فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال سیزدهم، شماره ۲، بهار ۱۴۰۰ ص. ۳۰-۱۹

مقاله پژوهشی

ساخت داربست فیبروئینی الکتروریسی شده و تاثیر پیش انکوباسیون آن در محیط‌کشت بر روی بقا و چسبندگی سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان رت

مریم جانی ترمی[۱]، اسماعیل فتاحی[۱*]، سید غلامعلی جورسرائی[۲]

[۱] گروه زیست‌شناسی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

[۲] مرکز درمانی تخصصی ناباروری حضرت فاطمه الزهرا بابل، دانشگاه علوم پزشکی بابل، ایران

*Email: Esmail_fattahy@yahoo.com

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: تیر ۱۴۰۰

چکیده

این مطالعه به منظور سنتز داربست فیبروئینی الکتروریسی شده و بررسی تاثیر وابسته به زمان پیش-انکوباسیون آن در محیط‌کشت بر روی چسبندگی سلولی و تکثیر سلول‌های کاشته شده بر روی داربست انجام گردید. ابتدا سریسین زدائی پیله ابریشم و آماده‌سازی فیبروئین انجام شد و سپس محلول فیبروئین ۳% وزن/حجم با استفاده از اسید فرمیک تهیه شد. سپس با دستگاه الکتروریسی آزمایشگاهی، داربست فیبروئینی الکتروریسی شده ساخته شده و با میکروسکوپ الکترونی نگاره مورد ارزیابی قرار گرفت. پیش- انکوباسیون داربست در محیط‌کشت به مدت صفر، ۱، ٦، و ۱۰ روز انجام شد و با روش اندازه گیری زاویه تماس قطره آب، میزان آب دوستی داربست‌ها ارزیابی گردید. سپس سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان رت جداسازی، کشت، و بر روی داربست‌ها کاشت گردید. بعد از ۲۱ روز از کاشت سلول‌ها، میزان بقا سلول‌ها (به روش MTT) و غلظت DNA ژنومی سلول‌های چسبیده به داربست مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که افزایش مدت زمان پیش-انکوباسیون داربست در محیط کشت منجر به کاهش زاویه تماس و افزایش بقا و تکثیر سلول‌ها گردید. به طور کلی مطالعه کنونی نشان داد که پیش - انکوباسیون داربست فیبروئینی الکتروریسی شده با الاستیسیته ثابت در محیط کشت منجر به افزایش آب دوستی داربست و متعاقبا افزایش تکثیر و بقا سلول‌های مزانشیمی کاشته شده بر روی آن می‌گردد. از این یافته می‌توان به عنوان یک فاکتور موثر در آماده سازی کاشت سلول‌های غضروفی بر روی داربست در مهندسی بافت استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: الکتروریسی، داربست، فیبروئین، کشت سلول.

مقدمه

مهندسی بافت به عنوان یک فناوری امید بخش جایگاه مهمی در ترمیم بافت‌ها و اندام‌های آسیب دیده با استفاده از سلول‌ها و داربست دارد [۱, ۲]. در طی چند سال اخیر روش‌های مختلفی برای ساخت داربست‌های مورد استفاده در مهندسی بافت ارائه شده است که هر کدام دارای مزایا و معایبی می‌باشند و در عین حال با توجه به هدفی که در مهندسی بافت دنبال می‌شود میتوان یکی از آن‌ها را به کار برد. یکی از این روش‌ها، الکتروریسی می‌باشد که در آن از نیروی الکتریسیته برای تولید الیاف رشته‌ای از محلول‌های پلیمری استفاده می‌شود. الکتروریسی یک روش ساده، آسان، و قابل تکرار بوده که بوسیله آن می‌تواند الیافی با ضخامت نانو تا میکرومتر ایجاد کرد. تبدیل پلیمر به الیاف پلیمری با قطر میکرو و نانومتر باعث می‌گردد که نسبت سطح به حجم آن‌ها افزایش یافته و در نتیجه آن ویژگی‌های جدیدی را بروز دهند و در عین حال منعطف بوده و دارای استحکام و سختی بالایی باشند [۳]. داشتن سطح گسترده و منافذ زیاد این پتانسیل را به این الیاف می‌دهد که به راحتی سلول‌ها به آن متصل شده و در مهندسی بافت به عنوان داربست مفید باشند، درست همانطور که از یک ماتریکس خارج سلولی انتظار می‌رود. نانو الیاف الکتروریسی شده گزینه مناسبی برای استفاده در مهندسی بافت استخوان، غضروف و عصب بوده تا به عنوان داربست مورد استفاده قرار گیرند [٤].

امروزه از این نظر به الیاف الکتروریسی شده توجه می‌کنند که آنها سازگاری مناسبی با سلول‌ها برای اتصال و تکثیر مانند شرایط خارج سلولی دارند. واکنش‌هایی که بین داربست زیستی الکتروریسی شده و سلول‌ها وجود دارد در مهندسی بافت غضروف و استخوان مورد ارزیابی قرار گرفته است [٥]. مطالعاتی که در زمینه واکنش سلول‌ها با بسترهای زیستی انجام شده است نشان داده که سلول‌ها زمانی که با این مواد زیستی مواجه می‌شوند نمی‌توانند به طور مستقیم به آنها متصل گردند بلکه این ساختارهای زیستی می‌بایست ابتدا پروتئین‌های سرم یا خون را جذب کنند تا نسبت به سلول‌ها دارای سازگاری زیستی و شرایط اتصال گردند [٦, ۷]. مشابه با محیط طبیعی که در آن سلول‌ها به پروتئین‌های موجود در ماتریکس خارج سلولی متصل می‌گردند در شرایط برون-تنی، اتصال سلول به سطح کشت نیز از طریق پروتئین‌های چسبنده موجود در محیط کشت کامل رخ می‌دهد [۸]. پروتئین‌های موجود در سرم که دارای خاصیت متفاوت تمایل به اتصال می‌باشند به صورت رقابتی به پلیمر می‌چسبند [۹]. در طی زمان، لایه‌ای که دارای پروتئین‌های جذب شده (مانند آلبومین) می‌باشد به سرعت با لایه‌ای که دارای پروتئین با وزن مولکولی بالاتر و خاصیت تمایل به اتصال بیشتر می‌باشد جایگزین می‌گردد [۱۱,۱۰].

جذب پروتئین و تاثیر آن بر داربست‌های سه بعدی نیز دارای اهمیت می‌باشد و مورد توجه محققان است. مطالعه قبلی نشان داده است که ساخت داربست‌های سه بعدی پلیمری از طریق غوطه ور کردن آن در محلول فیبرونکتین منجر به افزایش معنی‌دار چسبندگی سلول به آن‌ها می‌گردد [۱۲]. از طرف دیگر، مواجه داربست‌های ساخته شده از پلی‌لاکتیک اسید/هیدروکسی آپاتیت با FBS، فیبرونکتین، و ویترونکتین به طور معنی داری منجر به کاهش آپوپتوز گردید [۱۳]. تعدادی از مطالعات برون تنی وجود داشته‌اند که تاثیرات طولانی-مدت پیش-انکوباسیون داربست‌های سه-بعدی در محیط کشت بر روی رفتارهای سلولی را مورد ارزیابی قرار دادند. برخی از ویژگی‌های پلیمر مانند قدرت آبدوستی در نتیجه انکوباسیون در چنین محیط هایی تغییر خواهد کرد [١٤]. همه این تغییرات ممکن است ناشی از باز-آرایش پلیمر در سطح داربست باشد که ممکن است وابسته به زمان بوده و با افزایش مدت زمان انکوباسیون پلیمر در محیط کشت شدیدتر گردد [١٥]. مطالعه قبلی نشان داده است که پیش انکوباسیون پلیمر پلی‌لاکتیک اسید در محیط‌کشت منجر به افزایش چسبندگی سلول شده است [١٦]. علاوه براین، پیش انکوباسیون داربست سه بعدی پلی کارپولاکتونی به مدت بیش از ۷ روز در محیط کشت منجر به افزایش تکثیر سلولی شده است اما بر روی اتصال سلولی تاثیری نداشته است [١٧].

