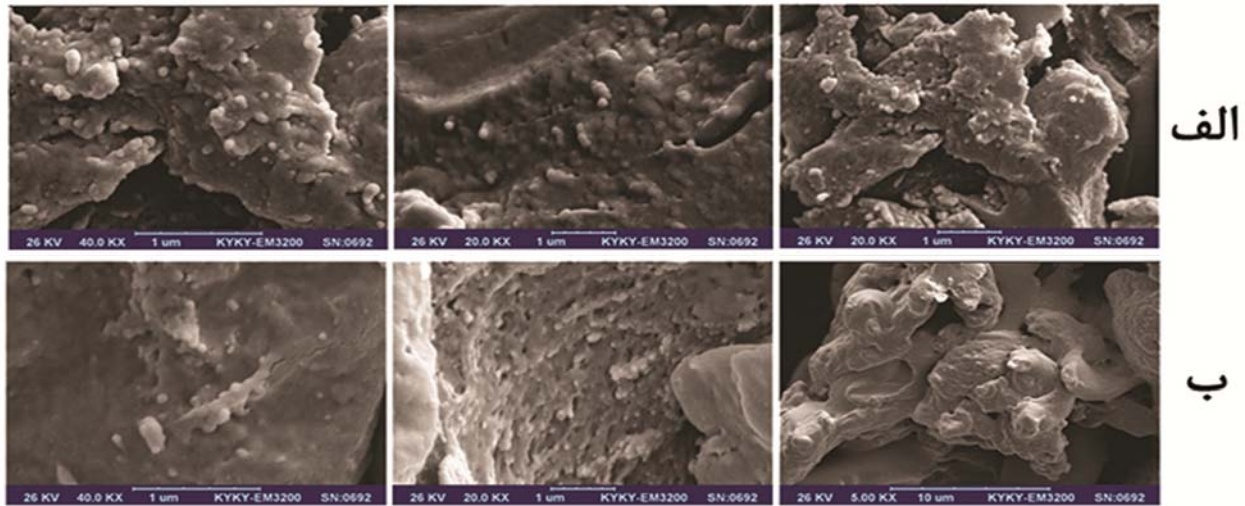
ابتدا سلول‌های پریم شده به مدت ۱۲ ساعت در پلیت‌های ۱۲ خانه با محیط کشت αMEM درون انکوباتور قرار داده شدند تا سلول‌ها به کف فلاسک بچسبند. پس از آن، محیط کشت پلیت‌ها در گروه‌های مختلف تعویض شدند (جدول ۳).

جدول ۳) گروه‌های آزمایش اثر VEGF رهائش‌یافته از نانوذرات PNIPAM سامانه ۱

گروه	توضیح	سامانه VEGF-PNIPAM	محیط کشت
۱	گروه کنترل اندوتلیال	-	محیط تمایز رگی
۲	گروه آزمون	✓	محیط تمایز استخوانی
۳	گروه آزمون	✓	محیط تمایز رگی + ۵۰٪ محیط تمایز استخوانی

گروه ۳ در این جدول شامل ۵۰٪ محیط کشت تمایز استخوانی و ۵۰٪ محیط کشت رگی است. مقدار سامانه هوشمند VEGF-PNIPAM برای گروه‌های آزمون ۲۵ میکرولیتر با غلظت ۰/۰۰۲/گرم بر میلی‌لیتر و میزان تقریبی ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر VEGF بود. سلول‌ها پس از ۷ روز از کف پلیت جدا شده و برای بررسی نوع و میزان تمایز آنها، توسط آنالیز فلوسایتومتری مورد مطالعه گرفتند. طی این مدت هر ۲ الی ۳ روز یک‌بار محیط کشت تعویض شد. همچنین مورفولوژی سلول‌ها پس از ۷ و ۱۴ روز توسط میکروسکوپ فلورسنت معکوس مورد بررسی قرار گرفت.

