

# تأثیر نانوذرات هیدروکسی آپاتیت بر تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به سلول های استخوانی در داربست های پلی کاپرولاکتون / کراتین / هیدروکسی آپاتیت

مینا کلانتری<sup>۱</sup>، محبوبه محمودی<sup>۲\*</sup>، مرجان میرحاج<sup>۱</sup>

۱- کارشناسی ارشد، گروه مهندسی پزشکی، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران

۲- دانشیار، گروه مهندسی پزشکی، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران

\*مسئول مکاتبات: m.mahmoodi@iauyazd.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۱/۲۵، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۵/۰۹)

**چکیده:** بدن انسان به طور خود به خود قادر به ترمیم نقایص استخوانی کوچک است، درحالی که معایب استخوانی بزرگ بدون مداخلات پزشکی قادر به ترمیم نمی باشد. تلاش های صورت گرفته در جهت رفع این نقایص، منجر به پایه گذاری علم مهندسی بافت استخوان شده است. در این تحقیق، داربست های پلی کاپرولاکتون / کراتین و پلی کاپرولاکتون / کراتین / هیدروکسی آپاتیت با روش الکتروریسی ساخته شدند و مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس جهت بررسی تمایز سلول های بنیادی، سلول های مزانشیمی مشتق از بافت چربی بر روی سطح داربست ها کشت داده شد و روند تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به سلول های استخوانی طی ۷ و ۱۴ روز توسط آزمون های آلکالین فسفاتاز و آلیزارین رد مورد بررسی قرار گرفت. افزایش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز، حضور مواد معدنی تشکیل شده و گسترده شدن رنگ قرمز-نارنجی بر روی سطح داربست های حاوی نانوذرات هیدروکسی آپاتیت که نشان از حضور  $Ca^{+2}$  بود، تمایز سلول های مزانشیمی به سلول های استخوانی را ثابت کرد. بنابراین نتایج حاصل از این تحقیق، داربست پلی کاپرولاکتون / کراتین / هیدروکسی آپاتیت را بستری مناسب جهت رشد و تمایز سلول های بنیادی در مهندسی بافت استخوان معرفی می کند.

## واژه های کلیدی:

الکتروریسی، سلول های بنیادی مزانشیمی، کراتین، هیدروکسی آپاتیت، تمایز سلولی، نانو الیاف، پلی کاپرولاکتون.

## ۱- مقدمه

شمار می رود. مهندسی بافت استخوان به دنبال بازگرداندن و حفظ عملکرد بافت استخوان انسان با استفاده از ترکیبی از اصول علوم زیستی، علم مواد و اصول مهندسی است. جهت رشد سلول ها در خارج بدن در مهندسی بافت، سلول ها بر روی داربست های بیومواد قرار داده می شوند که این داربست به عنوان تقلیدی از ماتریکس خارج سلولی، نقش مهمی را در چسبندگی، رشد و تکثیر سلول ها در خارج یا داخل بدن ایفا می کنند [۲-۳]. سلول

مهندسی بافت استخوان به عنوان یک پاسخ به مشکل های مرتبط با جایگزین کردن بافت هایی که در اثر بیماری یا تروما از دست رفته اند، توسعه یافته است. در حال حاضر، پس زده شدن بافت پیوندی، التهاب مزمن و کمبود اهداکننده اعضا از جمله مشکلات جراحان ارتوپدی و بازسازی عیوب اسکلتی می باشد [۱]. در بین بافت های بدن، استخوان پتانسیل بالایی برای بازسازی مجدد دارد، بنابراین، یک نمونه مناسب برای مهندسی بافت به

سلول ها می شود. همچنین ماتریس سه بعدی مطلوب ایجاد می کند که اجازه نفوذ، چسبندگی و تکثیر سلولی را می دهد [۹]. پلیمر طبیعی کراتین (Kt) به علت زیست سازگاری عالی، زیست تخریب پذیری، آبدوستی و فراوانی آن در طبیعت در مهندسی پزشکی مورد توجه قرار گرفته است [۱۰]. پلی کاپرولاکتون (PCL) پلیمری مصنوعی با خواص الاستومری، زیست سازگار و دارای خاصیت آبگریزی می باشد. این پلیمر با توجه به ویسکوزیته مناسبی که دارد قابلیت تولید الیاف را فراهم می سازد. با افزودن کراتین به PCL چسبندگی سلولی و آبدوستی پلیمر افزایش می یابد [۱۱]. هیدروکسی آپاتیت (HA) به دلیل ترکیب شیمیایی و ساختار مشابه با استخوان طبیعی می تواند به عنوان جایگزین استخوان استفاده شود. نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت دارای ساختار سه بعدی نانو مشابه با ساختار معدنی موجود در بافت خارج سلولی استخوان می باشد، بنابراین می تواند بسیار موثر در کاربردهای مهندسی بافت استخوان باشد. این مواد، محیطی مناسب جهت رشد و تکثیر سلول ها می باشند که سبب تحریک رسوب مواد معدنی استخوان در روی سطح داربست می گردند. همچنین باعث تحریک تمایز سلول های مزانشیمی به سلول های استخوانی می شوند [۱۲].

الکتروریسی به معنی تولید الیاف با استفاده از نیروی الکترواستاتیکی است که منجر به تولید الیاف در رنج نانو از محلول های کامپوزیتی متشکل از پلیمر- نانو ذرات می گردد [۱۳]. نانوالیاف دارای ویژگی های منحصر به فردی مانند نسبت سطح به حجم بسیار زیاد و تخلخل فراوان با اندازه منافذ بسیار ریز برای افزایش رشد و چسبندگی سلول ها می باشند. بنابراین، نانوالیاف می توانند نقش مهمی در کاربردهای پزشکی مانند مهندسی بافت، رهایش دارو و زخم پوش ها داشته باشند [۱۴].

لی و همکاران، خواص فیزیکی و زیست فعالی داربست کامپوزیتی چند لایه پلی کاپرولاکتون/ سیلیس را برای ترمیم بافت استخوان مورد ارزیابی قرار دادند و افزایش درصد زنده مانده سلول ها، فعالیت آلکالین فسفاتاز (ALP) و رسوب کلسیم بر روی سطح داربست ها که نشانه تمایز سلول های بنیادی به سلول های

های بنیادی جمعیت منحصر به فردی از سلول هایی می باشند که توانایی خود تجدیدی<sup>۱</sup>، بیان نشانگرهای سلول های تمایز نیافته اولیه و تمایز به انواع مختلفی از سلول های تخصص یافته را دارا می باشند. سلول های بنیادی به چهار دسته همه توان<sup>۲</sup>، پرتوان<sup>۳</sup>، چند توان<sup>۴</sup> و تک توان<sup>۵</sup> تقسیم بندی می شوند.

سلول های بنیادی مزانشیمی (MSC)<sup>۶</sup>، سلول های بنیادی پرتوان، مولد و غیرخونی هستند که از بافت بالغ استخراج شده و توانایی تمایز به سلول هایی که منشا مزانشیمی دارند، مانند گلبول قرمز، استئوبلاست، آدیپوسیت، فیبروبلاست و سلول های استرومال را دارا می باشند. MSC را می توان از بافت های خاصی از جمله بافت ماهیچه ای، چربی، خون، استخوان اسفنجی، پرده ضریع، پروستوم، غشاء سینوویال، ماهیچه اسکلتی و دندان استخراج کرد. این سلول ها قابلیت خود نوزایی خود را برای مدت طولانی حفظ می کنند و می توانند به استخوان، غضروف و سلول های چربی تمایز یابند [۴]. پدیده تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به سلول های استخوانی، فرآیند پیچیده ای است که عوامل محیطی و شیمیایی مختلفی در آن دخیل هستند. به طور معمول به منظور تمایز سلول های MSC به سلول های استخوانی، ترکیبات مختلفی مانند دگزامتازون<sup>۷</sup>، اسید اسکوربیک و بتاگلیسرول فسفات به محیط کشت اضافه می گردد. دگزامتازون در فرآیند القای استخوان سازی در محیط In Vitro نقش کلیدی ایفا می کند. از طرف دیگر اسید اسکوربیک موجب افزایش ترشح کلاژن توسط سلول های مزانشیمی در حال تکثیر می شود. بتاگلیسرول فسفات نیز به عنوان منبع غنی از فسفات آلی در معدنی سازی ماتریکس خارج سلولی موثر می باشد [۵]. همچنین، حضور استئوپونین و آلکالین فسفاتاز تایید کننده تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست یا سلول های استخوانی می باشند [۶]. انتخاب مواد زیستی برای ساخت داربست های مهندسی بافت، پارامتر بسیار مهمی برای تسریع در بازسازی بافت می باشد [۷-۸]. کراتین مشتق شده از پشم و موی انسان قابلیت اتصال سلول از طریق لوسین-اسپارتیک اسید والین (LDV)<sup>۸</sup> و گلو تامیک اسید اسپارتیک اسید-سیرین (EDS) دارد که سبب افزایش چسبندگی

پی آن رشد سلول های استخوانی افزایش یافت [۱۹]. اما مطالعات کمی در مورد بررسی تمایز سلولی بر روی سطح داربست پلی-کاپرولاکتون/کراتین/هیدروکسی آپاتیت (PCL/Kr/HA) انجام گرفته است. بنابراین در این مطالعه داربست PCL/Kr/HA به روش الکترورسی ساخته شد و تاثیر ذرات HA بر روی تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به سلول های استخوانی در داربست ساخته شده با روش های آنزیم آلکالین فسفاتاز و رنگ آمیزی آلزارین رد مورد بررسی قرار گرفت.

