ORIGINAL ARTICLE

Characterization of Bone Marrow Stromal Cell Growth on Substrate PLGA nanofibers

Davod Zolfagari[1],
Gholamreza Kaka[2],
Sadraee Seyyed Homayoon Sadraee[3],
Gholamreza Herfehdoost[4]

[1] Master of Nanotechnology, Department of Neurosince Research Center, Researcher, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Associate Professor, Department of Neurosince, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3] Associate Professor, Department of Anatomi, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received March 16, 2014 ; Accepted September 27, 2014)

Abstract

Background and purpose: Properties of biocompatibility and biodegradation are important factors in choosing a polymer to prepare nano-fiber for medical and biological purposes. PLGA high attention in tissue engineering for the above properties, the aim of present study is the evaluation of rat bone marrow stromal cells cultured on PLGA nanofibers.

Material and methods: In this study, the PLGA nanofibers were prepared using electrospinning technique in hexa fluoro propanol solvent. To study the nanofiber properties scanning electron microscopy (SEM) and invert microscope were used. After bone marrow stromal cells culture (BMSCs) and achieving passage two, the cells were grown in two groups of PLGA nanofibers and without nanofibers. Life and death of cells were examined in second, fourth, and sixth days by Acridine Orange. Also, the morphology of cells was investigated via light microscopy.

Results: The results showed no significant reduction in cell growth in PLGA nanofibers compared with that of the control group.

Conclusion: According to the results obtained from BMSCc culture, PLGA nanofibers could be used as biodegradable and biocompatible scaffold alongside bone marrow cells in tissue engineering.

Keywords: Nano fiber, PLGA, bone marrow stromal cells, tissue engineering, cell culture

J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 24(117): 65-73 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۱۷ مهر سال ۱۳۹۳ (۷۳-۶۵)

بررسی خصوصیات و میزان رشد سلول هایاسترومایی مغز استخوان رتروی بستر نانو الیاف پلیمر پلی لاکتید کو پلی گلیکولید

داود زوالفقاری[۱]
غلامرضا کاکا[۲]
سید همایون صدرایی[۳]
غلامرضا حرفه دوست[۴]

چکیده

سابقه و هدف: مهم‌ترین فاکتور در انتخاب پلیمر جهت تهیه نانو فیبر برای استفاده در مقاصد پزشکی و بیولوژی ویژگی‌های زیست سازگاری و زیست تخریب‌پذیری است. پلیمر پلی لاکتیدکوپلی گلیکولید ((poly (lactic-*co*-glycolic acidPLGA) به‌خاطر مزایای فوق و نیز توجه بسیار در امر مهندسی بافت مورد توجه قرار گرفت، و در تحقیق اخیر کشت سلول های استرومایی مغز استخوان بر روی نانو الیاف PLGA مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ابتدا به روش الکتروریسی نانو الیاف PLGA در حلال هگزا فلورو بیس پروپانول تهیه شد. ویژگی‌های این پلیمر با روش میکروسکوپ الکترونی روبشی و میکروسکوپ اینورت مورد بررسی قرار گرفت. پس از استحصال سلول‌ها و رسیدن به پاساژ دو، سلول‌ها دردو گروه روی بستر بدون نانو الیاف و بستر حاوی نانو الیاف PLGA کشت داده شدند. حیات و مرگ سلول‌ها در روزهای دوم، چهارم و ششم توسط رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج و مورفولوژی سلول‌ها روی بستر نانو الیاف به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج رشد سلول‌ها روی بستر نانو الیاف PLGA در مقایسه با رشد سلول در محیط کشت از لحاظ میزان رشد و مورفولوژی اختلافی نداشتند.

استنتاج: با توجه به بررسی نتایج حاصل ازکشت سلول‌های مغز استخوان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که از نانو الیاف PLGA می‌توان به عنوان داربستی زیست تخریب‌پذیر و زیست سازگار به همراه سلول‌های مغز استخوان در امر مهندسی بافت بهره گرفت.