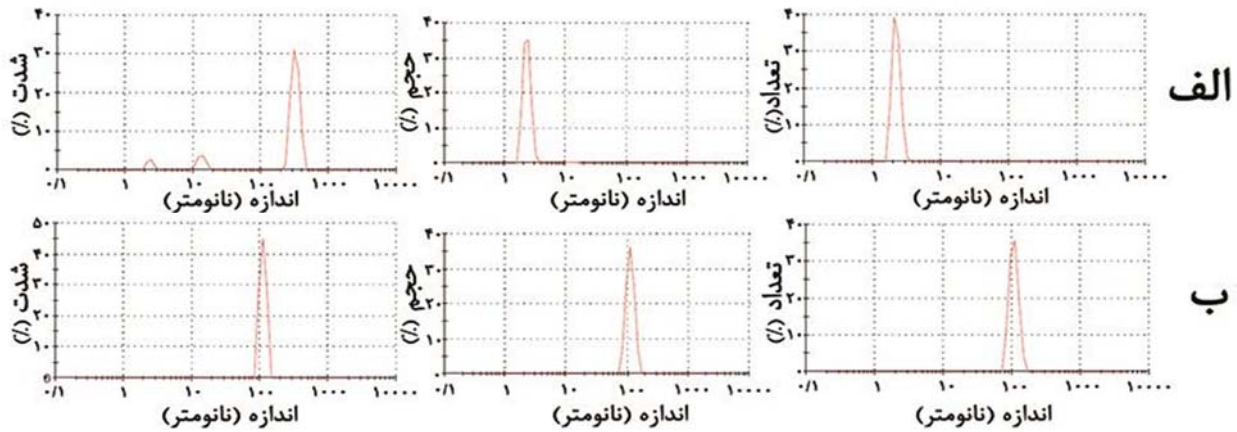
آزمون فلوسایتومتری توسط دستگاه *FACS Aria II flow cytometer* (BD Biosciences؛ ایالات متحده) و مطابق پروتکل آزمایشگاه فلوسایتومتری پژوهشگاه رویان انجام شد و داده‌های حاصل، توسط نرم‌افزار *Asennuspaketti*



شکل ۲) تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوذرات PNIPAM سنتز شده با الف) سامانه ۱ و ب) سامانه ۲، پس از فرآیند نانورسوب‌دهی

۴۰°C اندازه ذرات پلیمری در حدود ۳۲۲ نانومتر است که با افزایش دما تا ۴۷°C اندازه ذرات کاهش یافته و از دمای ۳۷°C به بالا در حدود ۱۰۰ نانومتر ثابت می‌ماند (نمودار ۱).

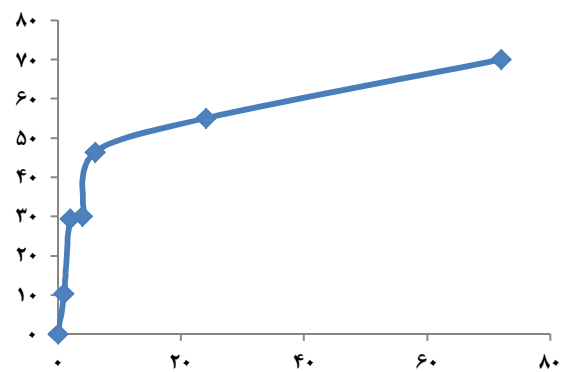
در بررسی توزیع متوسط اندازه ذرات پلیمر PNIPAM سامانه ۱ بر حسب شدت، حجم و تعداد ذرات مورد بررسی، در قبل و بعد از دمای پایین‌ترین دمای بحرانی حلالیت، نشان داده شد که در دمای