## ۲- مواد و روش انجام تحقیق

در این تحقیق کراتین با درجه خلوص ۹۸٪ و اندازه ذرات ۳۰ نانومتر، پلی کاپرولاکتون (MV= 70-90KD) و هیدروکسی آپاتیت با اندازه ذرات ۲۰۰ نانومتر از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شد. جهت بررسی تمایز سلولی سرم گاوی (FBS) و محیط کشت DMEM-F12 از شرکت Gibco تهیه شد. همچنین، گلو تار آلد هید و L-آسکوربیک اسید ۲-فسفات<sup>۱</sup>، دگزامتازون و بتا گلیسرول فسفات از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شد.

## ۲-۱- ساخت داربست نانو الیاف

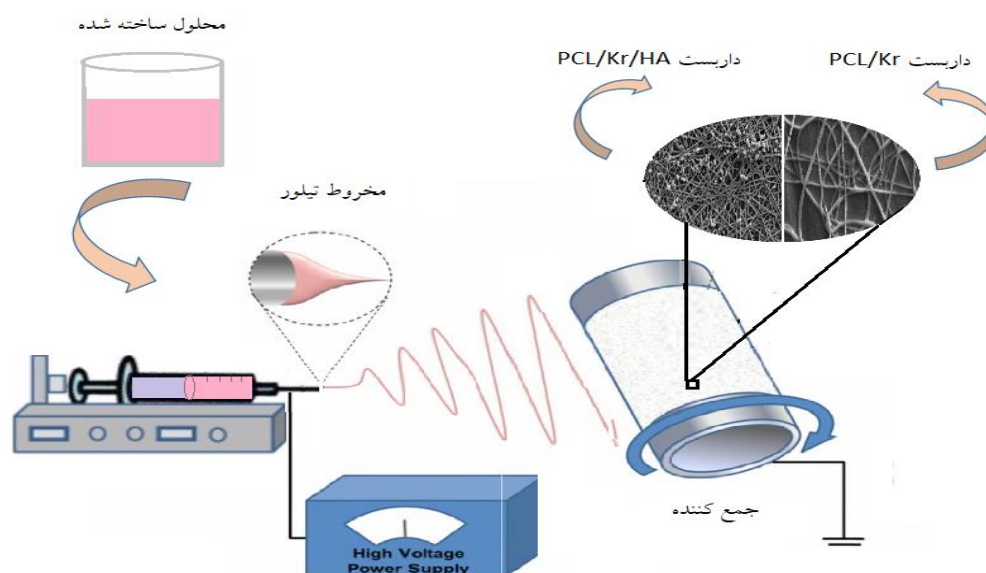
برای تهیه محلول پلی کاپرولاکتون/کراتین [۲۰]، ابتدا دو محلول کراتین و PCL آماده گردید. کراتین در حلال اسید استیک و اسید فرمیک به نسبت (۳:۱) و PCL در حلال اسید استیک و اسید فرمیک به نسبت (۳:۱) به مدت ۲۴h توسط همزن مغناطیسی به طور جداگانه محلول شدند. سپس، دو محلول آماده شده با نسبت (۳:۲) توسط همزن مغناطیسی برای مدت زمان ۲۰ دقیقه مخلوط شدند. برای آماده سازی محلول پلی کاپرولاکتون/کراتین/هیدروکسی آپاتیت، HA در حلال اسید استیک و اسید فرمیک با نسبت (۳:۱) توسط همزن مغناطیسی به مدت ۱h حل گردید و در نهایت برای مدت زمان ۱۵ دقیقه با دستگاه التراسونیک پروبی (Top Sonics-ایران) هموژنایز گردید. داربست های نانوالیاف مهندسی بافت با دستگاه الکترورسی (MEDIFUSION MS-2200-Syringe Pump) ساخته شدند. محلول پلی کاپرولاکتون/

استخوانی بود را مشاهده کردند [۱۵]. در تحقیقی دیگر رشد و تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی بر روی سطح داربست نانو الیاف سلولز/ژلاتین حاوی هیدروکسی آپاتیت جهت کاربرد در مهندسی بافت استخوان مورد بررسی قرار گرفت. با اصلاح سطح نانو الیاف سلولزی با هیدروکسی آپاتیت، سطح دارای بار منفی می گردد و جوانه زنی هیدروکسی آپاتیت رخ می دهد. نتایج این تحقیق نشان داد، رشد و تکثیر و تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به سلول های استخوانی بر روی سطح داربست اصلاح شده با HA نسبت به داربست بدون HA افزایش می یابد. سطح دارای بار منفی، یون های کلسیم را به سمت خود جذب می نماید و کلسیم روی سطح، استئوکلکسین دارای بار منفی را به سمت خود جذب می کند. بنابراین، رسوب بیشتر یون کلسیم بر روی سطح داربست معرف تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به سلول های استئوبلاست می باشد [۱۶]. رن و همکاران جهت بازسازی استخوان، داربست کامپوزیتی نانوالیاف ژلاتین/ پلی کاپرولاکتون را به روش الکترورسی ساختند و قابلیت استخوان سازی بر روی سطح داربست ساخته شده را با استفاده از آزمون رنگ آمیزی آلزارین رد مورد ارزیابی قرار دادند. رسوب کلسیم که نشانه تمایز سلولی بود با جذب رنگ قرمز بر روی سطح داربست نانوالیاف ژلاتین/ پلی کاپرولاکتون اثبات گردید. همچنین، حضور ژلاتین در داربست نقش مهمی در چسبندگی اینتگرین ها ایفا کرد و باعث چسبندگی سلول ها بر روی سطح داربست گردید [۱۷].

در مطالعه ای دیگر، داربست نانو الیاف الکترورسی شده بر پایه پلی کاپرولاکتون تقویت شده با نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت و کربنات کلسیم جهت کاربرد در مهندسی بافت استخوان مورد بررسی قرار گرفت. با افزودن نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت و کربنات کلسیم به نانو الیاف، استحکام کششی، رشد و تکثیر سلول های استخوانی بر روی سطح داربست افزایش یافت [۱۸]. طی تحقیقاتی مشابهی که توسط ادوارد و همکاران انجام شد، داربست دو جزئی پلی کاپرولاکتون/کراتین ساخته شد. با توجه به نتایج به دست آمده با افزایش نسبت کراتین به پلی-کاپرولاکتون، خواص مکانیکی کاهش و آبدوستی نمونه ها و در

۲۰kV و فاصله کلکتور تا نوک سوزن ۱۰ cm الکترورسی دو نمونه انجام گرفت (شکل ۱).

کراتین و پلی کاپرولاکتون/ کراتین/ هیدروکسی آپاتیت جداگانه هر کدام در سرنگ با قطر سوزن ۰/۶mm و طول ۴cm قرار داده شدند و با تنظیم پارامترهای دستگاه با نرخ تغذیه ۰/۱ ml/h، ولتاژ



شکل (۱): شماتیک ساخت داربست نانوالیاف به روش الکترورسی

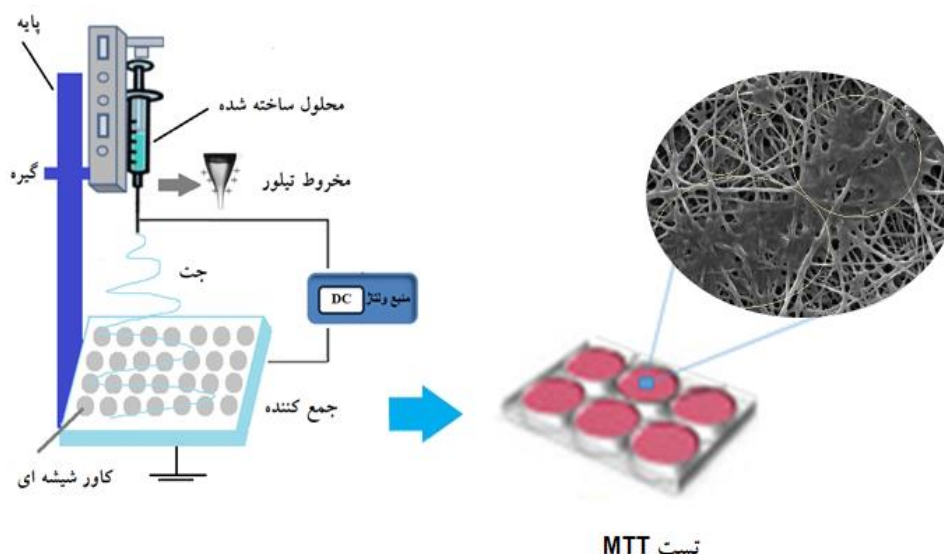
## ۲-۲- مشخصه یابی داربست ها

به منظور ارزیابی داربست ها و بررسی ساختار و قطر الیاف از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) (KYKY-SBC-12-) استفاده شد. ابتدا نمونه ها با طلا پوشش داده شدند و سپس تصویربرداری انجام گرفت و توسط نرم افزار ImageJ، به طور تصادفی ۲۰ لیف انتخاب و میانگین قطر متوسط الیاف اندازه گیری شد. در مطالعه قبلی [۲۰] میزان زاویه تماس سطح نانوالیاف، سطح ویژه، زیست تخریب پذیری و خواص مکانیکی داربست های ساخته شده مورد بررسی قرار گرفت و نتایج گزارش گردید. با توجه به نتایج حاصل از تحقیق قبلی، نمونه های ساخته شده گزینه مناسبی برای کاربرد به عنوان داربست در مهندسی بافت استخوان معرفی شد. بنابراین، در ادامه مطالعه قبلی در این تحقیق، تمایز سلولی و بررسی زنده مانی سلول های بنیادی بر روی سطح داربست ها برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان مورد ارزیابی قرار گرفت.