یکی از رویداد هایی که در پیش تیمار مواد زیستی در محیط کشت فیزیولوژیکی رخ میدهد تغییر در خاصیت آبدوستی این مواد در طی زمان می‌باشد که ممکن است بر روی اتصال سلولی و تکثیر سلول‌ها تاثیر بگذارد. در این مطالعه به منظور آزمودن این فرضیه، ابتدا داربست‌های فیبروئین ابریشمی که به روش الکتروریسی ساخته شده را در محیط کشت کامل پیش انکوبه کرده و از روش زاویه تماس آب به منظور بررسی ویژگیهای آبدوستی داربست‌های پیش انکوبه شده استفاده شد. سپس تاثیر این پیش تیمار بر روی بقا و تکثیر سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان رت از طریق تست MTT و سنجش غلظت DNA ژنومی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

استخراج فیبروئین ابریشم

بعد از انتقال پیله ابریشم گونه *Bombyx Mori* (نوقان داران منطقه بابل-کنار شهرستان بابل) به آزمایشگاه، لاروها از آن خارج گردید و به قطعات ریز تبدیل شدند. جهت سرسین زدائی الیاف پیله‌ها، الیاف به مدت ۳۰ دقیقه در محلول بی کربنات سدیم (سیگما آلدریچ، آمریکا) با غلظت ۰/۰۲ مولار جوشانده شد. نمونه الیاف سریسین زدائی شده با آب مقطر شسته شده و در دمای اتاق به مدت ۲٤ ساعت خشک گردید. سپس محلول بروماید لیتیوم (LiBr) ۹/۳ مولار (سیگما آلدریچ، آمریکا) آماده شد تا زمینه برای تهیه محلول فیبروئین ابریشم فراهم گردد. به این منظور، نمونه الیاف ابریشمی خشک شده فیبروئین (با نسبت ۲۰% وزنی) به این محلول اضافه گردید تا به مدت ٥ ساعت در دمای ٦۰ درجه سلسیوس حل گردد. محلول بدست آمده با آب مقطر به مدت ۷۲ ساعت دیالیز گردید تا نمک‌های باقی مانده لیتیوم بروماید آن حذف گردد. تناوب تعویض آب دیالیز در روز اول سریعتر بوده (فاصله زمانی کمتر از ۲ ساعت) و در روزهای بعد طولانی تر (هر ۸ ساعت) انجام می‌شد [۱۸].

ساخت داربست الکتروریسی

محلول فیبروئین دیالیز شده با دور۹۰۰۰ rpm در دمای ٤ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ (دامل، اسلوونی) گردید و در دمای ۸۰- به مدت ۲٤ ساعت فریز شد. در مرحله بعد، محلول فریز شده به مدت ۲٤ ساعت با دستگاه خشک کن انجمادی (هاواچ، چین) خشک گردید. سپس مقداری از فیبروئین ابریشم در اسید فرمیک حل گردید تا غلظت ۳% وزن/حجم بدست آید. در مرحله بعد فرایند الکتروریسی کردن توسط دستگاه الکتروریسی آزمایشگاهی (فناوران نانومقیاس ایران، ES1000) با سوزنی که دارای فاصله ۱۸ سانتی متر از جمع کننده داشت و سرعت جریان آن ۰/۹ میلی‌لیتر بر ساعت و ولتاژ ۳٥ کیلوولت بود انجام گردید. در نهایت داربست فیبروئینی ابریشمی الکتروریسی شده در جمع کننده بدست آمد [۱۹].

ارزیابی داربست با میکروسکوپ الکترونی نگاره

داربست‌های فیبروئینی ابریشیمی الکتروریسی شده با طلا پوشش داده شدند و سپس تصاویر مربوطه توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM, Philips, Netherland) گرفته شد. ولتاژ شتابدهنده ۱۰ کیلوولت استفاده گردید تا ساختار میکرونی داربست‌ها مشاهده گرددد.

پیش انکوباسیون داربست در محیط کشت

این آزمایش به منظور بررسی تاثیر پیش انکوباسیون داربست (با الاستیسیته ثابت) در محیط‌کشت بر روی تکثیر و بقای سلول‌های کاشته شده بر روی آن انجام شده است. داربست الکتروریسی شده در پلیت‌های ۲٤ خانه‌ای حاوی اتانول ۷۰% قرار گرفتند تا استریل شوند (۱ ساعت). سپس الکل را دور ریخته و داربست‌ها با PBS شسته شدند و به مدت یک ساعت تحت اشعه UV نیز قرار گرفتند. بعد از استریل کردن داربست‌ها، آنها به پلیت ۲٤ خانه ای حاوی محیط‌کشت کامل (FBS 10% + DMEM) منتقل شدند و تحت شرایط استاندارد (در دمای اتاق و در شرایط استریل و زیر هود لامینار) به مدت صفر، ۱، ٦ و ۱۰ روز انکوباسیون صورت گرفت.

اندازه‌گیری زاویه تماس قطره آب (خاصیت تر شوندگی)

این آزمایش به منظور اندازه گیری خاصیت آب دوستی داربست‌هایی که در طی زمان‌های مختلف در محیط‌کشت انکوبه شدند و داربست‌هایی که این مرحله انکوباسیون را طی نکردند از طریق روش زوایه تماس آب طراحی شده است. برای هر گروه، ۲ داربست برای این سنجش با سه تکرار برای هر داربست درنظر گرفته شد. ابتدا نمونه‌ها در محیط کشت کامل به مدت صفر روز (کنترل)، ۱، ٦ و ۱۰ روز انکوبه شدند. سپس داربست‌ها با آب شسته شده و خشک گردیدند. سپس زاویه تماس قطره آب با سیستم اندازه‌گیری زاویه تماس (CA-500, Sharifsolar, Iran) سنجش گردید.