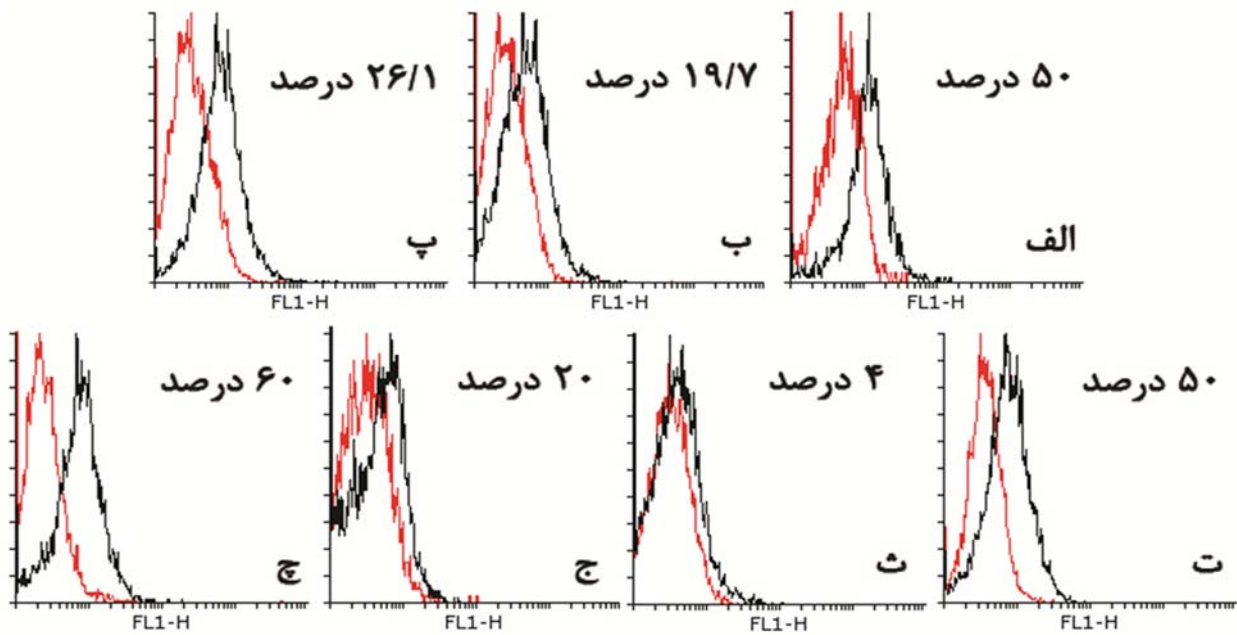
نمودار ۱) نمودار توزیع اندازه ذرات بر حسب شدت، حجم و تعداد ذرات بررسی شده سامانه ۱، در دمای الف) ۴۰°C و ب) ۳۷°C با استفاده از روش تفرق نور پویا

در بررسی میزان تمایز به سلول‌های اندوتلیال با حضور یا عدم حضور نانوذرات VEGF-PNIPAM (سامانه ۱)، میزان بیان vWF در محیط رگ‌زایی کامل (گروه ۱)، محیط استخوانی (گروه ۲) و ترکیب این دو محیط (گروه ۳) به ترتیب ۵۰٪، ۱۹/۷٪ و ۲۶/۱٪ محاسبه شد. مطابق انتظار محیط کشت رگ‌زایی در تمایز به سلول اندوتلیال موثر بود. به همین دلیل میزان بیان vWF در محیط ترکیبی ۵۰٪ رگ‌زایی- ۵۰٪ استخوانی بیشتر از حالتی بود که سلول‌های مزانشیمی درون محیط استخوانی کشت داده شده باشند. همچنین بررسی بیان مارکر کلاژن نوع یک، نشان داد که تا روز ۱۴، حدوداً ۵۰٪ سلول‌ها در محیط کشت تمایز استخوانی، این مارکر را بیان می‌کنند. مطابق انتظار در محیط کشت رگ‌زایی، میزان ۴٪ سلول‌ها کلاژن نوع یک بیان کردند که این میزان قابل صرف نظر کردن بود. در محیط کشت رگ‌زایی با حضور سامانه نانوذرات VEGF-PNIPAM حدوداً ۲۰٪ سلول‌ها، کلاژن نوع یک بیان نمودند. این در حالی است که حضور نانوذرات به‌تنهایی و بدون VEGF، در محیط کشت تمایز استخوانی، منجر به بیان ۶۰ درصدی کلاژن نوع یک شد که می‌توان نتیجه گرفت، حضور نانوذرات، مانع تمایز نمی‌شود. بیان کمتر کلاژن در نمونه دارای سامانه VEGF-

درصد رهایش تجمعی برای نانو سامانه هوشمند VEGF-PNIPAM پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۵۵٪ و ۷۰٪ محاسبه شد. همچنین میزان بارگذاری VEGF درون نانوذرات PNIPAM، ۰/۵ میکروگرم بر میلی گرم محاسبه شد (نمودار ۲).