## ۲-۳- بررسی سمیت سلولی

### ۲-۳-۱- آماده سازی نمونه ها

میزان زنده مانی سلول های استخوانی بر روی داربست های پلی- کاپرولاکتون/ کراتین و پلی کاپرولاکتون/ کراتین/ هیدروکسی آپاتیت با روش MTT (Methyl Thiazol Tetrazolium) ارزیابی شد. برای آماده سازی نمونه ها، الکترورسی بر روی کاورهای شیشه ای با قطر ۱۵ میلی متر انجام گرفت. سرنگ تزریق دستگاه الکترورسی برای تهیه نانوالیاف همانطور که در شکل (۲) مشاهده می گردد، به صورت عمودی قرار می گیرد. در مرحله بعد، کاورهای شیشه ای حاوی نانوالیاف درون ظرف کشت سلول ۱۲ خانه قرار گرفت و به مدت ۵ روز با پرتو گاما با توان ۲۰ تا ۲۵ کیلوگری استریل گردید.



شکل (۲): الکترورسی نانو الیاف بر روی کاورهای شیشه ای برای آزمون MTT

دستگاه شیکر قرار گرفت و در ادامه رسوب حل شده به ظرف کشت سلول ۹۶ خانه منتقل شد و مقدار غلظت ماده حل شده در ایزوپروپانول با دستگاه الایزاید (پیش‌تاز طب مدل Avecina) در طول موج ۵۷۰ نانومتر محاسبه شد. چاهک دارای سلول‌های بیشتر، چگالی نوری (OD) بالاتری نسبت به OD مربوط به چاهک با سلول کمتر را نشان داد. درصد زنده مانده سلول‌ها (Cell Viability) از رابطه (۱) محاسبه می‌شود که OD<sub>s</sub> چگالی نوری نمونه و OD<sub>c</sub> چگالی نوری نمونه کنترل می‌باشد [۱۶].

$$\text{Cell Viability (\%)} = \frac{OD_s}{OD_c} \times 100 \quad (1)$$

### ۲-۳-۳-۲- تصویربرداری

برای بررسی چسبندگی سلول‌ها بر روی سطح داربست‌ها، نمونه‌های استریل شده با ۲۰۰۰۰ سلول در حجم ۱۰۰ میکرولیتر در چاهک‌های ظرف کشت سلول ۲۴ خانه‌ای برای ۴h در انکوباتور نگهداری شدند. پس از چسبیدن سلول‌ها، مقداری محیط کشت شامل FBS ۱۰٪ به هر چاهک اضافه شد. بعد از گذشت ۲۴h محیط کشت روی نمونه‌ها خارج گردید و نمونه‌ها با PBS (بافر فسفات) شستشو شدند. برای تثبیت بیولوژیکی سلول‌ها از گلو تار آلدئید (تثبیت کننده) استفاده شد. پس از قرار گرفتن

### ۲-۳-۲- آزمون MTT

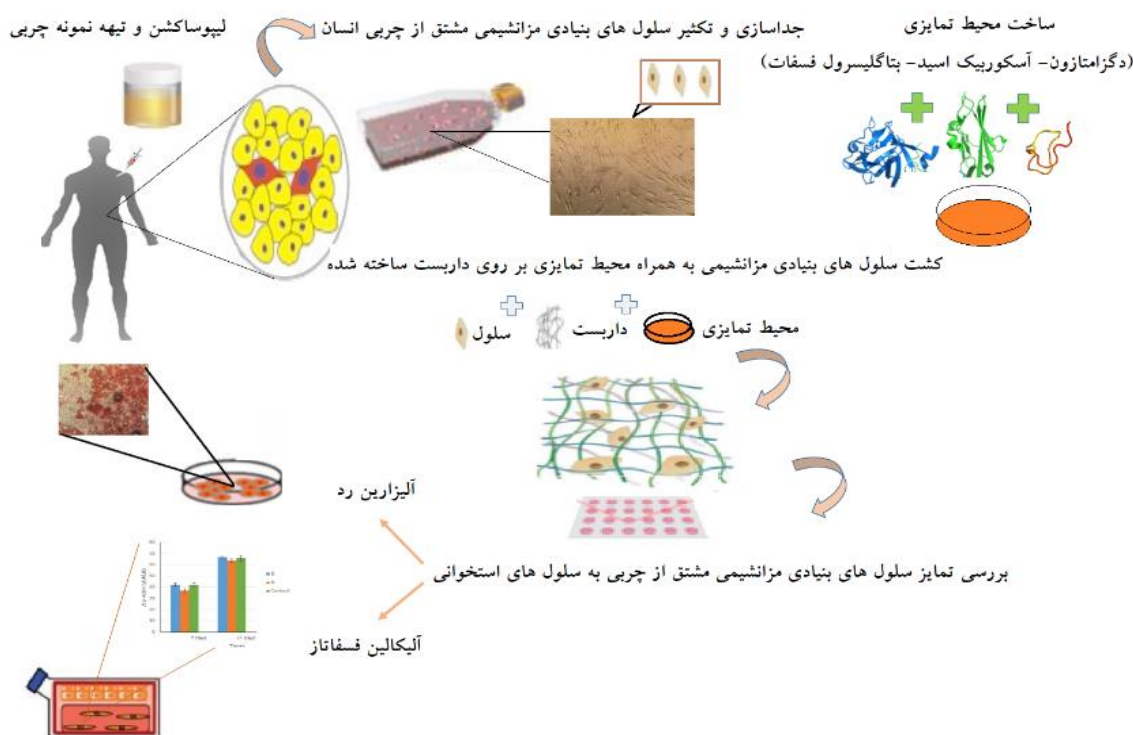
برای انجام آزمون سمیت سلولی، سلول استخوانی رده سلولی MG-63 (NCBI C555) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. پس از دفریز کردن سلول‌ها، سلول‌ها به فلاسک حاوی محیط کشت RPMI حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاو (FBS) انتقال داده شد و در انکوباتور با شرایط رطوبت ۹۰٪ و غلظت CO<sub>2</sub> ۵٪ در دمای ۳۷ °C قرار گرفت و محیط کشت هر سه روز یکبار تعویض گردید. برای بررسی میزان سمیت سلول‌ها در تماس با نمونه‌ها، ۱×۱۰<sup>۴</sup> سلول با ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت بر روی هر یک از نمونه‌های موجود در چاهک‌های ظرف کشت سلول ریخته شد و برای مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. در این آزمون، سه چاهک حاوی سلول و محیط کشت بدون حضور نمونه به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. پس از گذشت سه روز محیط کشت روی نمونه‌ها خارج گردید و ۵۰۰ میکرولیتر MTT با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در هر چاهک ریخته شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. پس از گذشت ۴ ساعت محلول روی سلول‌ها خارج شد و ایزوپروپانول به آن‌ها اضافه گردید تا بلورهای بنفش‌رنگ ایجاد شده حل شود. برای حل شدن بهتر رسوب MTT، پلیت به مدت ۱۵ دقیقه بر روی

(HMSC)<sup>۱۰</sup> تهیه شده از بانک سلولی پژوهشگاه انسیتوپاستور استفاده شد. سلول‌های مزانشیمی با محیط کشت DMEM+F12 شامل FBS ۱۰٪ در انکوباتور با شرایط رطوبت ۹۰٪ و غلظت CO<sub>2</sub> ۵٪ در دمای ۳۷ °C قرار گرفتند و محیط کشت هر سه روز یکبار تعویض گردید. تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های استخوانی با دو آزمون آلکالین فسفاتاز و رنگ آمیزی آلیزارین رد بررسی گردید. مراحل آماده‌سازی نمونه‌ها در شکل (۳) مشاهده می‌شود.

نمونه‌ها در ماده تثبیت کننده برای ۲ h در یخچال نگهداری شدند. سپس ماده تثبیت کننده خارج گردید و نمونه‌ها دو بار با آب دوبار تقطیر و الکل‌های ۵۰٪، ۶۰٪، ۷۰٪، ۸۰٪ و ۹۶٪ شستشو شدند. بعد از تثبیت سلول‌ها بر روی سطح نمونه‌ها، جهت مشاهده چسبندگی سلول‌ها، سطح نمونه‌ها با میکروسکوب الکترونی روبشی (SEM) تصویربرداری شد.

## ۲-۴- تمایز سلول‌های بنیادی

برای ارزیابی تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های استخوانی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از بافت چربی انسان



شکل (۳): شماتیک مراحل آماده‌سازی نمونه‌ها برای انجام آزمون‌های تمایز

از چاهک‌های پلیت ۱۲ خانه ریخته شد. یکی از چاهک‌ها با همان مقدار سلول بدون داربست به همراه محیط تمایزی به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد. نمونه‌های قرار گرفته در ظروف کشت در انکوباتور قرار داده شد. پس از گذشت ۱ روز و اطمینان از چسبیدن سلول‌ها بر روی سطح داربست‌ها، مقدار ۱ میلی‌لیتر محیط

## ۲-۴-۱- آلکالین فسفاتاز

به‌منظور بررسی میزان آلکالین فسفاتاز، سلول‌های بنیادی HMSC پس از رسیدن به تراکم مناسب، تریپسین شدند. سپس حدود ۵۰۰۰ سلول در حجم ۳۰۰ میکرولیتر محیط کشت شامل FBS ۱۰٪ بر روی هر یک از داربست‌های استریل شده با گاما در هر یک

مقایسه آماری داده‌های به دست آمده توسط روش t-student انجام شد. تعداد تکرار برای آزمون‌های ۳ در نظر گرفته شده و نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف از معیار گزارش شده است.