واژه های کلیدی: نانوالیاف PLGA، سلول‌های استرومایی مغز استخوان، مهندسی بافت، کشت سلول

مقدمه

ساخت داربست زیست تخریب‌پذیر مناسب برای کشت سلول یکی از مهم‌ترین پارامترهای مهندسی بافت می‌باشد. یک داربست خوب باید بتواند ساختار فیزیکی و شیمیایی ماتریکس خارج سلولی که شبکه‌ای متخلخل از انواع فیبرها و پروتئین‌ها است را شبیه‌سازی نماید(۱). در این میان سنتز نانوالیاف با استفاده از تکنیک

مولف مسئول: غلامرضا حرفه دوست– تهران: دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، مرکز علوم اعصاب E-mail: nanodrug85@yahoo.com
۱. کارشناسی ارشد نانوتکنولوژی، گروه علوم اعصاب، پژوهشگاه، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران
۲. دانشیار، گروه علوم اعصاب، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران
۳. دانشیار، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۲/۱۲/۲۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۳/۱۹ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۷/۵

الکتروریسی به علت ویژگی‌های خوب آن نظیر افزایش سطح تماس، انعطاف، تخلخل (اندازه‌های نانومتری تا چند میکرون) می‌تواند جایگزین مناسبی برای ماتریکس خارج سلولی باشد(۴-۲).

یکی از مهمترین مواد برای این منظور استفاده از پلی استر پلی لاکتید کو پلی گلیکولید (PLGA poly(lactic-*co*-glycolic acid)) است که مورد تائید اداره دارو و غذا (Food And Drug Administration FDA) است(۵). این ماده کوپلیمری از دو پلیمر پلی لاکتیک اسید و پلی گلیکولیک اسید تشکیل شده که ازاین دو پلیمر نیز به‌عنوان داربست در مهندسی بافت به تنهایی یا به‌صورت ترکیب با سایر مواد استفاده می‌شود(۶).

PLGA علاوه بر استفاده به عنوان داربست در مهندسی بافت، در دارو رسانی و ساخت کانال‌های راهنمای عصبی استفاده می‌شود. این ماده دارای خصوصیاتی نظیر زیست سازگاری و زیست تخریب‌پذیری بوده و می‌تواند بر اساس نسبت پلی لاکتیک اسید به پلی گلیکولیک اسید از چند هفته تا چند سال زمان تخریب‌پذیری آن را کنترل کرد(۱۰-۷). این ماده در بدن به آرامی هیدرولیز، تخریب و به مونومرهای سازنده خود شکسته و در نهایت از طریق چرخه کربس به‌صورت کربن دی اکسید و آب دفع می‌شود.

از سلول‌های استرومایی مغز استخوان در کلینیک و جهت درمان بیماری‌ها و ضایعات وارد بر ارگان‌های مختلف بدن استفاده می‌شود. برای به دست آوردن بهترین نتیجه از عمل پیوند، سلول مورد استفاده جهت پیوند، باید دارای مجموعه‌ای از ویژگی‌ها باشد. از جمله، سلول ایده‌آل باید به سادگی به دست آید، قادر به گسترش سریع در محیط کشت باشد، از نظر ایمونولوژی خنثی یا هماهنگ با بافت گیرنده بوده قادر به بقای طولانی مدت و سازگاری در بافت میزبان باشد. با توجه به مجموع این خصوصیات، به نظر می‌رسد سلول‌های Bone marrow stromal cells (BMSCs) (سلول‌های بنیادی استخراج شده از بند ناف)، گزینه‌ای مناسب برای پیوند باشند. در هر صورت کاربرد سلول‌های BMSCs به تنهایی در درمان به عنوان جایگزینی مناسب در آسیب‌های مختلف پوستی، استخوانی و تروماتیک موفقیت کامل نداشته است(۱۲،۱۱). از طرفی استفاده از تکنولوژی نوین نانو داربست‌های ذکر شده فوق نیز به تنهایی موفق نبوده است. پروتکل‌های موجود مشکلاتی چون سمیت ناشی از ایجاد الیاف روی فویل آلومینیومی جهت کار در کشت سلولی و نیز سمیت ناشی از موادی که برای بهینه کردن تهیه نانو الیاف بایستی اضافه می‌گردید (گلوتارالدئید)، دارند و از طرفی کار تثبیت نانو الیاف در کف پلیت مشکلاتی مضاعف بود. لذا هدف از مطالعه حاضر ارایه داربستی از نانوالیاف توسط مواد زیست سازگاری مانند PLGA به همراه سلول‌های BMSCs است که کم‌ترین مرگ و میر سلولی، کم‌ترین تمایز و مناسب‌ترین تداخل سلولی با نانوالیاف را داشته باشد و بتوان از آن به عنوان روشی جایگزین در درمان انواع و اقسام آسیب‌های پوستی، استخوانی، تروماتیک و ... استفاده کرد. علت انجام این مرحله از تحقیق طراحی داربستی زیست سازگار و زیست تخریب‌پذیر می‌باشد تا در مراحل بعدی کار اقدام به لود کردن انواع دارو و مواد مورد نیاز برای رشد سلول به آن کرد.