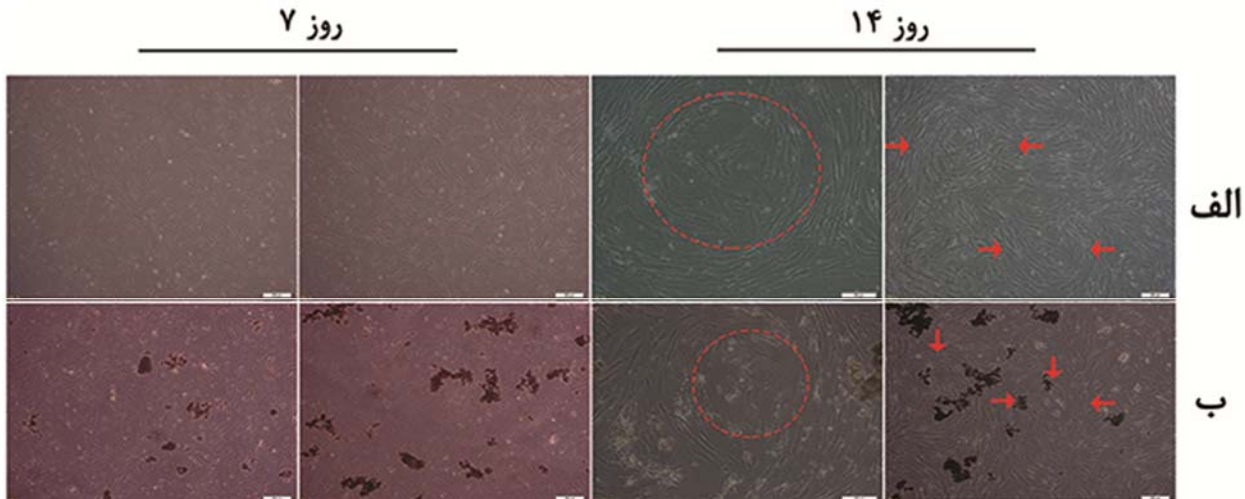
نمودار ۲) سینتیک رهایش VEGF از نانوذرات هوشمند VEGF-PNIPAM (با استفاده از سامانه ۱) پس از ۷۲ ساعت



نمودار ۳) بیان مارکر vWF در سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی کشت‌داده شده در محیط الف) رگ‌زایی کامل، ب) محیط تمایز استخوانی با حضور نانوذرات PNIPAM-VEGF، پ) ۵۰٪ محیط رگ‌زایی به همراه ۵۰٪ محیط استخوانی با حضور نانوذرات VEGF-PNIPAM پس از ۷ روز کشت در انکوباتور و نیز بیان مارکر Col 1 در محیط، ت) تمایز استخوانی، ث) رگ‌زایی کامل، ج) محیط تمایز استخوانی با حضور نانوذرات VEGF-PNIPAM، چ) محیط تمایز استخوانی با حضور نانوذرات PNIPAM بدون VEGF پس از ۱۴ روز کشت در انکوباتور

استخوانی است، تنها دلیلی که می‌تواند موجب تمایز به اندوتلیال معرفی شود همان VEGF رهایش‌یافته از نانوذرات PNIPAM است که این نتیجه با آزمون فلوسایتومتری نیز تایید شد.