جداسازی و کشت سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان رت

ابتدا رت‌ها (۳ رت به صورت جداگانه برای هر آزمایش) که ۲۸-٤٥ روز سن داشتند و دارای ۱۳۰ تا ۱٤۰ کیلوگرم وزن بودند با ایزوفلوران (سیگما آلدریچ، آمریکا) تحت شرایط استریل بی هوش شدند. مراحل این آزمایش طبق پروتکل کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بابل انجام گردید. سپس رت‌ها به منظور جداسازی استخوان ران و درشت نی تشریح شدند. انتهای دیستال این استخوان‌ها باز شده و اجتماعات سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان از طریق شستشوی انتهای آن با محیط کشت [1] حاوی FBS (جیبکو- اینویتروژن، آمریکا) (۱۰%) جمع‌آوری گردید. سپس، این اجتماعات سلولی با عبور آن‌ها از نیدل با دهانه کاهشی شکسته شد. این سلول‌ها تحت سانتریفیوژ گرادیانت (۱/۰۷۳ گرم بر میلی‌لیتر فایکول (اینوتراین، آلمان) با سرعت rpm ۱۵۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه) قرار گرفتند تا فرکشنی از سلول‌های تک هسته‌ای بدست آید. سلول‌ها به آرامی به محلول فایکول اضافه شده و سانتریفیوژ گردید. این سلول‌ها با محیط‌کشت شسته شده و در فلاسک (جت بایوفیل، چین) حاوی DMEM (جیبکو- اینویتروژن، آمریکا)، FBS (10%)، پنیسلین- استرپتومایسین (سیگما آلدریچ، آمریکا) (100 U/ mL)، آمفوتریسین B (0.25 μg/mL)، فاکتور رشد فیبروبلاستی (1 ng/mL) (به منظور جلوگیری از تمایز) با تراکم 5×10^6 سلول کشت شدند. بعد از ٤ روز انکوباسیون (ممرت، آلمان) سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و با دی اکسید کربن ۵%، سلول‌هایی که به کف فلاسک نچسبیدند با عمل شستشو جداسازی شدند و تا رسیدن به تراکمی که ۷۰ تا ۸۰ درصد فلاسک را پر کنند پاساژ داده شدند (معمولا ۱ تا ۲ بار) [۲۰].

پاساژ و تعویض محیط کشت و شمارش سلول‌ها

در این مطالعه ۲٤ ساعت قبل از پاساژ سلولی، محیط‌کشت سلول‌ها تعویض گردید. جهت تعویض محیط‌کشت، محیط رویي فلاسک را دور ریخته و سلول‌هاي چسبیده به کف فلاسک را با PBS استریل شستشو داده و سپس محیط کشت کامل جدید به سلول‌ها اضافه گردید. سپس براي پاساژ دادن، سلول‌ها در معرض محلول Trypsin EDTA (۵۰۰ میکرو لیتر) قرار داده شدند و به منظور افزایش عملکرد آنزیم، فلاسک‌ها در دماي ۳۷ درجه سانتي‌گراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه شدند. به منظور خنثی سازی اثر تریپسین و جلوگیری از اثر طولانی مدت آن که میتواند منجر به مرگ سلول گردد FBS به سلول‌ها اضافه گردید. بعد از سانتریفیوژ سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه در 4200-4000 rpm، محلول رویي را دور ریخته و سلول‌ها در محیط کشت تازه به صورت سوسپانسیون درآمده و به دو یا چند فلاسک منتقل گردید. به منظور بررسی میزان بقا سلول‌ها در ابتدا و انتهای کشت، بعد از پاساژ سلولی و تعویض محیط‌کشت، سلول‌ها شمارش شدند. به این منظور سوسپانسیون سلولي (۱۰۰ میکرو لیتر) با محلول تریپان‌بلو (۱۰۰ میکرولیتر) مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در یخچال قرار داده شد. سپس از یک قطره از سوسپانسیون سلولی و صفحه مشبک لام هموسایتومتر به منظور شمارش استفاده گردید. در این روش سلول‌های سالم رنگ جذب نکرده و سلول‌های آسیب دیده دارای غشایی می‌باشند که رنگ را جذب می‌کنند.

کاشت سلول‌ها بر روی داربست‌ها

[1] Alpha modified Minimum Essential Medium

ابتدا محیط‌کشت داربست‌های پیش انکوبه شده را خارج کرده و سلول‌ها به داربست اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردیدند. سپس محیط‌کشت جدید غضروف زائی (DMEM، 10% FBS، ۱۰۰ نانومولار دگزامتازون، 1000 U/mL محلول استرپتومایسین، 100 U/mL پنیسلین، ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر آمفیتریسین B، ۱ میلی مولار سدیم پیرووات، ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر TGF b1، ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسید آسکوربیک، [1X ITS3 ۰/۵۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر ترانسفرین، ۴۷۰ میلی گرم بر میلی لیتر اسید لینولیک، ۱ میلی‌گرم بر میلی لیتر انسولین گاوی، ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر سلنیت سدیم، ۴۷۰ میلی گرم بر میلی لیتر اسید اولئیک، ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر BSA] ، ۲ میلی مولار ال-گلوتامین، و ۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر ال-پرولین) آماده شد تا سلول‌های کاشته شده برای روزهای بعدی در آن انکوبه شوند. تعویض محیط کشت هر دو روز انجام شد و انکوباسیون تا روز ۲۱ ادامه یافت [۲۰].

ارزیابی MTT

بعد از ۲۱ روز از کاشت سلول‌ها بر روی هر یک از داربست‌های پیش انکوبه شده در محیط‌کشت (به مدت صفر، ۱، ٦ و ۱۰ روز)، جهت کمی سازی بقا سلول‌ها بر روی داربست فیبروئینی ابریشمی الکتروریسی شده از ارزیابی MTT استفاده شد. ابتدا پودر MTT (۵ میلی‌گرم) (سیگما آلدریچ، آمریکا) در ۱ میلی‌لیتر بافر PBS (۱ میلی‌لیتر) حاوی ۱۰% FBS حل و محلول حاصل با فیلتر ۰/۲ میکرومتر سترون گردید. سپس محیط کشت سلول‌های مزانشیمی (۱۰۰ هزار سلول در هر میلی لیتر) که بر روی داربست‌ها به مدت ۲۱ روز کشت شدند با محلول MTT (۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) جایگزین شد و سلول‌ها به مدت ٤ ساعت در تاریکی انکوبه شدند. در مرحله بعد، محلول MTT حذف شد و DMSO اضافه گردید. در نهایت میزان جذب محلول آماده شده در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانش گردید [۲۱].