مواد و روش‌ها

PLGA با نسبت مولی لاکتید به گلیکولید ۲۵ به ۲۵ با وزن مولکولی ۶۶۰۰۰ تا ۱۰۷۰۰۰ تهیه شد. هگزا فلورو بیس پروپانول به عنوان حلال PLGA (شرکت سیگما)، پودر ژلاتین، تریپسین ۰/۲۵ درصد، اتیلن دی ترا آمین (EDTA) ۰/۰۴درصد، رنگ‌ها (شرکت مرک آلمان)، کتامین و زایلازین (شرکت آلفاسن هلند)، سرم و محیط کشت α-MEM (شرکت جیبکوی انگلیس) تهیه شدند. موش‌های صحرایی (رت) نر بالغ ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرمی (۸ هفته‌ای) جهت استخراج سلول‌های BMSCs از آزمایشگاه حیوانات مرکز تحقیقات علوم اعصاب

دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) تهیه گردید. همه آزمایشات و عمل‌های انجام شده براساس قوانین حمایت ازحیوانات آزمایشگاهی که مصوب دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) بوده است، انجام گردید.

الکتروریسی

پلیمر PLGA با نسبت ۷ درصد وزنی در حلال هگزافلوروبیس پروپانول به‌مدت یک شب توسط همزن مغناطیسی حل شد و در یک سرنگ ۵ میلی‌لیتر ریخته شد. سپس توسط سر سوزن شماره ۱۸ در فاصله ۱۵ سانتی‌متری جمع‌کننده در دستگاه الکتروریسی(شرکت فناورسان ایران) قرار داده شد. نانو الیاف با استفاده از ولتاژ ۲۰ کیلووات با میزان تزریق یک میلی‌لیتر در ساعت تهیه گردید. شکل و میانگین قطر نانوالیاف حاصل از روند الکتروریسی با استفاده از دستگاه SEM (هیتاچی ژاپن) تعیین شد(۱۳).

تهیّه تصاویر با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

برای تهیه SEM از نانوالیاف، ابتدا یک بخش کوچک از شبکه نانوالیاف الکتروریسی شده روی پایه نگهدارنده نمونه قرار داده شد. سپس با دستگاه لایه نشانی طلا، نمونه با طلا روکش گردید. نمونه‌ها در محل مربوطه دستگاه قرار گرفته و تصاویر با بزرگنمایی‌های مختلف تهیه شد. این کار سه بار به صورت متناوب انجام شد و در نهایت با بزرگنمایی ۲۷۰۰ برابر حداقل ۳ تصویر از قسمت‌های مختلف نمونه تهیه شد. با استفاده از نرم‌افزار هیستولب و کالیبراسیون آن حداقل ۱۸ اندازه‌گیری از ضخامت نانو الیاف انجام شد.

استخراج و کشت سلول‌های BMSCs

سلول‌های BMSCs از استخوان‌های ران و درشت نی موش صحرائی بالغ نژاد ویستار استخراج گردید. در شرایط کاملا استریل برای بی هوش کردن حیوان از مخلوط ۵۰mg/kg کتامین و ۵mg/kg زایلازین استفاده شد و به شکل داخل صفاقی تزریق شد(۱۴). موهای سطح خارجی ران تراشیده شد سپس اندام خلفی حیوان به طور کامل ضد عفونی گردید. برای جلوگیری از آلودگی با میکروب‌ها دو عدد چراغ الکلی روشن در طرفین محل جراحی قرار گرفت. پس از خارج کردن استخوان ران حیوان، در زیر هود و تحت شرایط استریل توسط محلول PBS شستشو شد و با قیچی استخوان نصف شد و با استفاده از یک سرنگ حاوی یک میلی لیتر محیط کشت α-MEM، مغز استخوان از داخل کانال استخوان کشیده شد. محتوی داخل سرنگ در زیر هود در فلاسک مخصوص کشت سلولی حاوی محیط کشت α-MEM، ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/ استرپتومایسین و ۱۰ درصد fetus bovine serum (FBS) ریخته و سپس در انکوباتور CO2 (MMM/ انگلیس) قرار گرفت. پس از گذشت ۲۴ ساعت محیط کشت سلولی با محلول PBS استریل شستشو و با محیط تازه تعویض شد. هنگامی که تراکم سلول‌های چسبیده به کف فلاسک به ۷۰ تا ۸۰ درصد رسید، سلول‌ها توسط تریپسین ۰/۲۵ درصد و EDTA ۰/۰۴ درصد پاساژ داده شدند. این عمل دو بار ادامه یافت، در این شرایط سلول‌ها از مورفولوژی دوکی شکل یکسانی برخوردار شدند(۱۵).