پس از ۱۴ روز، ساختارهای شبه‌مویرگی به خوبی در مورد سلول‌های کشت‌داده شده گروه ۱ و ۲ مشاهده شد (شکل ۳). از آنجا که محیط کشت سلول‌های در تماس با نانوذرات VEGF-PNIPAM، محیط



شکل ۳) تصاویر میکروسکوپ فلورسنت معکوس سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت‌داده شده در الف) گروه ۱ (محیط کشت رگ‌زایی) و ب) گروه ۲ (محیط کشت استخوانی) با حضور نانوذرات PNIPAM حاوی VEGF پس از ۷ و ۱۴ روز

می‌دهند^[24]. تشکیل این ساختارهای شبه‌حلقه، به نوع سلول‌های بنیادی ابتدایی، گونه سلولی (حیوانی، انسانی و غیره) و شرایط محیط کشت (پلیت معمولی یا استفاده از ماتریکل بستگی دارد)^[17].

یکی از دلایل دستیابی به اندازه نانومتری نانوذرات PNIPAM، استفاده از ترکیب سدیم‌دودسیل‌سولفات در فرآیند سنتز است. حضور سدیم‌دودسیل‌سولفات به دلیل داشتن بار منفی در مرحله

بحث

در این پژوهش، ساخت و مشخصه‌یابی نانوذرات هوشمند پلی-ان-ایزوپروپیل‌آکریل‌آمید حاوی فاکتور رشد اندوتلیال عروقی برای القای رگ‌زایی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسانی مورد بررسی قرار گرفت. در محیط دوپعدی، سلول‌های اندوتلیال در صورت دراختیارداشتن فضای کافی، ساختارهای مویرگی‌شکل و شبیه حلقه تشکیل

ترکیب (p(NIPAAm-co-PAA)، همراه با فاکتور رشد bFGF، بدون بررسی اثر بیولوژیکی گزارش شده است [10] که به دلیل حضور PAA و حساس بودن به pH، قابل مقایسه با تحقیق حاضر نیست. هدف از بارگذاری VEGF درون نانوذرات PNIPAM و بررسی رهایش آنها در محیط استخوانی، بررسی امکان‌پذیری استفاده از این نانوذرات در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی به سلول‌های اندوتلیال به‌همراه سلول‌های استخوانی در محیط تمایز استخوانی بود. به همین دلیل سلول‌ها قبل از کشت، به نسبت ۲۰٪ پرایم رگی/۸۰٪ پرایم استخوانی با یکدیگر ترکیب شدند. تمایز به اندوتلیال از منشا سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان از روز ۷ تا ۱۲ و تمایز به استخوان از منشا این سلول‌ها از روز ۱۴ تا ۲۸ روز گزارش شده است [28]. طبق مقالات موجود KDR مارکر اولیه و vWF و CD31 مارکرها هستند که در انتهای دوره تمایز به اندوتلیال بیان می‌شوند [29]. با توجه به اینکه آزمون فلوسایتومتری در روز ۷ انجام شد، انتظار می‌رفت با گذشت زمان میزان بیان بیشتری در گروه کنترل رگ‌زایی و نیز گروه سلول بنیادی مزانشیمی (در محیط کشت استخوانی) در حضور نانوذرات VEGF-PNIPAM مشاهده شود.

از محدودیت‌های این مطالعه هزینه زیاد محیط کشت رگ‌زایی بود. پیشنهاد می‌شود در صورتی که هدف، دستیابی به رگ‌زایی در ابعاد وسیع مانند بافت استخوانی باشد، علاوه بر پرایم سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های اندوتلیال، از سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال نیز استفاده شود.

نتیجه‌گیری

سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط استخوانی، در حضور نانوذرات VEGF-PNIPAM حدود ۲۰٪ بیان می‌شوند. رهایش‌یافته از نانوذرات PNIPAM توانایی القای سلول‌های بنیادی مزانشیمی به اندوتلیال را دارد. در نتیجه فرآیند بارگذاری و رهایش از نانوذرات PNIPAM موجب تخریب ساختار پروتئینی آن نشده و نانوذرات PNIPAM ضمن حفظ زیست‌فعالی فاکتور رشد و عدم ایجاد سمیت در محدوده استفاده‌شده، قابلیت استفاده در کاربردهای مهندسی بافت و دارورسانی را دارا هستند.