### ۳- نتایج و بحث

در مطالعه قبلی [۲۰]، داربست پلی کاپرولاکتون/کراتین و داربست پلی کاپرولاکتون/کراتین/ هیدروکسی آپاتیت با روش الکتروریسی ساخته شد و زاویه تماس، سطح ویژه و استحکام کششی نانوالیاف با اعمال نیرو در دو جهت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که سطح ویژه داربست حاوی نانو ذرات HA نسبت به داربست بدون نانو ذرات HA به ترتیب از  $5 \text{ g/m}^2$  به  $10 \text{ g/m}^2$  افزایش یافت. همچنین، افزایش مدول الاستیک و استحکام کششی داربست پلی- کاپرولاکتون/کراتین/هیدروکسی آپاتیت نسبت به داربست پلی- کاپرولاکتون/کراتین مشاهده گردید. داربست‌های تهیه شده با روش الکتروریسی دارای تخلخل بالاتر از ۸۰٪ بودند که دستیابی به این سایز تخلخل‌ها در مهندسی بافت استخوان امری ضروری برای انتشار یکنواخت سلول‌ها در سرتاسر فضای داربست می‌باشد. متوسط درصد تخلخل در داربست پلی کاپرولاکتون/کراتین و داربست پلی کاپرولاکتون/کراتین/ هیدروکسی آپاتیت به ترتیب از ۸۱/۵۴٪ به ۹۰/۴۵٪ افزایش یافت. با افزودن نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت به داربست، کاهش قطر الیاف و زاویه تماس و افزایش درصد تخلخل داربست رخ داد. کاهش زاویه تماس در داربست پلی کاپرولاکتون/کراتین/هیدروکسی آپاتیت دلیلی بر بهبود در پهن شونده‌گی و رشد سلول‌ها بر روی سطح داربست‌ها می‌باشد. نتایج تحقیق قبلی ما نشان داد داربست‌های حاوی هیدروکسی آپاتیت به‌عنوان داربست مهندسی بافت استخوان دارای خواص سطحی و مکانیکی مناسبی می‌باشند. بنابراین در ادامه مطالعه قبلی، میزان رشد و تکثیر سلول‌های استئوبلاست و تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های استخوانی مورد بررسی قرار گرفت.

کشت تمایزی به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد. محیط کشت تمایزی حاوی DMEM-F12، FBS ۱۰٪، یک میلی مولار دگزامتازون، ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر L-آسکوربیک اسید-۲- فسفات و ۱۰ میلی مولار بتا گلیسرول فسفات بود. در فاصله زمان‌های مشخص، هر ۴ روز یکبار، محیط کشت هر چاهک خارج گردید و محیط جدید اضافه شد. پس از گذشت ۷ و ۱۴ روز، سوپرناتانت سلولی (محلول شناور روی نمونه‌ها) جمع‌آوری شد و میزان آلکالین فسفاتاز موجود در آن مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت بررسی میزان آلکالین فسفاتاز از کیت آزمایشگاهی (شرکت پارس آزمون، هیتاچی مدل ۹۱۱، کیت AUDIT) استفاده شد و جذب نوری آلکالین فسفاتاز در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الیزاریدر اندازه‌گیری شد [۱۶].

### ۲-۴-۲- رنگ آمیزی آلزارین رد

رنگ آمیزی آلزارین رد آزمون‌ی جهت مشاهده رسوب کلسیم بر روی سطح نمونه‌ها می‌باشد. به منظور انجام این آزمون، ۵۰۰۰ سلول بنیادی HMSC با ۳۰۰ میکرولیتر محیط کشت شامل FBS ۱۰٪ بر روی هر یک از داربست‌های قرار گرفته در چاهک‌های ظرف کشت ریخته شد و در انکوباتور قرار داده شد. چاهک ظرف کشت فاقد داربست به همراه محیط تمایزی به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. پس از گذشت یک روز مقدار ۱ میلی‌لیتر محیط کشت تمایزی به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد. در فاصله زمانی مشخص محیط کشت هر چاهک خارج گردید و محیط جدید اضافه شد. بعد از ۱۴ روز محیط روی داربست‌ها خارج شد و داربست‌ها دو بار با محلول NaCl (۰/۹٪) شستشو داده شد. در این زمان، سلول‌ها با گلو تار آلدئید ۱٪ برای ۲۰ دقیقه تثبیت شدند و سپس با محلول رنگی آلزارین رد (۲٪، pH=۴/۲) به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق رنگ آمیزی شدند. سلول‌ها بار دیگر با محلول NaCl شستشو داده شدند و سپس با میکروسکوپ نوری بیولوژیکی (مدل Hp31) تصویربرداری شدند [۱۶].

### ۲-۵- ارزیابی آماری

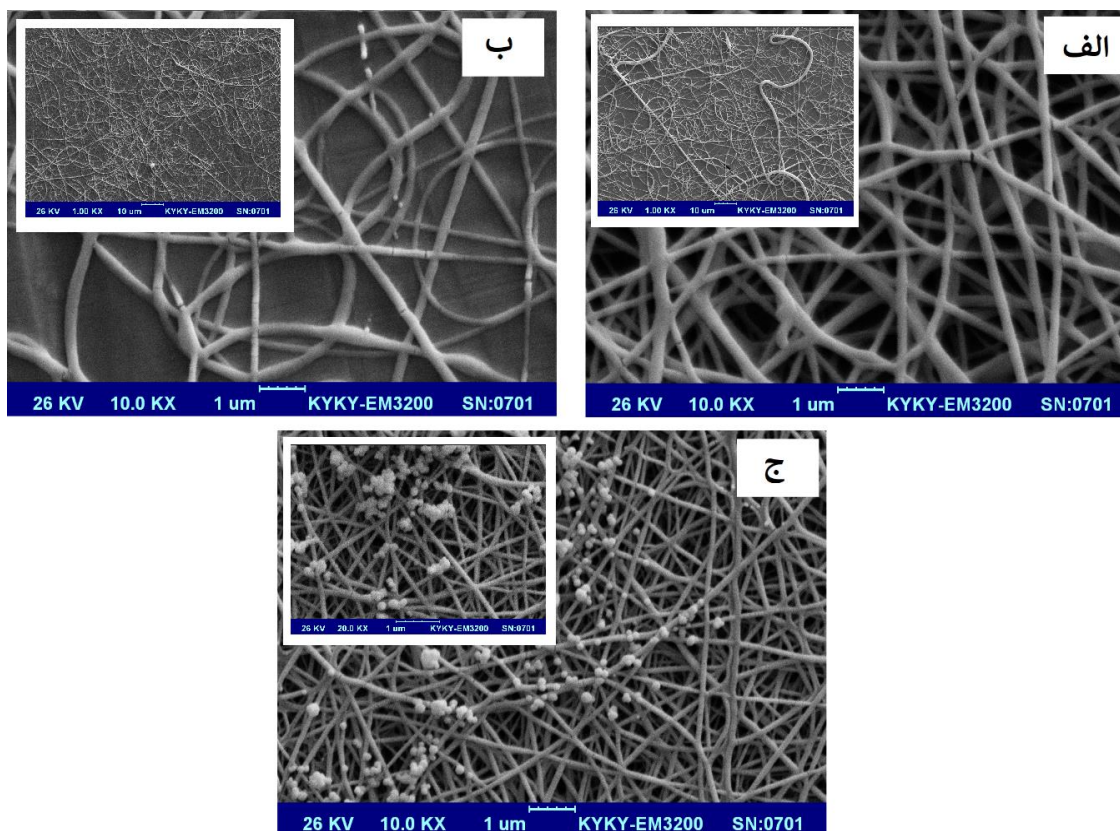


## ۳-۱- بررسی مورفولوژی سطح داربست‌ها

مورفولوژی سطح داربست‌ها با میکروسکوپ SEM تصویربرداری شد. شکل ۴ مورفولوژی سطح داربست‌های پلی-کاپرولاکتون/کراتین و پلی-کاپرولاکتون/کراتین/هیدروکسی آپاتیت و PCL را نشان می‌دهد. باید توجه داشت که تراکم الیاف در سه داربست با یکدیگر متفاوت است چون مدت زمان الکتروریسی مواد یکسان نمی‌باشد. ساختار داربست PCL از الیافی با سایز نسبتاً غیریکنواخت با متوسط قطر الیاف  $380 \pm 90$  nm تشکیل شده است. در شکل (۴-ب)، مورفولوژی داربست پلی-کاپرولاکتون/کراتین مشاهده می‌گردد که این ساختار دارای الیافی با سایز نسبتاً یکنواخت و با حداقل گره می‌باشد. با مقایسه میانگین قطر الیاف PCL و داربست پلی-کاپرولاکتون/کراتین، مشاهده می‌شود که با اضافه کردن کراتین در ترکیب، قطر الیاف الکتروریسی شده از  $380 \pm 90$  nm به  $150 \pm 40$  nm کاهش می‌یابد. در شکل (۴-ج)، داربست پلی-کاپرولاکتون/کراتین/هیدروکسی

آپاتیت مشاهده می‌شود. واضح است که ساختار داربست پلی-کاپرولاکتون/کراتین/هیدروکسی آپاتیت از یک مورفولوژی کشیده و صاف از الیافی با سایز نسبتاً یکنواخت و ذرات HA در سطح الیاف با حداقل گره تشکیل شده است. جهت ساخت داربست در این مطالعه حدود ۲۰٪ هیدروکسی آپاتیت به محلول کراتین/پلی-کاپرولاکتون اضافه گردید. هدف از اضافه کردن درصد بالای HA حضور آن در درون الیاف و بر روی سطح الیاف بود. چون این بیومتریال نامحلول است به راحتی ذرات بر روی سطح ظاهر می‌گردند و می‌توانند در تحریک استخوان‌سازی، رشد و تکثیر سلول‌های استخوانی و جوانه زنی HA نقش مؤثرتری ایفا کنند [۲۱].

در تصاویر میکروسکوپی اندازه ذرات HA روی سطح الیاف و قطر الیاف به ترتیب معادل  $70 \pm 34$  nm و  $85 \pm 24$  nm محاسبه گردید. با افزودن HA به محلول پلی-کاپرولاکتون/کراتین، ویسکوزیته و غلظت محلول افزایش می‌یابد و در نتیجه قطر الیاف کاهش می‌یابد [۲۲].