سنجش غلظت DNA

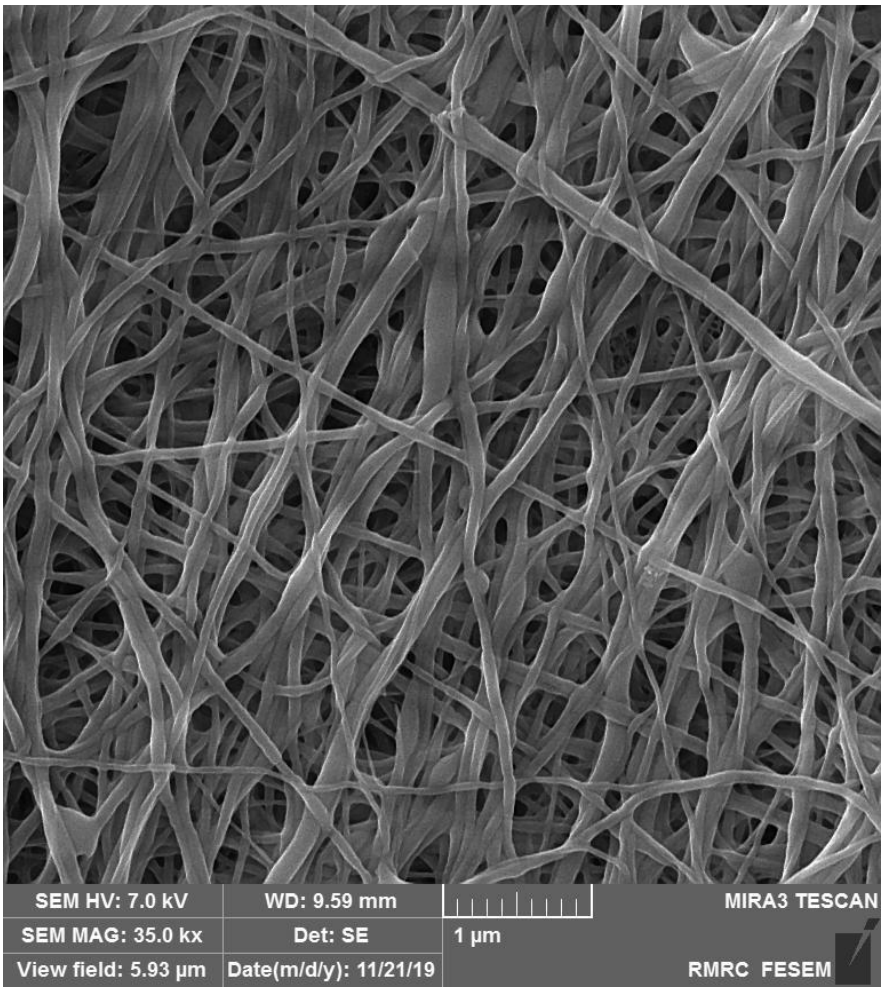
بعد از ۲۱ روز کاشت سلول‌ها بر روی هر یک از داربست‌هایی که به مدت صفر، ۱، ٦، و ۱۰ روز پیش انکوبه شدند استخراج DNA ژنومی سلول‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA محصول شرکت یکتا تجهیز آزما انجام شد. به این منظور ابتدا داربست‌ها با PBS شسته شو داده شدند، سپس به میکروتیوپ (۱/۵ میلی لیتر) منتقل و به ترتیب با بافر TG1 (۲۰۰ میکرولیتر) و محلول پروتئیناز K (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) میکس و ورتکس گردید. عمل لیز کردن با انکوباسیون در دمای ٦۰ درجه سلسیسوس و چند مرحله ورتکس کامل گردید. سپس اضافه کردن بافر TG2 و اتانول (۹٦%) به همراه انکوباسیون و ورتکس انجام شد. طی چند مرحله سانتریفیوژ و شستشو طبق پروتکل کیت، محلول DNA جمع آوری گردید. در نهایت غلظت DNA از طریق اسپکتروفوتومتری (نانودراپ) اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری

مقایسه آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲٤ انجام شد. جهت نشان دادن داده‌ها از میانگین± انحراف معیار استفاده گردید. با توجه به اینکه داده‌ها دارای یک متغیر در چند گروه وجود داشتند از آنالیز واریانس (ANOVA) یک طرفه به همراه پس-آزمون توکی استفاده شد. سطح معنی داری $P<0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

بعد از آماده سازی داربست‌های فیبروئینی الکتروریسی شده از محلول فیبروئینی با غلظت ۳% وزن/ حجم، ارزیابی ریخت شناسی از این داربست‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره انجام شد. تصاویر نشان دادند (شکل ۱) که فیبرهای الکتروریسی شده حاصل از محلول فیبروئین با غلظت ۳% وزن به حجم دارای قطر ۱۲±۳۸ نانومتر بوده‌اند.



شکل ۱. تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره از ساختار داربست فیبروئینی الکتروریسی شده.

خاصیت آبدوستی داربست ها

بعد از پیش انکوباسیون داربست‌ها در محیط کشت و اندازه‌گیری زاویه تماس آب با استفاده از سیستم اندازه گیری زاویه تماس، نتایج شکل ۲ و نمودار ۳ حاصل شده است. مطابق با شکل، بیشترین زاویه تماس در داربست‌هایی که در محیط کشت پیش انکوبه نشدند صورت گرفت (۱٤±۹۱ درجه). از طرف دیگر انکوباسیون داربست‌ها در محیط کشت به مدت ۱۰ روز منجر به کاهش زاویه تماس شده است (٤± ۱۰درجه). در این میان زاویه تماس در محیط کشت به مدت زمان ۱ و ٦ روز به ترتیب مقادیر ۹± ۷۸درجه و ۸±۳۸ درجه بوده است.

مطابق با نمودار ۳، آنالیز آماری واریانس یک طرفه تفاوت معنی دار بین همه گروه‌ها را در ارتباط با زاویه تماس نشان داده است ($P<0.05$) که حاکی از افزایش آبدوستی داربست‌ها با افزایش مدت زمان انکوباسیون در محیط‌کشت بوده است. هر چند، این تفاوت معنی دار بین گروه‌های با مدت پیش انکوباسیون صفر و ۱ روز وجود نداشته است ($P>0.05$).