تشکر و قدردانی: نویسندگان این مقاله از همکاری آزمایشگاه‌های مختلف مرکز پژوهشی فناوری‌های نوین در مهندسی علوم زیستی دانشگاه تهران و نیز پژوهشگاه رویان، کمال تشکر و قدردانی خود را اعلام می‌دارند.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان بیان نشده است.

تعارض منافع: هیچ تضاد منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: افسانه ادیب‌فر (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۵۰٪)؛ قاسم عموعابدینی (نویسنده دوم)، روش‌شناس (۱۰٪)؛ محمدرضا باغبان اسلامی‌نژاد (نویسنده سوم)، روش‌شناس (۱۰٪)؛ فاطمه باقری (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ بهروز زندیه دولابی (نویسنده پنجم)، روش‌شناس (۱۰٪)؛ جواد محمدی (نویسنده ششم)، تحلیلگر آماری (۱۰٪).

منابع مالی: این تحقیق با حمایت مالی مرکز پژوهشی فناوری‌های نوین در مهندسی علوم زیستی دانشگاه تهران و نیز پژوهشگاه رویان انجام گرفته است.

ابتدایی سنتز، منجر به دافعه میان ذرات تشکیل‌شده می‌شود و به این ترتیب ذرات کوچک‌تر بیشتری تولید می‌شوند. از افزودن سدیم‌دودوسیل‌سولفات، توزیع ذرات همگن و یکنواخت‌تری نسبت به فرمولاسیون‌های بدون این ترکیب به دست می‌آید [25]. مطالعات بیشتر نشان داد میزان بیس‌آکریل‌آمید کمتر نیز موجب دست‌یابی به اندازه ذرات کمتر می‌شود.

بررسی‌های انجام‌شده بر خواص رئولوژیک و ترمودینامیک نانوذرات پلیمری PNIPAM نشان داد که دمای گذار پایین‌ترین دمای بحرانی حلالیت برای سامانه ۱ حدود ۳۲°C است [11]. طبق این نتیجه انتظار داریم اندازه ذرات در قبل از این دما، بیشتر از دماهای بالاتر از ۳۲°C باشد. بررسی دقیق‌تر توزیع اندازه ذرات در دمای قبل و بعد از دمای گذار PNIPAM، این نتیجه را تایید کرد. این کاهش اندازه به دلیل ایجاد برهم‌کنش میان زنجیره‌های پلیمر است. در قبل از دمای پایین‌ترین دمای بحرانی حلالیت برهم‌کنش‌های بین زنجیره پلیمری و مولکول‌های آب (پیوندهای هیدروژنی)، برهم‌کنش غالب است. در حالی که پس از این دما برهم‌کنش میان زنجیره‌های پلیمر-پلیمر مکانیزم غالب است [26].

فرآیند نانورسوبی یکی از روش‌های مرسوم کاهش اندازه ذرات و نیز بارگذاری دارو درون هیدروژل‌های پلیمری است. به‌منظور انجام فرآیند نانورسوبی نیاز به یک حلال آلی است که پلیمر به‌طور کامل در آن حل شود. سپس محلول آلی به‌همراه پلیمر حل‌شده، قطره‌قطره به فاز آبی که حاوی دارو نیز است، تحت هم‌زدن شدید، اضافه می‌شود. از بررسی مقالات برای انجام فرآیند نانورسوبی مشخص می‌شود که پارامترهای بسیاری در اندازه ذرات نهایی موثر هستند [27].