شکل (۴): تصاویر SEM داربست‌های: (الف): پلی-کاپرولاکتون، (ب): پلی-کاپرولاکتون/کراتین و (ج): پلی-کاپرولاکتون/کراتین/هیدروکسی آپاتیت



حضور کلسیم فسفات در داربست منجر به تشکیل هیدروکسی آپاتیت بر روی سطح داربست می گردد. این نتایج با نتایج به دست آمده در داربست پلی کاپرولاکتون/کراتین/هیدروکسی آپاتیت مطابقت دارد و حضور هیدروکسی آپاتیت در داربست سبب افزایش رشد و تکثیر سلول ها حتی بالاتر از نمونه کنترل می گردد.

### ۳-۲-۲- بررسی مورفولوژی و چسبندگی سلول ها

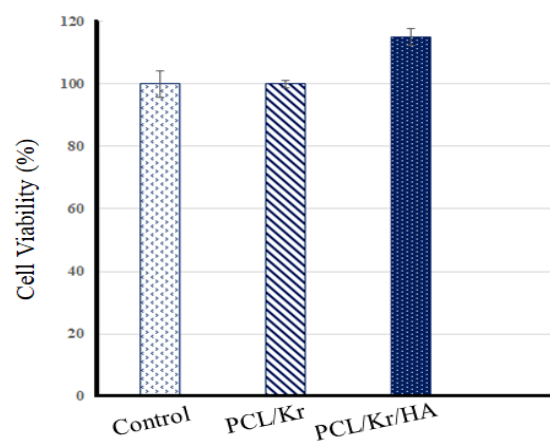
در شکل (۶) مورفولوژی سلول های MG-63 بر روی سطح داربست ها پس از سه روز کشت مشاهده می گردد. پهن شونده گی سلول های MG-63 بر روی سطح داربست پلی-کاپرولاکتون/کراتین/هیدروکسی آپاتیت بیشتر از پهن شونده گی سلول ها بر روی سطح داربست پلی کاپرولاکتون/کراتین می باشد. حضور هیدروکسی آپاتیت و کراتین سبب کاهش زاویه تماس و افزایش درصد تخلخل در داربست ها می شوند و در نتیجه سبب افزایش پهن شونده گی و چسبندگی سلول ها بر روی سطح داربست می گردند. همچنین، کراتین دارای اتصالات سلولی مانند لوسین-اسپارتیک اسید والین (LDV) و گلو تامیک اسید اسپارتیک اسید-سیرین (EDS) می باشد که سبب افزایش چسبندگی و تکثیر سلول ها بر روی داربست ها می شود [۲۴].

در پژوهشی مشابه [۱۹] مشاهده شد که با افزودن پلیمر طبیعی کراتین به داربست پلی کاپرولاکتون، چسبندگی سلول ها و پهن شونده گی و همچنین برهمکنش سلول ها با غشای نانو فیبری افزایش می یابد. در تحقیقی دیگر [۲۵] نانو الیاف کامپوزیتی کیتوسان/پلی کاپرولاکتون/هیدروکسی آپاتیت دوپ شده با Zn با استفاده از روش الکتروریسی ساخته شد. نتایج این تحقیق نشان داد که با افزودن هیدروکسی آپاتیت به داربست، اندازه الیاف کاهش می یابد و با کاهش سایز الیاف، افزایش سطح ویژه و درصد تخلخل رخ می دهد و در پی آن رشد و تکثیر سلول ها افزایش می یابد.

### ۳-۲- آزمون In vitro

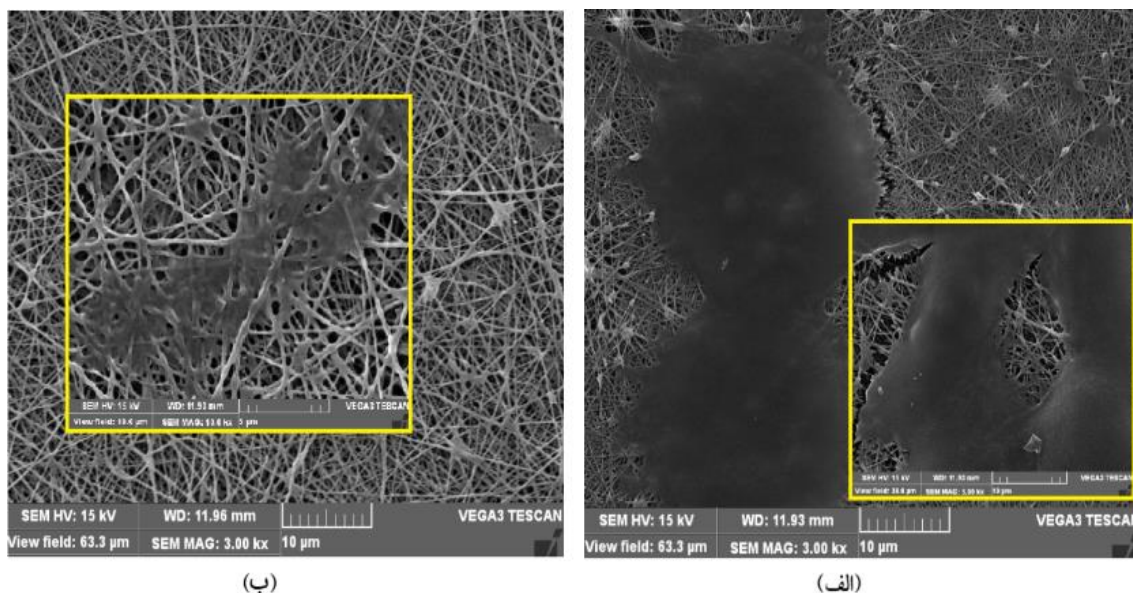
#### ۳-۲-۱- زیست سازگاری داربست ها

میزان زنده مانگی سلول های MG-63 بر روی سطح داربست ها در شکل (۵) مشاهده می شود. میزان زنده مانگی سلول ها در داربست پلی کاپرولاکتون/کراتین و داربست پلی کاپرولاکتون/کراتین/هیدروکسی آپاتیت به ترتیب ۱۰۰٪ و ۱۱۵٪ می باشد که نشان دهنده زیست سازگاری عالی هر دو داربست می باشد.



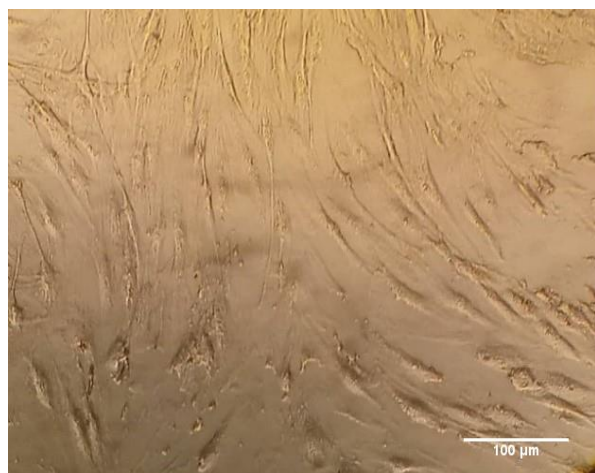
شکل (۵): میزان زنده مانگی سلول های MG-63 پس از ۳ روز کشت بر روی سطح داربست ها

در تحقیقی [۲۳] داربست کراتین/پلی کاپرولاکتون با روش الکتروریسی برای ترمیم بافت استخوانی مورد مطالعه قرار گرفت. با افزودن کراتین به داربست پلی کاپرولاکتون، قطر الیاف از ۵۵۲nm به ۱۹۶nm کاهش یافت و روند رشد سلولی و چسبندگی بهبود یافت. کاهش در قطر الیاف را می توان به افزایش هدایت الکتریکی محلول الکتروریسی با افزودن کراتین نسبت داد. بار منفی گروه های عاملی اسید آمینه کراتین سبب افزایش هدایت الکتریکی محلول الکتروریسی می گردد. در این تحقیق، پوشش سطح داربست کراتین/پلی کاپرولاکتون با کلسیم فسفات سبب افزایش میزان زنده مانگی سلول ها نسبت به داربست فاقد کلسیم فسفات شد. حضور اتصال سلولی لوسین-اسپارتیک اسید والین (LDV) بر روی کراتین در تحریک اینتگرین واسطه  $\alpha 4\beta 1$  و رشد و چسبندگی سلول ها مؤثر می باشد. همچنین،



شکل (۶): میکروگراف SEM چسبندگی سلول‌های MG-63 پس از ۳ روز کشت بر روی سطح داربست‌ها: (الف): پلی کاپرولاکتون/کراتین و (ب): پلی-کاپرولاکتون/کراتین/هیدروکسی آپاتیت

بافت چربی مشاهده می‌شود. سلول‌های بنیادی مزانشیمی بعد از تمایز به سلول‌های استئوبلاست دچار تغییرات مورفولوژیک از قبیل گرد شدن سلول و تغییر موقعیت هسته در سیتوپلاسم می‌شوند. علاوه بر آن در این سلول‌ها تغییرات بیوشیمیایی از قبیل افزایش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز، افزایش غلظت کلسیم، رنگ پذیری توسط آلزارین رد و افزایش متابولیسم سلولی نیز رخ می‌دهد [۲۶].