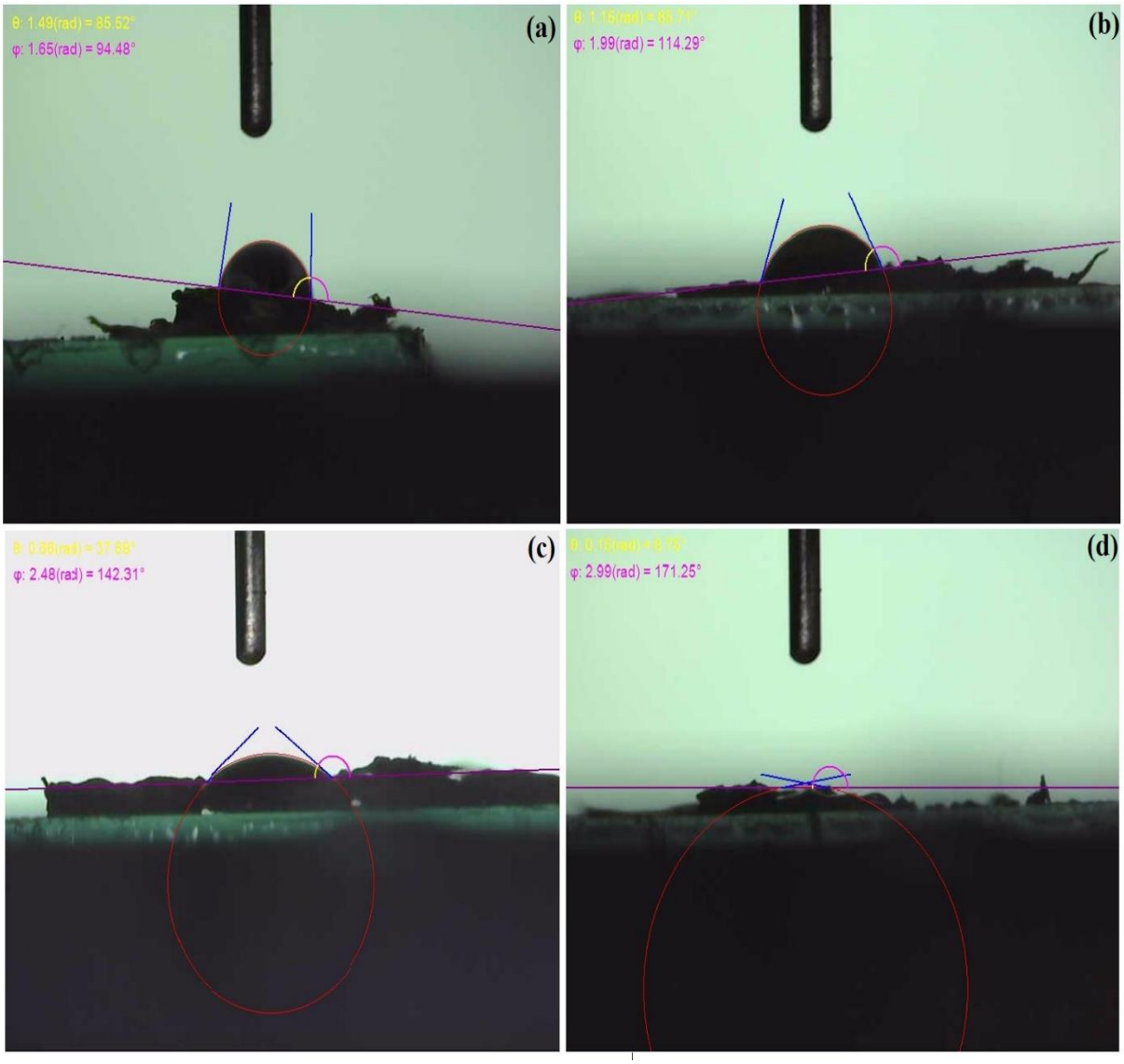
میزان بقا سلول‌ها

درصد بقا سلول‌های مزودرمی مغز استخوان رت بعد از ۲۱ روز کاشت بر روی داربست‌های پیش انکوبه شده در محیط‌کشت (به مدت صفر، ۱ ، ٦ و ۱۰ روز) در نمودار ٤ نشان داده شده است. مطابق با این شکل، بعد از ٦ روز پیش-انکوباسیون داربست‌ها در محیط‌کشت تفاوت معنی دار در درصد بقا سلول‌ها مشاهده شد و بعد از ۱۰ روز این میزان در برخی داده‌ها به بیش از ۱۰۰ درصد رسید که نشان

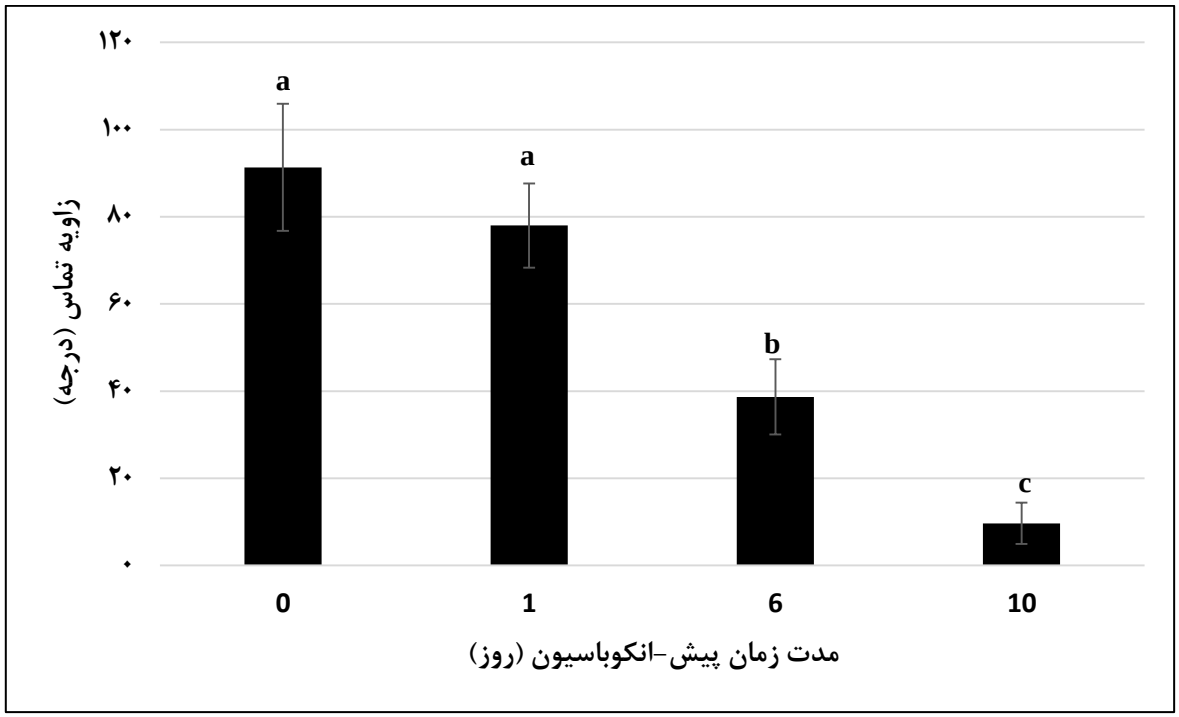
از افزایش بقا با افزایش مدت زمان پیش-انکوباسیون بوده است.

سنجش میزان DNA ژنومی سلول‌های کاشته شده

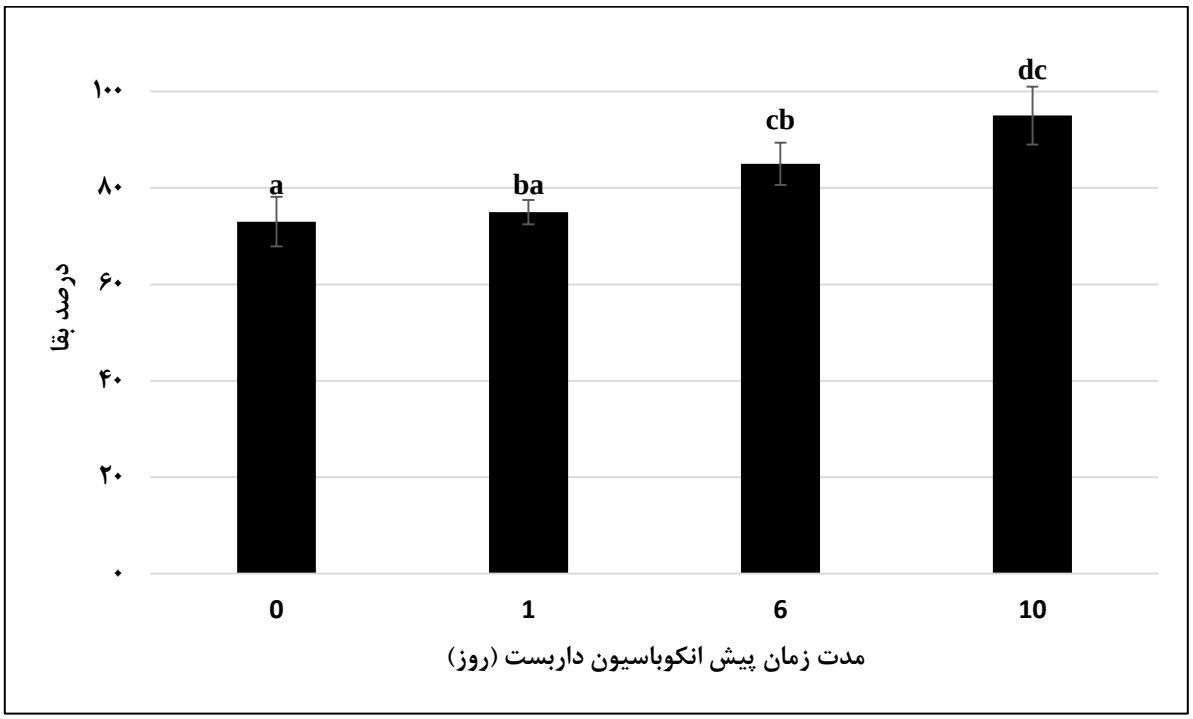
مطابق با نمودار ۵ پیش-انکوباسیون داربست‌ها در محیط کشت طی مدت زمان‌های مختلف تاثیر معنی دار بر غلظت DNA ژنومی سلول‌های کاشته شده داشته است. مقایسه غلظت DNA ژنومی سلول‌های مزودرمی مغز استخوان رت که بر روی داربست‌های پیش انکوبه شده در محیط کشت به مدت یک روز و صفر روز انکوبه شدند نشان داد که تفاوت معنی‌داری در بین این دو مورد وجود داشته است ($P<0.05$). از طرف دیگر، پیش انکوباسیون داربست‌ها در محیط کشت به مدت ٦ و ١٠ روز نیز منجر به تفاوت معنی دار در غلظت DNA سنجش شده بین این دو مورد و موردهای قبلی شده است ($P<0.05$).