در این پژوهش، پس از انجام آزمایش‌های گوناگون ترتیب نسبت حلال آلی به آبی ۱ به ۴، به‌عنوان نسبت بهینه مشخص شد. شایان ذکر است نسبت‌های ۱/۹، ۱/۲، ۱/۳ و ۱ نیز گزارش شده‌اند. به‌طور تجربی به نظر می‌رسد هر چه این میزان کمتر باشد و شدت هم‌زدن بیشتر باشد، ذرات کوچک‌تری به دست می‌آید. در این تحقیق، به دلیل کراس‌لینک‌شدن پلیمر PNIPAM و عدم انحلال آن در بسیاری از حلال‌ها، مجبور به استفاده از حلال آلی ان-ان-دی‌متیل‌استامید بودیم. پس از انجام فرآیند نانورسوبی برای دو نوع سامانه تهیه‌شده پلیمر PNIPAM، ذرات پلیمری شکل خود را از دست داده و از حالت ذرات کروی خارج شدند. لذا برای بارگذاری دارو، از روش نفوذ استفاده شد.

میزان بیس‌آکریل‌آمید حین سنتز بر سینتیک رهایش موثر است. از آنجا که بیس‌آکریل‌آمید نقش کراس‌لینک‌کننده زنجیره‌های پلیمری را به عهده دارد، افزایش میزان آن موجب رهایش کندتر دارو می‌شود. از آنجا که VEGF نقش رگ‌زایی در فرآیندهای پیام‌رسانی سلولی را به عهده دارد، رهایش آهسته و طولانی‌مدت آن مناسب کاربردهای درمان زخم یا ایجاد پدیده رگ‌زایی است. اثر بیولوژیک رهایش فاکتورهای رشد IGF، FGF2 و bFGF از پلیمر هوشمند PNIPAM و برخی مشتقات پلیمری PNIPAM به‌طور بسیار محدود بررسی شده است [8، 9]. اما سینتیک رهایش دقیق فاکتورهای رشد و همچنین اثر نوع سنتز و بارگذاری دارو و نیز میزان پیش‌ماده‌ها بر رهایش فاکتورهای رشد توسط این ترکیب، هنوز به‌درستی مطالعه و گزارش نشده است [11]. هیچ تحقیقی مبنی بر رهایش VEGF به‌تنهایی با فرمولاسیون PNIPAM خالص وجود ندارد. تنها رهایش فاکتور VEGF توسط