تثبیت نانوفیبرها درکف پلیت محیط کشت

برای تثبیت ابتدا PBS به کف پلیت ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد سپس نانو الیاف با الکل استریل شده و زیر اشعه فرابنفش قرار داده شد و به کمک لیزین به کف پلیت تثبیت شد. هنگام استریل با الکل ۷۰ درصد الیاف از فویل آلومینیمی کنده شده و به ته پلیت با کمک لیزین چسبید و سپس الکل اضافه شد. جمع شدگی شدیدی در داربست به‌وجود آمد به نحوی که مساحت آن تا یک پنجم مساحت داربست اولیه کاهش یافت. در حالی که اضافه کردن الکل روی الیاف قبل از جداسازی آن از فویل آلومینیمی از این کاهش مساحت داربست جلوگیری نمود.

کشت سلول‌های BMSCs روی نانو الیاف PLGA

تعداد ۵×۱۰۳ سلول به هر کدام از خانه‌های پلیت ۱۲ خانه‌ای اضافه شد و سپس در انکوباتور CO2 (۵ درصد) و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. برای بررسی میزان رشد و تکثیر سلول‌ها، هر کدام از خانه‌ها در روزهای دوم، چهارم و ششم با میکروسکوب اینورت فلورسنس (Leica آلمان) مشاهده و توسط دوربین دیجیتال متصل به میکروسکوپ (Infinity/ کانادا) با بزرگنمایی‌های مختلف عکس گرفته شد.

بررسی میزان زنده بودن سلول های BMSCs

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

بررسی مرگ سلولی

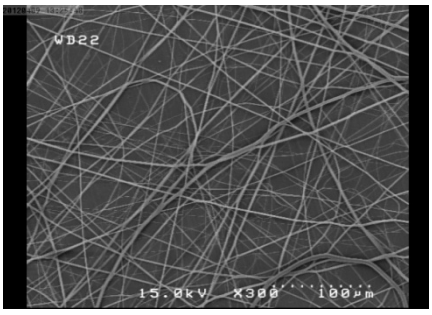
در پایان روز ششم جهت تعیین مرگ سلولی از ماده فلورسنت آکریدین اورنج استفاده شد. برای این منظور، ۱۰۰ میکرولیتر از رنگ آکریدین اورنج (۲µg/ml) به هر کدام از خانه‌های مورد نظر اضافه شد و در زیر میکروسکوپ فلوروسنت با فیلتر آبی با طول موج ۴۶۰ تا ۴۹۰ نانومتر، ۱۰۰ عدد از سلول‌ها شمارش شدند و با دوربین دیجیتال عکسی با مساحت ۲۵۷/۰۰۰ میکرومتر مربع گرفته شد. سلول‌های با هسته نارنجی یا قرمز به عنوان سلول‌های در حال مرگ و سلول‌های با هسته سبز به عنوان سلول‌های زنده در نظر گرفته شدند و شمارش برای ۵ بار تکرار و میانگین در نظر گرفته شد.