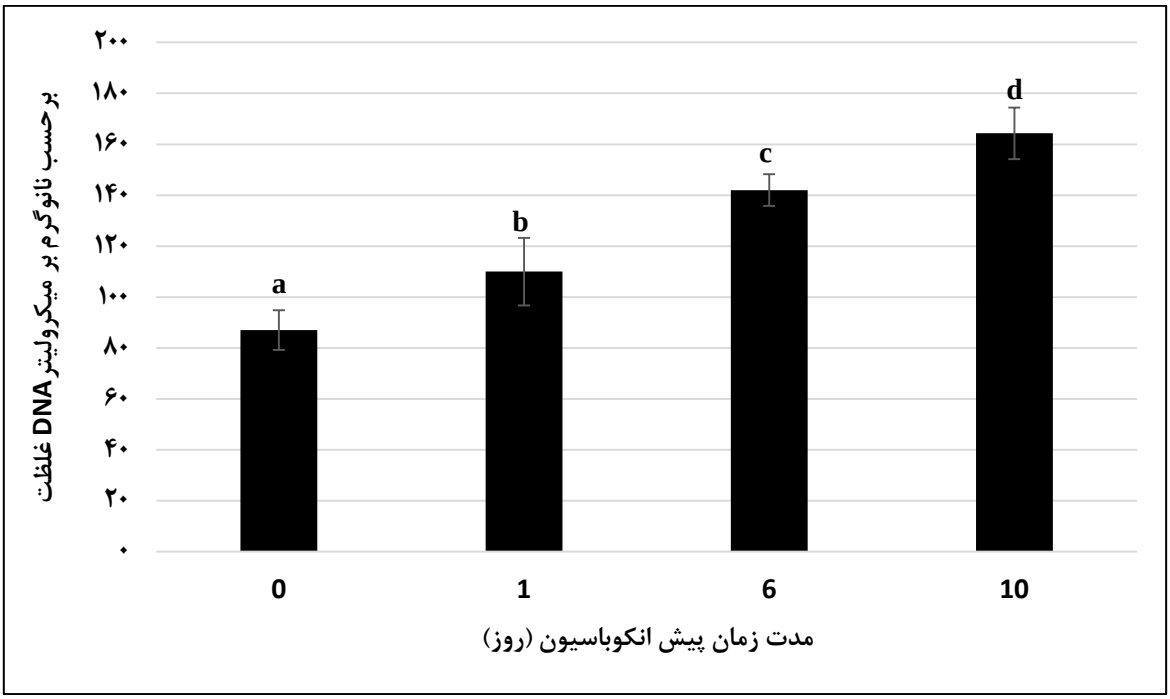
شکل ۲. زاویه تماس آب در داربست‌های مختلف با مدت زمان متفاوت انکوباسیون در محیط کشت شامل a): بدون انکوباسیون در محیط کشت، b): مدت زمان انکوباسیون ١ روز در محیط کشت، c): مدت زمان انکوباسیون ٦ روز، و d) مدت زمان انکوباسیون ١٠ روز.



نمودار ۳. مقایسه زاویه تماس در داربست‌ها با مدت زمان انکوباسیون متفاوت. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار بین گروه هاست (P<0.05).



نمودار ٤. درصد بقا سلول‌های کاشته شده بر روی داربست‌های پیش انکوبه شده در محیط کشت. حروف کوچک یکسان نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار (P>0.05) بین گروه‌ها است.



نمودار ۵. غلظت DNA سنجش شده بوسیله نانودراپ در سلول‌های مغز استخوان کاشته شده بر روی داربست‌های پیش انکوبه شده در مدت زمان‌های مشخص. حروف کوچک یکسان نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار بین گروه هاست (P>0.05).

بحث

مطالعه کنونی نشان داد که پیش انکوباسیون داربست فیبروئینی الکتروریسی شده با الاستیسیته ثابت در محیط‌کشت منجر به افزایش آب دوستی داربست و متعاقبا افزایش تکثیر و بقا سلول‌های مزانشیمی کاشته شده بر روی آن گردید. هدف این آزمایش بررسی تغییر رفتاری بود که یک داربست فیبروئینی الکتروریسی شده بعد از قرار گرفتن در محیط کشت از خود بروز می دهد.

در مطالعات گذشته از پلیمرهای مصنوعی و طبیعی متنوعی برای ساخت داربست در مهندسی بافت استفاده شده است و در مطالعه کنونی از پلیمر طبیعی ابریشم در زمینه غضروف‌زائی به کار گرفته شد. ابریشم قدرت مکانیکی، انعطاف‌پذیری، و زیست سازگاری بالایی داشته [۲۲] و در میان مواد زیستی مورد استفاده در ساخت داربست، پتانسیل بالایی را در ترمیم آسیب‌های غضروفی از خود نشان داده است. مواد فیبروئینی دارای سازگاری زیستی خوب، قابلیت تجزیه زیستی کند و قابل کنترل، و کمترین میزان تحریک سیستم ایمنی را دارا می‌باشند و میتوانند گزینه مناسبی برای مطالعات درون تنی باشند [۲۰]. در این مطالعه از غلظت فیبروئین ۳% وزن/حجم برای ساخت داربست استفاده شده است. مطالعه قبلی ما نشان داده است که در میان غلظت‌های فیبروئین ۵%، ٤/٥%، ٤% و ۳% وزن/حجم، داربست فیبروئینی الکتروریسی شده حاصل از محلول فیبروئین با غلظت ۳% وزن/حجم بهترین تاثیر را بر رشد و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت به کندروسیت داشته است [۲۳].

در این مطالعه از مغز استخوان به عنوان منبع تامین سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده شده است. این اندام بهترین منبع برای تامین سلول‌های بنیادی جهت تمایز به کندروسیت می باشد [۲٤]. سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان در حضور دگزامتازون و TGF- بتا به آسانی به کندروسیت تمایز می یابند که در مطالعه قبلی اخیر ما تمایز این سلول‌ها بر روی داربست فیبروئینی الکتروریسی شده مورد تایید و ارزیابی قرار گرفت [۲۳].

در این مطالعه فرض شده است که مدت زمان‌های مختلف مواجهه داربست‌های فیبروئینی الکتروریسی شده با محیط کشت دارای سرم می‌تواند منجر به تفاوت در میزان جذب پروتئین توسط داربست‌ها گردد و در نتیجه آن بر روی

عملکردهای سلولی مانند تکثیر و اتصال سلولی تاثیر بگذارد. جذب پروتئین توسط مواد زیستی یک رویداد کلیدی می‌باشد که منجر به پاسخ زیستی این مواد می گردد. در مهندسی بافت، پروتئین‌های سرم که توسط داربست‌ها جذب می‌شوند نقش مهمی در تعیین پاسخ سلول‌های کاشته شده بر روی داربست بازی می‌کنند. سرم دارای مقادیری از پروتئین‌های چسبنده و اینتگرینی می‌باشد [۱۷] که در تمایز سلول‌های بنیادی به غضروف حیاتی می باشند.