- factor delivery systems. *FASEB J.* 2007;21(14):3896-903.
- 17- Böhrensen F, Schliephake H. Supportive angiogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells and endothelial cells in monolayer and co-cultures. *Int J Oral Sci.* 2016;8(4):223-30.
- 18- Bronckaers A, Hilkens P, Martens W, Gervois P, Ratajczak J, Struys T, et al. Mesenchymal stem/stromal cells as a pharmacological and therapeutic approach to accelerate angiogenesis. *Pharmacol Ther.* 2014;143(2):181-96.
- 19- Bai Y, Yin G, Huang Z, Liao X, Chen X, Yao Y, et al. Localized delivery of growth factors for angiogenesis and bone formation in tissue engineering. *Int Immunopharmacol.* 2013;16(2):214-23.
- 20- Probst A, Spiegel HU. Cellular mechanisms of bone repair. *J Invest Surg.* 1997;10(3):77-86.
- 21- Mikos AG, Sarakinos G, Lyman MD, Ingber DE, Vacanti JP, Langer R. Prevascularization of porous biodegradable polymers. *Biotechnol Bioeng.* 1993;42(6):716-23.
- 22- Lokmic Z, Mitchell GM. Engineering the microcirculation. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008;14(1):87-103.
- 23- Kang Y, Kim S, Fahrenholtz M, Khademhosseini A, Yang Y. Osteogenic and angiogenic potentials of monocultured and co-cultured human-bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and human-umbilical-vein endothelial cells on three-dimensional porous beta-tricalcium phosphate scaffold. *Acta Biomater.* 2013;9(1):4906-15.
- 24- DeCicco-Skinner KL, Henry GH, Cataisson C, Tabib T, Gwilliam JC, Watson NJ, et al. Endothelial cell tube formation assay for the in vitro study of angiogenesis. *J Vis Exp.* 2014;(91):e51312.
- 25- Bucatariu S, Fundueanu G, Prisacaru I, Balan M, Stoica I, Harabagiu V, et al. Synthesis and characterization of thermosensitive poly (N-isopropylacrylamide-co-hydroxyethylacrylamide) microgels as potential carriers for drug delivery. *J Polym Res.* 2014;21:580.
- 26- Alf ME, Alan Hatton T, Gleason KK. Novel N-isopropylacrylamide based polymer architecture for faster LCST transition kinetics. *Polymer.* 2011;52(20):4429-34.
- 27- Reis CP, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine.* 2006;2(1):8-21.
- 28- Chen MY, Lie PC, Li ZL, Wei X. Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol.* 2009;37(5):629-40.
- 29- Birmingham E, Niebur GL, McHugh PE, Shaw G, Barry FP, McNamara LM. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. *Eur Cell Mater.* 2012;23:13-27.
- 1- Vo TN, Kasper FK, Mikos AG. Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(12):1292-309.
- 2- Chen FM, Zhang M, Wu ZF. Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering. *Biomaterials.* 2010;31(24):6279-308.
- 3- Li P, Xu K, Tan Y, Lu C, Li Y, Wang P. A novel fabrication method of temperature-responsive poly (acrylamide) composite hydrogel with high mechanical strength. *Polymer.* 2013;54(21):5830-8.
- 4- Kuckling D, Krahl ADF, Krahl F, Arndt KF. Stimuli-responsive polymer systems. *Polym Sci, Compr Ref.* 2012;8:377-413.
5. Hoffman AS. Stimuli-responsive polymers: Biomedical applications and challenges for clinical translation. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(1):10-6.
- 6- Hathaway H, Alves DR, Bean J, Esteban PP, Ouadi K, Sutton JM, et al. Poly(N-isopropylacrylamide-co-allylamine) (PNIPAM-co-ALA) nanospheres for the thermally triggered release of Bacteriophage K. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015;96:437-41.
- 7- Rejinold NS, Baby T, Chennazhi KP, Jayakumar R. Dual drug encapsulated thermo-sensitive fibrinogen-graft-poly (N-isopropyl acrylamide) nanogels for breast cancer therapy. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2014;114:209-17.
- 8- Joshi RV, Nelson CE, Poole KM, Skala MC, Duvall CL. Dual pH- and temperature-responsive microparticles for protein delivery to ischemic tissues. *Acta Biomater.* 2013;9(5):6526-34.
- 9- Ertan AB, Yılgor P, Bayyurt B, Çalıkoğlu AC, Kaspar Ç, Kök FN, et al. Effect of double growth factor release on cartilage tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med.* 2013;7(2):149-60.
- 10- Garbern JC, Hoffman AS, Stayton PS. Injectable pH- and temperature-responsive poly (N-isopropylacrylamide-co-propylacrylic acid) copolymers for delivery of angiogenic growth factors. *Biomacromolecules.* 2010;11(7):1833-9.
- 11- Naddaf AA, Tsibranska I, Bart HJ. Kinetics of BSA release from poly (N- isopropylacrylamide) hydrogels, *Chem Eng Process, Process Intensif.* 2010;49(6):581-8.
- 12- Das S, Suresh PK, Desmukh R. Design of Eudragit RL 100 nanoparticles by nanoprecipitation method for ocular drug delivery. *Nanomedicine.* 2010;6(2):318-23.
- 13- Rao JP, Geckeler KE. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Prog Polym Sci.* 2011;36(7):887-913.
- 14- Chim SM, Tickner J, Chow ST, Kuek V, Guo B, Zhang G, et al. Angiogenic factors in bone local environment. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013;24(3):297-310.
- 15- Odedra D, Chiu LL, Shoichet M, Radisic M. Endothelial cells guided by immobilized gradients of vascular endothelial growth factor on porous collagen scaffolds. *Acta Biomater.* 2011;7(8):3027-35.
- 16- Chen RR, Silva EA, Yuen WW, Brock AA, Fischbach C, Lin AS, et al. Integrated approach to designing growth