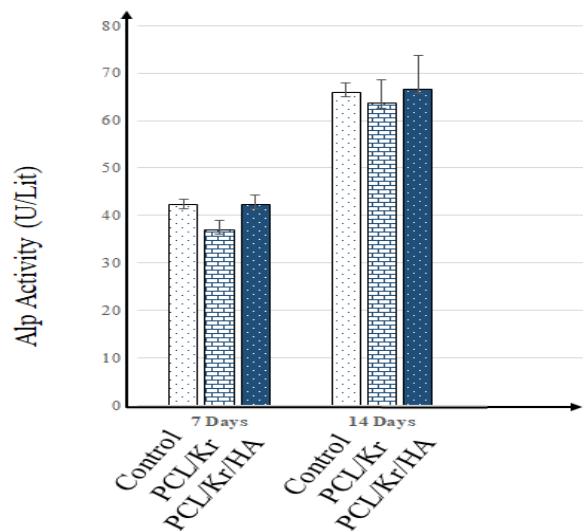


شکل (۷): تصویر میکروسکوپی نوری سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی

### ۳-۳- بررسی تمایز سلول‌های بنیادی

سلول‌های بنیادی مزانشیمی توان تمایزی سه‌ظرفیتی دارند به عبارت دیگر این سلول‌ها علاوه بر چربی و غضروف قادرند به سلول استخوانی نیز تمایز یابند. گزارش‌ها نشان داده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی از انعطاف پذیری بالایی برخوردار هستند، به طوری که می‌توانند تحت شرایط مناسب به انواعی از سلول‌ها تمایز یابند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی به این دلیل که به راحتی از نمونه‌های مغز استخوان قابل استخراج بوده و از طرفی در شرایط کشت به راحتی تکثیر می‌یابند، سلول مناسبی برای استفاده در مطالعات مرتبط با ژن درمانی، سلول درمانی و مهندسی بافت در نظر گرفته می‌شوند [۵]. در این تحقیق، از دو روش آنزیم آلکالین فسفاتاز و رنگ آمیزی آلزارین رد برای بررسی تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های استئوبلاست بر روی داربست پلی کاپرولاکتون/کراتین/هیدروکسی آپاتیت برای مدت زمان ۷ و ۱۴ روز استفاده شد. در کشت اولیه، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی با ظاهری شبیه به سلول‌های فیروبللاست یا دوکی شکل با هسته مشخص رشد و تکثیر یافتند. در شکل (۷) تصویر میکروسکوپی نوری سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از

محیط سبب برقراری پیوند کلسیم با سطح استئوکلستین و جذب یون مثبت کلسیم می گردد [۳۵].



شکل (۸): نمودار میزان آلکالین فسفاتاز در کنار داربست ها در بازه زمانی ۷ روز و ۱۴ روز

در مطالعه‌ای [۱۶] رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی در تماس با داربست‌های ژلاتین/نانو الیاف سلولز اصلاح شده با هیدروکسی آپاتیت جهت کاربرد در مهندسی بافت استخوان مورد بررسی قرار گرفت. نانو الیاف سلولزی دارای سطح ویژه مناسب جهت رشد سلول‌ها می‌باشد و با اصلاح سطح نانو الیاف سلولزی با هیدروکسی آپاتیت، سطح دارای بار منفی می‌گردد و جوانه‌زنی هیدروکسی آپاتیت را افزایش می‌دهد و در نتیجه رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی افزایش می‌یابد. چون سطح دارای بار منفی یون کلسیم را به سمت خود جذب می‌نماید. در تحقیقی مشابه [۳۳]، داربست پلی‌کاپرولاکتون/ژلاتین/نانوهیدروکسی آپاتیت/ویتامین D3 با روش الکترورسی ساخته شد و تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های استخوان با استفاده از روش MTT، فعالیت ALP و رنگ آمیزی الیزارین رد مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که حضور نانوذرات هیدروکسی آپاتیت در داربست منجر به افزایش فعالیت ALP در روزهای اول (روز ۱۴)، افزایش ترشح ماتریکس معدنی که نشانه

### ۳-۳-۱- بررسی آنزیم آلکالین فسفاتاز

آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) توسط سلول‌های استئوبلاست تولید می‌شوند، بنابراین این آنزیم به‌عنوان یک پارامتر برای بیان فعالیت سلول‌های استئوبلاست به کار می‌رود. در میان آزمون‌های بیولوژیکی مختلف برای تخمین میزان فعالیت استئوبلاست‌ها در تماس با داربست‌های مهندسی بافت، بررسی ترشح آنزیم آلکالین فسفاتاز از جمله آزمون‌های پرکاربرد می‌باشد [۲۷]. برای استخوانی شدن و مشاهده تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوانی باید آنزیم آلکالین فسفاتاز افزایش یابد و استئوپونتین، استئوکلستین و کلاژن نوع ۱ مشاهده گردد [۲۸]. همچنین باید توجه داشت که حضور عواملی مانند دگزامتازون [۲۹]، BMP 2 [۳۰] و کلاژن I [۳۱] در تمایز سلول‌های استئوژنیک تأثیرگذار می‌باشند [۳۲]. در این مطالعه، میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز بر روی نمونه‌ها در طی دو بازه زمانی ۷ و ۱۴ روز نسبت به نمونه کنترل مورد مقایسه قرار گرفت. بیان آنزیم آلکالین فسفاتاز برای تمام نمونه‌ها در شکل (۸) مشاهده می‌گردد. نتایج آزمون نشان داد که بیان آنزیم آلکالین فسفاتاز در داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون/کراتین و پلی‌کاپرولاکتون/کراتین/هیدروکسی آپاتیت پس از گذشت ۷ روز به ترتیب ۳۷ U/Lit و ۴۲/۳۳ U/Lit بود که میزان این مقادیر بعد از ۱۴ روز به ترتیب به ۶۳ U/Lit و ۶۶ U/Lit افزایش یافت، که تفاوت آماری معنی‌دار  $p < 0.05$  در رابطه با میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز در روز ۱۴ در مقایسه با روزه ۷ برای داربست‌ها مشاهده شد. حضور HA در داربست پلی‌کاپرولاکتون/کراتین/هیدروکسی آپاتیت منجر به تولید بیشتر آنزیم ALP می‌شود [۳۳]. HA دارای خواص زیست‌فعال و بازسازی بافت استخوان می‌باشد [۳۴] که علت این پدیده، پروتئین استئوکلستین می‌باشد که مهم‌ترین پروتئین غیر کلاژنی استخوانی است و به‌عنوان پروتئین سیگنال‌دهنده، سلول‌های استئوبلاست را تحریک می‌کند. بررسی‌های ساختاری پروتئین استئوکلستین نشان داده‌است که سطح این پروتئین دارای بار منفی می‌باشد که با حضور HA در



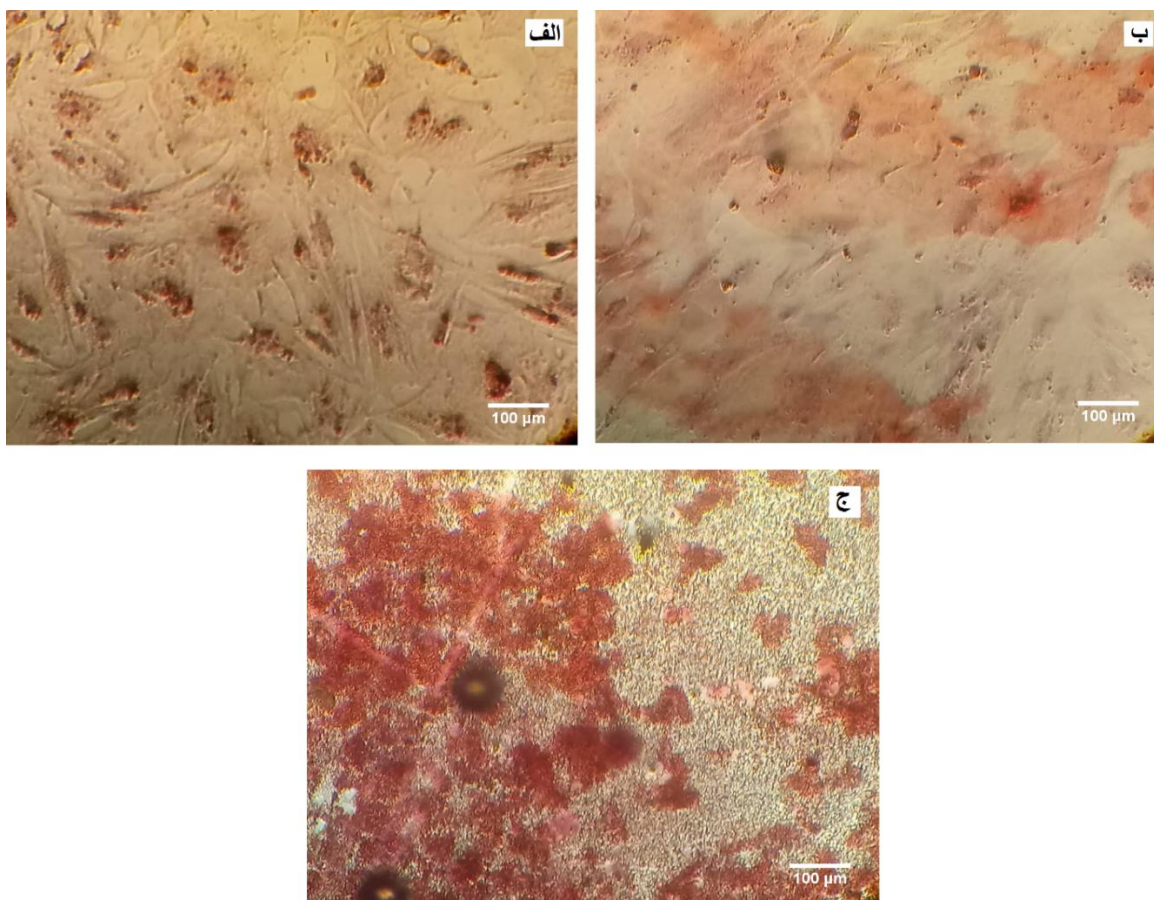
که به طور اختصاصی ماتریکس معدنی شده را در سلول‌ها به رنگ قرمز، رنگ آمیزی می‌کند، به طوری که شدت رنگ پذیری بافت با میزان مواد معدنی موجود در ماتریکس آن ارتباط مستقیم دارد [۳۶]. با توجه به گزارش‌های مشابه [۳۷-۳۸]، مثبت شدن رنگ آمیزی آلزارین رد دلیلی بر تشکیل نودولهای کلسیمی در ماتریکس سلول‌ها و تمایزهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استئوبلاست می‌باشد. رسوب کلسیم نشانه مینرالیزاسیون در سلول‌های استخوانی می‌باشد که با استفاده از رنگ آلزارین رد به رنگ قرمز- نارنجی قابل مشاهده است. در این مطالعه، کشت تمایزی به مدت ۱۴ روز انجام گرفت و وقوع تمایز بارنگ آمیزی آلزارین رد ارزیابی گردید. شکل (۹) نتیجه رنگ آمیزی آلزارین رد در روی سطح نمونه‌ها را نشان می‌دهد.