وقتی مواد زیستی قابل تجزیه مانند فیبروئین ابریشم به درون محیط کشت مایع انتقال داده می‌شوند رویدادهای زیادی ممکن است رخ دهند که می‌توانند منجر به تغییر ویژگی‌های ماده زیستی گردد. جذب آب توسط داربست و متورم شدن آن و جذب سطحی پروتئین از این مثال‌ها و رویدادها می‌باشند که میتوانند بر روی رفتارهای سلول‌های کاشته شده بر روی آن‌ها مانند تکثیر سلولی و اتصال سلولی تاثیر گذار باشند [۲۵]. بنابراین در این آزمایش ما این فرض را مورد ارزیابی قرار دادیم که رفتارهای سلولی به خصوص درصد بقا، تکثیر و چسبندگی سلول به داربست میتوانند تحت تاثیر مدت زمان پیش انکوباسیون داربست (۱-۱۰ روز) در محیط کشت قرار گیرند.

در مطالعه کنونی مشاهده شد که آبدوستی داربست فیبروئینی به شکل کاهش زاویه تماس آب با افزایش زمان پیش انکوباسیون از صفر تا ۱۰ روز افزایش می‌یابد. هرچند، تفاوت معنی‌داری بین آبدوستی داربست‌های پیش تیمار نشده و داربست‌هایی که به مدت ۱ روز در محیط‌کشت تیمار شدند وجود نداشت ($P>0.05$). از طرف دیگر، در مطالعه حاضر از سنجش غلظت DNA به عنوان یک ارزیابی کمی به منظور شمارش تعداد سلول‌های چسبیده به داربست استفاده شده است چرا که میزان DNA به طور مستقیم متناسب با تعداد سلول می‌باشد [۱۷]. نتایج سنجش غلظت DNA نشان داد که این دو گروه اخیر (داربست‌های پیش تیمار نشده و داربست‌هایی که به مدت ۱ روز در محیط‌کشت تیمار شدند) به‌همراه دو گروه دیگر (داربست‌های پیش-انکوبه شده در محیط‌کشت به مدت ٦ و ۱۰ روز) دارای تفاوت معنی‌دار از نظر تعداد سلول‌های چسبیده به داربست بودند ($P<0.05$). با مقایسه نمودار زاویه تماس آب (آبدوستی) و نمودار غلظت DNA در پیش انکوباسیون‌های صفر و یک روز مشخص می‌گردد که اتصال سلول به داربست از خاصیت آبدوستی داربست پیروی نمی‌کند. هر چند، وجود تفاوت معنی‌دار بین پیش-انکوباسیون‌های ۱، ٦، و ۷ روز خلاف این امر را نشان می دهد همچنانکه مطالعات قبلی ذیل تایید کننده این مورد است.

مطالعه قبلی که در آن از پیش انکوباسیون داربست‌های پلی‌کاپرولاکتونی اسفنجی در محیط‌کشت استفاده شده است نشان داد که بین داربست‌های پیش انکوبه شده در محیط‌کشت به مدت ۵ دقیقه، ۱ روز، و ۷ روز تفاوت معنی‌دار از نظر غلظت DNA وجود داشته است که مشابه با نتایج مطالعه کنونی می‌باشد. از طرف دیگر، پیش انکوباسیون داربست‌ها به مدت ۵ دقیقه و ۱ روز تاثیر معنی دار بر روی میزان جذب پروتئین توسط داربست داشته است اما این تفاوت بین داربست‌های پیش انکوبه شده به مدت ۱ و ۷ روز معنی‌دار نبود [۱۷] (در مطالعه کنونی به دلیل ساختار پروتئینی داربست، میزان جذب پروتئین اندازه گیری نشده است). به عبارت دیگر، وقتی داربست‌ها در محیط‌کشت به مدت طولانی پیش انکوبه می شوند (بیش از یک روز)، میزان پروتئین‌های جذب شده تغییر نمی‌کند [۱۷]. در همان مطالعه، پیش انکوباسیون سطح شیشه ای (غیر قابل تجزیه و فاقد توانایی جذب آب) در محیط کشت برای ۷ روز، اتصال سلولی را افزایش نداد. این مشاهدات منجر به این پیشنهاد می گردد که میزان پروتئین جذب شده، ترکیب و انطباق پذیری آن دلیل افزایش چسبندگی و سرعت تکثیر نمی باشد بلکه انکوباسیون طولانی مدت مواد زیستی در محیط کشت باعث افزایش آبدوستی از نظر زوایه تماس آب می‌گردد که بر روی رفتارهای سلول در تکثیر و چسبندگی تاثیر گذار است. این نتیجه‌گیری در مطالعه امیری کیا و همکاران (۲۰۱۷) که به بررسی تاثیر پیش تیمار داربست فیبروئینی اسفنجی در محیط کشت بر روی تکثیر و اتصال سلول‌های بنیادی پاپیلای دندانی پرداختند نیز ارائه شد [١٤].

آبدوستی بیشتر پلیمرها منجر به جذب بیشتر پروتئین از محیط کشت می شود [۲۵]. بنابراین تفاوت هایی که در بقا و تکثیر سلول بین داربست‌های پیش انکوبه شده به مدت صفر، ۱، ٦ و ۱۰ روز مشاهده گردید میتواند به تغییرات در آبدوستی داربست فیبروئینی نسبت داده شود. در نتیجه، آبدوستی ممکن است دلیلی بر افزایش اتصال و تکثیر سلولی باشد.

نتیجه‌گیری

به طور کلی، مطالعه کنونی نشان داد که پیش – انکوباسیون داربست فیبروئینی الکتروریسی شده با الاستیسیته ثابت در محیط کشت منجر به افزایش آب دوستی داربست و متعاقبا افزایش تکثیر و بقا سلول‌های کاشته شده بر روی آن گردید که از این یافته میتوان به عنوان یک فاکتور موثر در آماده سازی کاشت سلول‌ها غضروفی بر روی داربست به منظور استفاده در مهندسی بافت غضروف باشد.

قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می دانند که از پرسنل مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بابل به خاطر همکاری که در انجام این تحقیق به عمل آوردند تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

[1] Zhongyi Zhao, Changjiang Fan, Feng Chen, Yutai Sun, Yujun Xia , Aiyu Ji, Dong-An Wang.2020. Progress in articular cartilage tissue engineering: a review on therapeutic cells and macromolecular scaffolds. Macromolecular bioscience, 20(2): p. 1900278.

[2] Yufeng Zhang, WeiFan, Zhaocheng Ma, Chengtie Wu, WeiFang, GangLiu, YinXiao. 2010. The effects of pore architecture in silk fibroin scaffolds on the growth and differentiation of mesenchymal stem cells expressing BMP7. Acta biomaterialia, 6(8): p. 3021-3028.

[3] Sajedeh Khorshidi , Atefeh Solouk, Hamid Mirzadeh, Saeedeh Mazinani, Jose M Lagaron, Shahriar Sharifi, Seeram Ramakrishna. 2016. A review of key challenges of electrospun scaffolds for tissue-engineering applications. Journal of tissue engineering and regenerative medicine, 10(9): p. 715-738.

[4] Indong Jun, Hyung-Seop Han, James R Edwards, Hojeong Jeon. 2018. Electrospun fibrous scaffolds for tissue engineering: Viewpoints on architecture and fabrication. International journal of molecular sciences, 19(3): p .745.