رسوب کلسیم است در مراحل پایانی (روز ۲۱) و افزایش تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های استخوانی می‌شود.

بنابراین، می‌توان حضور هیدروکسی آپاتیت بر روی سطح داربست پلی‌کاپرولاکتون/کراتین/هیدروکسی آپاتیت را دلیلی بر هدایت بیشتر رشد سلول‌های استخوانی و رسوب بیشتر یون کلسیم در مقایسه با نمونه کنترل و در نتیجه تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های استخوانی دانست.

### ۳-۲-۳- بررسی رنگ آمیزی آلزارین رد

میزان کلسیم و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز سلول‌های مزانشیمی و استئوبلاست با یکدیگر متفاوت می‌باشد [۳۲]، پس می‌توان برای تشخیص تمایز آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست، علاوه بر انجام تست آلکالین فسفاتاز از رنگ آمیزی آلزارین نیز استفاده نمود. آلزارین رد یک ترکیب آلی است



شکل (۹): تصاویر میکروسکوپی نوری رنگ آمیزی آلزارین رد بر روی سطح داربست‌ها در روز ۱۴ الف) نمونه کنترل، ب) داربست پلی‌کاپرولاکتون/کراتین و ج) داربست پلی‌کاپرولاکتون/کراتین/هیدروکسی آپاتیت.

کاربرد در مهندسی بافت استخوان مورد بررسی قرار گرفت. رشد و تکثیر سلول‌های استخوانی بر روی سطح داربست‌ها حاوی HA نشان از زیست‌سازگاری عالی داربست‌ها بود. همچنین تمایز بیشتر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی انسانی به سلول‌های استئوبلاست توسط بررسی آنزیم آلکالین فسفاتاز و رنگ آمیزی آلزاین رد در داربست حاوی نانو ذرات HA مشاهده گردید. بنابراین با توجه به درصد تخلخل، سطح ویژه و آبدوستی مناسب سطح و تمایز عالی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوانی در داربست کراتین/ پلی‌کاپرولاکتون/ هیدروکسی آپاتیت می‌توان این داربست را گزینه مناسبی برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان معرفی نمود.

#### ۵- قدردانی

نویسندگان از مرکز تحقیقات نانو دانشگاه صنعتی اصفهان و انسیتوپاستور تهران تشکر و قدردانی می‌نمایند.

#### ۶- مراجع

[1] S. Yang, K. F. Leong, Z. Du, & C. K. Chua, "The design of scaffolds for use in tissue engineering Part I. Traditional factors", *Tissue Engineering*, Vol. 7, pp. 679-689, 2001.

[۲] ن. کوپائی و ا. کارخانه، "بررسی خصوصیات مکانیکی و بیولوژیکی داربست مهندسی بافت بر پایه پلی‌کاپرولاکتون عامل دار و پلی اتیلن گلایکول دی آکریلات تقویت شده با ذرات هیدروکسی آپاتیت"، فصلنامه علمی-پژوهشی فرآیندهای نوین در مهندسی مواد، دوره ۱۲، شماره ۳، صفحه ۲۹-۴۳، ۱۳۹۷.

[۳] م. ر. فروغی، س. کرباسی، ر. ا. کهریزسنگی و ع. سعادت، "ارزیابی خواص فیزیکی داربست کامپوزیت نانو کریستال هیدروکسی آپاتیت/ پلی‌هیدروکسی بوتیرات برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان"، فصلنامه علمی-پژوهشی فرآیندهای نوین در مهندسی مواد، دوره ۷، شماره ۲، صفحه ۶۰-۵۱، ۱۳۹۱.

[4] S. Gorgieva, L. Girandon, & V. Kokol, "Mineralization potential of cellulose-nanofibrils reinforced gelatine scaffolds for promoted calcium deposition by mesenchymal stem cells", *Materials*

در شکل (۹-الف) نمونه کنترل مشاهده می‌شود که سلول‌های بنیادی مزانشیمی تحت تمایز قرار نگرفته است و پس از رنگ آمیزی با آلزاین رد رنگ قرمز ظاهر نمی‌گردد. عدم رنگ آمیزی سطح نمونه، نشانه عدم حضور کلسیم در سطح می‌باشد، بنابراین تمایز سلولی رخ نداده است. رنگ آمیزی آلزاین رد در روی سطح داربست پلی‌کاپرولاکتون/ کراتین/ هیدروکسی آپاتیت نسبت به داربست پلی‌کاپرولاکتون/ کراتین با شدت بیشتری به رنگ قرمز-نارنجی مشاهده گردید که این دلیلی بر رسوب بیشتر کلسیم بر روی سطح داربست پلی‌کاپرولاکتون/ کراتین/ هیدروکسی آپاتیت و همچنین تاییدی بر افزایش تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استئوبلاست می‌باشد. حضور رنگ قرمز-نارنجی بیشتر در داربست پلی-کاپرولاکتون/ کراتین/ هیدروکسی آپاتیت به دلیل حضور کاپرولاکتون/ کراتین/ هیدروکسی آپاتیت است که دلیل این امر مطابق با مطالعات مشابه که در ادامه توضیح داده شده است می‌باشد. در مطالعه‌ای [۳۲]، تمایز سلول‌های مزانشیمی روی داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون/ کلاژن/ هیدروکسی آپاتیت با حضور فاکتور رشد مشتق از پلاکت (PDGF) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که رسوب کلسیم و استئوکلسین‌ها در داربست‌های حاوی هیدروکسی آپاتیت به‌طور معنی‌داری نسبت به داربست‌های فاقد هیدروکسی آپاتیت افزایش می‌یابد. بنابراین تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های استخوانی در داربست‌های حاوی HA بیشتر قابل مشاهده است. در مطالعه مشابه با این تحقیق [۳۳] نیز مشاهده گردید که حضور HA در داربست مهندسی بافت، سبب افزایش گسترده شدن رنگ قرمز- نارنجی حاصل از رنگ آمیزی آلزاین رد بر روی سطح داربست که دلیلی بر اثبات تمایز سلول‌های بنیادی به سلول استخوانی می‌باشد، می‌گردد.

#### ۴- نتیجه گیری

در این تحقیق، داربست پلی‌کاپرولاکتون/ کراتین/ هیدروکسی آپاتیت با روش الکتروروسی ساخته شد و اثر هیدروکسی آپاتیت بر میزان تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های استخوانی جهت

- [13] H. Y. Mi, X. Jing, B. N. Napiwocki, Z. T. Li, L. S. Turng & H. X. Huang, "Fabrication of fibrous silica sponges by self-assembly electrospinning and their application in tissue engineering for three-dimensional tissue regeneration", *Chemical Engineering Journal*, Vol. 331, pp. 652-662, 2018.
- [14] K. Ghosal, C. Agatemor, Z. Špitálský, S. Thomas, & E. Kny, "Electrospinning Tissue Engineering and Wound Dressing Scaffolds from Polymer-Titanium Dioxide Nanocomposites", *Chemical Engineering Journal*, Vol. 358, pp. 1262-1278, 2018.
- [15] H. Lee, H. Hwang, Y. Kim, H. Jeon & G. Kim, "Physical and bioactive properties of multi-layered PCL/silica composite scaffolds for bone tissue regeneration", *Chemical Engineering Journal*, Vol. 250, pp. 399-408, 2014.
- [16] S. Gorgieva, L. Girandon & V. Kokol, "Mineralization potential of cellulose-nanofibrils reinforced gelatine scaffolds for promoted calcium deposition by mesenchymal stem cells", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 73, pp. 478-489, 2017.
- [17] K. Ren, Y. Wang, T. Sun, W. Yue & H. Zhang, "Electrospun PCL/gelatin composite nanofiber structures for effective guided bone regeneration membranes", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 78, pp. 324-332, 2017.
- [18] P. Wutticharoenmongkol, N. Sanchavanakit, P. Pavasant & P. Supaphol, "Preparation and characterization of novel bone scaffolds based on electrospun polycaprolactone fibers filled with nanoparticles", *Macromolecular Bioscience*, Vol. 6, pp. 70-77, 2006.
- [19] A. Edwards, D. Jarvis, T. Hopkins, S. Pixley & N. Bhattarai, "Poly ( $\epsilon$ -caprolactone)/keratin-based composite nanofibers for biomedical applications", *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, Vol. 103, pp. 21-30, 2015.
- [20] م. میرحاج، م. محمودی و ع. شیبانی، "بررسی تأثیر نانوذرات هیدروکسی آپاتیت بر خواص نانوالیاف کراتین جهت کاربرد در مهندسی بافت"، نشریه مواد پیشرفته در مهندسی، دوره ۳۶، شماره چهارم، صفحه ۴۵-۵۷، ۱۳۹۵.
- Science and Engineering: C, Vol. 73, pp. 478-489, 2017.
- [5] S. Pérez-Castrillo, M. L. González-Fernández, M. E. López-González & V. Villar-Suárez, "Effect of ascorbic and chondrogenic derived decellularized extracellular matrix from mesenchymal stem cells on their proliferation, viability and differentiation", *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, Vol. 220, pp. 60-69, 2018.
- [6] F. Rastegar, D. Shenaq, J. Huang, W. Zhang, B. Q. Zhang, B. C. He, L. Chen, G. W. Zuo, Q. Luo, Q. Shi & E. R. Wagner, "Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications", *World Journal of Stem Cells*, Vol. 2, pp. 67, 2010.
- [7] R. Langer, & D. A. Tirrell, "Designing materials for biology and medicine", *Nature*, Vol. 428, pp. 487, 2004.
- [8] F. Yi, & D. A. La Van, "Poly (glycerol sebacate) nanofiber scaffolds by core/shell electrospinning", *Macromolecular Bioscience*, Vol. 8, pp. 803-806, 2008.
- [9] Z. Keskin, A. S. Urkmez, & E. E. Hames, "Novel keratin modified bacterial cellulose nanocomposite production and characterization for skin tissue engineering", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 75, pp. 1144-1153, 2017.
- [10] J. G. Rouse, & M. E. Van Dyke, "A review of keratin-based biomaterials for biomedical applications", *Materials*, Vol. 3, pp. 999-1014, 2010.
- [11] Z. P. Rad, J. Mokhtari & M. Abbasi, "Fabrication and characterization of PCL/zein/gum arabic electrospun nanocomposite scaffold for skin tissue engineering", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 93, pp. 356-366, 2018.
- [12] J. Jaroszewicz, J. Idaszek, E. Choinska, K. Szlajak, A. Hyc, A. Osiecka-Iwan, W. Swieszkowski & S. Moskalewski, "Formation of calcium phosphate coatings within polycaprolactone scaffolds by simple, alkaline phosphatase based method", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 96, pp. 319-328, 2018.