[5] Tan, G.Z. and Y. Zhou. 2020. Electrospinning of biomimetic fibrous scaffolds for tissue engineering: a review. International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, 69(15): p. 947-960.

[6] Andrea Toffoli, Ludovica Parisi, Massimiliano G Bianchi , Simone Lumetti, Ovidio Bussolati, Guido M Macaluso. 2020. Thermal treatment to increase titanium wettability induces selective proteins adsorption from blood serum thus affecting osteoblasts adhesion. Materials Science and Engineering: C, 107: p. 110250.

[7] Cameron J Wilson, Richard E Clegg, David I Leavesley, Mark J Pearcy. 2005. Mediation of biomaterial–cell interactions by adsorbed proteins: a review. Tissue engineering, 11(1-2): p. 1-18.

[8] Hayrapetyan, L. and N. Sarvazyan. 2020. Extracellular Matrix and Adhesion Molecules, in Tissue Engineering, Springer. p. 29-38.

[9] Mischa Zelzer, Darren Albutt, Morgan R. Alexander, Noah A. Russell. 2012. The role of albumin and fibronectin in the adhesion of fibroblasts to plasma polymer surfaces. Plasma Processes and Polymers, 9(2): p. 149-156.

[10] Noh, H. and E. A. Vogler. 2007. Volumetric interpretation of protein adsorption: competition from mixtures and the Vroman effect. Biomaterials, 28(3): p. 405-422.

[11] Schmidt, D. R., H. Waldeck, and W. J. Kao. 2009. Protein adsorption to biomaterials, in Biological interactions on materials surfaces, Springer. p. 1-18.

[12] Eda D Yildirim, Robyn Besunder, Daphne Pappas, Fred Allen, Selçuk Güçeri and Wei Sun. 2010. Accelerated differentiation of osteoblast cells on polycaprolactone scaffolds driven by a combined effect of protein coating and plasma modification. Biofabrication, 2(1): p. 014109.

[13] Kyung MiWoo, Jihye Seo, Ruiyun Zhang, Peter X. Ma. 2007. Suppression of apoptosis by enhanced protein adsorption on polymer/hydroxyapatite composite scaffolds. Biomaterials, 28(16): p. 2622-2630.

[14] Mehdi Amirikia, Seyed Mohammad Ali Shariatzadeh, Seyed Gholam Ali Jorsaraei, Malek Soleimani Mehranjani. 2017. Impact of pre-incubation time of silk fibroin scaffolds in culture medium on cell proliferation and attachment. Tissue and Cell, 49(6): p. 657-663.

[15] Alicja Kosik-Kozioł, Elizabeth Graham, Jakub Jaroszewicz, Adrian Chlanda, P. T. Sudheesh Kumar,Saso Ivanovski, Wojciech Święszkowski, Cedryck Vaquette. 2018. Surface modification of 3D printed polycaprolactone constructs via a solvent treatment: impact on physical and osteogenic properties. ACS Biomaterials Science & Engineering, 5(1): p. 318-328.

[16] Ruby I Chen , Nathan D Gallant, Jack R Smith, Matt J Kipper, Carl G Simon Jr. 2008. Time-dependent effects of pre-aging polymer films in cell culture medium on cell adhesion and spreading. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 19(4): p. 1759-1766.

[17] Kaushik Chatterjee, Stevephen Hung, Girish Kumar, Carl G. Simon, Jr. 2012. Time-dependent effects of pre-aging 3D polymer scaffolds in cell culture medium on cell proliferation. Journal of functional biomaterials, 3(2): p. 372-381.

[18] Danielle N Rockwood, Rucsanda C Preda, Tuna Yücel, Xiaoqin Wang, Michael L Lovett, David L Kaplan. 2011. Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin. Nature protocols, 6(10): p. 1612.

[19] Kuihua Zhang, Xiumei Mo, Chen Huang, Chuanglong He, Hongsheng Wang. 2010. Electrospun scaffolds from silk fibroin and their cellular compatibility. Journal of Biomedical Materials Research, 93(3): p. 976-983.

[20] Bhardwaj, N. and S. C. Kundu. 2012. Chondrogenic differentiation of rat MSCs on porous scaffolds of silk fibroin/ chitosan blends. Biomaterials, 33(10): p. 2848-2857.

[21] Anggraini Barlian, Hermawan Judawisastra, Nayla M Alfarafisa, Untung A Wibowo, Imam Rosadi. 2018. Chondrogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells induced by L-ascorbic acid and platelet rich plasma on silk fibroin scaffold. PeerJ, 6: p. e5809.

[22] Yu Qi , Hui Wang , Kai Wei , Ya Yang, Ru-Yue Zheng , Ick Soo Kim , Ke-Qin Zhang. 2017. A review of structure construction of silk fibroin biomaterials from single structures to multi-level structures. International journal of molecular sciences, 18(3): p. 237.

[23] Janitermi, M., S. G. A. Jorsarai, and E. Fattahi. 2021. Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Rat Bone Marrow on the Elastic Modulus of Electrospun Silk Fibroin Scaffolds. Regenerative Engineering and Translational Medicine, p. 1-9.

[24] Da-Wei Li, Jin He, Feng-Li He, Ya-Li Liu, Yang-Yang Liu, Ya-Jing Ye, Xudong Deng, Da-Chuan Y. 2018. Silk fibroin/ chitosan thin film promotes osteogenic and adipogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Journal of biomaterials applications, 32(9): p. 1164-1173.

[25] Wei J, Igarashi T, Okumori N, Igarashi T, Maetani T, Liu B, Yoshinari M. 2009. Influence of surface wettability on competitive protein adsorption and initial attachment of osteoblasts. Biomedical Materials, 4(4): p. 045002

Fabrication of electrospun silk fibroin scaffold and the effect of its pre-incubation in culture medium on survival and adhesion of rat bone marrow mesenchymal cells

Janitermi M.[1], Fattahi E.[1*], Ali Jorsarai S. Gh.[2]

[1] Department of Biology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran
[2] Fatemeh Zahra Infertility and Reproductive Health Research Centre, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

*Email: Esmail_fattahy@yahoo.com

Received: March 2021 Accepted: July. 2021

Abstract

This study was performed to synthesize electrospun silk fibroin scaffold and to investigate the time-dependent effect of its pre-incubation in culture medium on the adhesion and proliferation of cells seeded on the scaffold. sericin was removed from silk cocoon and fibrin solution (3% w/v) was prepared using formic acid. Then, electrospun silk fibroin scaffold was made using lab-scale electrospinning machine and evaluated by scanning electron microscopy. Pre-incubation of scaffolds in culture medium was performed for 0, 1, 6, and 10 days and the hydrophilicity of scaffolds were evaluated by measuring the water contact angle. Rat bone marrow mesenchymal cells were then isolated, cultured, and seeded on scaffolds. After 21 days of cell seeding, cell viability (MTT method) and genomic DNA concentration of cells attached to the scaffold were evaluated. The results showed that increasing the pre-incubation time in the culture medium decreased the water contact angle and increased the survival and proliferation of cells. In general, the present study showed that pre-incubation of electrospun fibroin scaffold with constant elasticity in culture medium leads to increased scaffold hydrophilicity and consequently increases the proliferation and survival of mesenchymal cells seeded on it. Conclusion: these findings can be used as an effective factor in seeding cartilage cell on scaffolds in tissue engineering.

Keywords: Electrospinning, Scaffold, Fibroin, Cell culture.