- cement”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 131, pp. 39-46, 2015.
- [29] X. Ma, X. Zhang, Y. Jia, S. Zu, S. Han, D. Xiao, H. Sun & Y. Wang, “Dexamethasone induces osteogenesis via regulation of hedgehog signalling molecules in rat mesenchymal stem cells”, *International orthopaedics*, Vol. 37, pp. 1399-1404, 2013.
- [30] P. Yilgor, K. Tuzlakoglu, R. L. Reis, N. Hasirci & V. Hasirci, “Incorporation of a sequential BMP-2/BMP-7 delivery system into chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering”, *Biomaterials*, Vol. 30, pp. 3551-3559, 2009.
- [31] M. Mizuno & Y. Kuboki, “Osteoblast-related gene expression of bone marrow cells during the osteoblastic differentiation induced by type I collagen”, *The Journal of Biochemistry*, Vol. 129, pp. 133-138, 2001.
- [32] H. R. B. Raghavendran, S. Mohan, K. Genasan, M. R. Murali, S. V. Naveen, S. Talebian, R. McKean, & T. Kamarul, “Synergistic interaction of platelet derived growth factor (PDGF) with the surface of PLLA/Col/HA and PLLA/HA scaffolds produces rapid osteogenic differentiation”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 139, pp. 68-78, 2016.
- [33] M. Sattary, M. Rafienia, M. Kazemi, H. Salehi & M. Mahmoudzadeh, “Promoting effect of nano hydroxyapatite and vitamin D3 on the osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in polycaprolactone/gelatin scaffold for bone tissue engineering”, *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 97, pp. 141-155, 2019.
- [34] G. Turnbull, J. Clarke, F. Picard, P. Riches, L. Jia, F. Han, B. Li & W. Shu, “3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering”, *Bioactive Materials*, Vol. 3, pp. 278-314, 2018.
- [35] J. Huang, S. M. Best, W. Bonfield, R. A. Brooks, N. Rushton, S. N. Jayasinghe & M. J. Edirisinghe, “In vitro assessment of the biological response to nano-sized hydroxyapatite”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 15, pp. 441-445, 2004.
- [21] G. Liao, S. Jiang, X. Xu & Y. Ke, “Electrospun aligned PLLA/PCL/HA composite fibrous membranes and their in vitro degradation behaviors”, *Materials Letters*, Vol. 82, pp. 159- 62, 2012.
- [22] T. Qiao, S. Jiang, P. Song, X. Song, Q. Liu, L. Wang & X. Chen, “Effect of blending HA-g-PLLA on xanthohumol-loaded PLGA fiber membrane”, Vol. 146, pp. 221-227, 2016.
- [23] X. Zhao, Y. S. Lui, C. K. C. Choo, W. T. Sow, C. L. Huang, K. W. Ng, L. P. Tan & J. S. C. Loo, “Calcium phosphate coated keratin-PCL scaffolds for potential bone tissue regeneration”, *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 49, pp. 746-753, 2015.
- [24] Y. Esparza, N. Bandara, A. Ullah & J. Wu, “Hydrogels from feather keratin show higher viscoelastic properties and cell proliferation than those from hair and wool keratins”, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.*, Vol. 90, pp. 446-453, 2018.
- [25] F. M. Ghorbani, B. Kaffashi, P. Shokrollahi, E. Seyedjafari & A. Ardeshiryajimi, “PCL/chitosan/Zn-doped nHA electrospun nanocomposite scaffold promotes adipose derived stem cells adhesion and proliferation”, *Carbohydrate polymers*, Vol. 118, pp. 133-142, 2015.
- [26] K. Ino, T. Onodera, Y. Kanno, A. Suda, R. Kunikata, T. Matsue & H. Shiku, “Electrochemicolor imaging of endogenous alkaline phosphatase and respiratory activities of mesenchymal stem cell aggregates in early-stage osteodifferentiation”, *Electrochimica Acta*, Vol. 268, pp. 554-561, 2018
- [27] J. Jaroszewicz, J. Idaszek, E. Choinska, K. Szluzak, A. Hyc, A. Osiecka-Iwan, W. Swieszkowski & S. Moskalewski, “Formation of calcium phosphate coatings within polycaprolactone scaffolds by simple, alkaline phosphatase based method”, *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 96, pp. 319-328, 2019.
- [28] Z. Liu, Y. Tang, T. Kang, M. Rao, K. Li, Q. Wang, C. Quan, C. Zhang, Q. Jiang & H. Shen, “Synergistic effect of HA and BMP-2 mimicking peptide on the bioactivity of HA/PMMA bone



- [36] M. Abnosi & L. Dehdehi, "Study of morphology and biochemistry of rat bone marrow mesenchymal stem cells before and after osteogenic differentiation: a comparative study", *J. of Cell and Tissue*, Vol. 3, pp. 103-111, 2012.
- [37] C. A. Gregory, W. G. Gunn, A. Peister & D. J. Prockop, "An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction", *Analytical biochemistry*, Vol. 329, pp. 77-84, 2004.
- [38] A. Zaminy, I. Ragerdi Kashani, M. Barbarestani, A. Hedayatpour, R. Mahmoudi & S. Vardasbi, "Melatonin influences the proliferative and differentiative activity of rat adipose-derived stem cells", *Yakhteh*, Vol. 10, pp. 25-32, 2008.

## ۷- پی نوشت

- [1] Self-renewal  
[2] Totipotent  
[3] Pluripotent  
[4] Multipotent  
[5] Unipotent  
[6] Mesenchymal Stem Cell  
[7] Dexamethasone  
[8] Leucine-Aspartic Acid-Valine  
[9] L- Ascorbic Acid -Phosphate  
[10] Human mesenchymal stem cells  
[11] Platelet derived growth factor

## Effect of hydroxyapatite nanoparticles on differentiation of mesenchymal stem cells into bone cells in polycaprolacton/keratin/hydroxyapatite scaffolds

Mina Kalantari<sup>1</sup>, Mahboobeh Mahmoodi<sup>2, \*</sup>, Marjan Mirhaj<sup>1</sup>

1- M.Sc, Department of Biomedical Engineering, Yazd Branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran

2- Associate Professor, Department of Biomedical Engineering, Yazd Branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran

\*Corresponding Author: m.mahmoodi@iauyazd.ac.ir

---

### Abstract

The human body process can spontaneously repair small bone defects, while large bone defects cannot be repaired without medical interventions. Efforts to eliminate these shortcomings have led to the foundation of bone tissue engineering. In this research, polycaprolactone/keratin scaffold and Polycaprolactone/keratin/hydroxyapatite scaffold were fabricated using electrospinning method and were evaluated. Then, in order to evaluate the cellular differentiation, adipose tissue-derived mesenchymal stem cells were cultured on scaffolds and the process of differentiation of mesenchymal stem cells into bone cells for 7 and 14 days was investigated by alkaline phosphatase and alizarin red test. Increase of the activity of the enzyme alkaline phosphatase, the presence of the minerals and the red-orange-color extended on the scaffolds containing hydroxyapatite nanoparticles that confirmed the presence of Ca + 2, demonstrated the differentiation of mesenchymal cells into bone cells. Therefore, the results of this study suggest that the polycaprolactone/keratin/hydroxyapatite scaffold is a suitable substrate for proliferation and differentiation of stem cells for bone tissue engineering.

**Keywords:** Electrospinning, Mesenchymal Stem Cells, keratin, Hydroxyapatite, Cellular Differentiation, Nano fibers, Polycaprolactone.

---

Journal homepage: [ma.iaumajlesi.ac.ir](http://ma.iaumajlesi.ac.ir)

### Please cite this article using:

Mina Kalantari, Mahboobeh Mahmoodi, Marjan Mirhaj, Effect of hydroxyapatite nanoparticles on differentiation of mesenchymal stem cells into bone cells in polycaprolacton/keratin/hydroxyapatite scaffolds, *New Process in Material Engineering*, 2020, 14(1), 55-71.