یافته ها

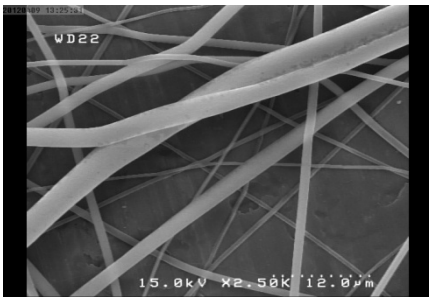
بررسی SEM

نانو الیاف PLGA الکتروریسی شده با ضخامت‌های مختلف در چند طبقه در جهات مختلف به صورت متخلخل شکل گرفته بودند. در عکس‌برداری SEM از نانو الیاف توسط میکروسکوپ الکترونی قطر این الیاف بین ۱۰۰ تا ۲۷۰ نانومتر تخمین زده شد. برای بررسی قطر نانو الیاف از نرم افزار Image J استفاده شد. به دین صورت که از لایه‌های الیاف، ۱۰۰ الیاف گوناگون اندازه‌گیری شده و میانگین آن ارائه شده است.

A



B

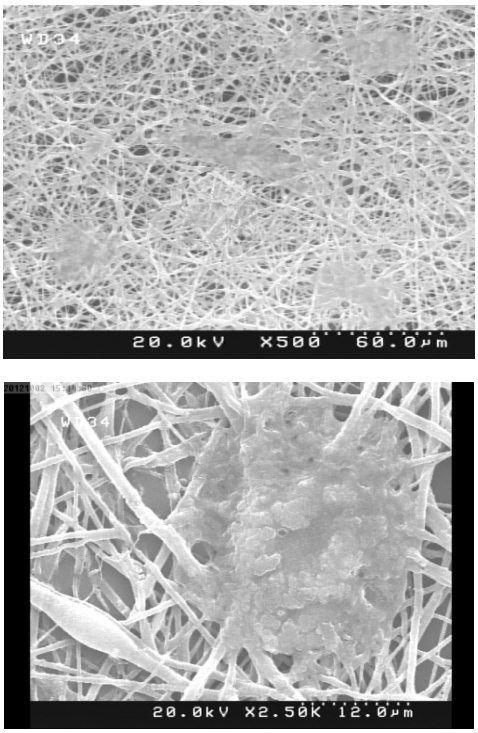


تصویر شماره ۱: تصاویر گرفته شده از نانو الیاف PLGAتوسط میکروسکوپ الکترونی بابزرگنمایی ۳۰۰برابر (A) و بزرگنمایی ۲۵۰۰برابر (B) نشان داده است.

تکثیر سلول‌های BMSCs روی نانوالیاف

در پایان روز ششم پس از فیکس کردن سلول‌ها، نمونه‌ها در دمای اتاق خشک شدند. نمونه‌های نانوالیاف در روزهای دوم و ششم با میکروسکوپ الکترونی نشان داد که نانوالیاف تا روز دوم ساختار خود را حفظ کرده و میزان تخریب آن ناچیز بوده است و اینترکشن مناسبی با سلول دارد اما در پایان روز ششم تکثیر سلول‌ها به قدری

بـود کـه سـلول‌هـا کـاملا بهـم چسـبیدند و کـل سـطح نانوالیاف را پوشاندند. درتصویربرداری SEM ازگروه‌های نانو الیاف تفاوتی در مورفولوژی سلول‌ها مشـاهده نشـد. مورفولوژی سلول‌ها به صورت پهـن بـا زوائـد متعـدد در لابه لای الیاف رشد کرده و به آن‌ها چسبیده بودند.

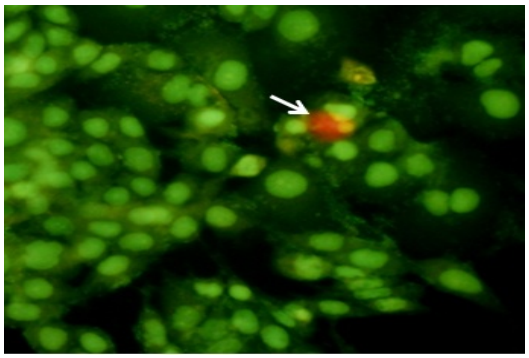


تصویر شماره ۲: تصویر میکروسکوپ الکترونی، کشـت سـلول‌هـای BMSCs روی نانو الیاف PLGA در روز ششم

سلول‌هـای مغـز اسـتخوان روی نـانو الیـاف PLGA گسترده و رشد کرده اند. در دو بزرگنمائی ۵۰۰ و ۲۵۰۰ برابر نشان داده شده است. (پلیمر مورد استفاده برای تهیه نانو الیـاف PLGA مـی باشـد و سـلول‌هـا روی آن رشـد کرده است).

بررسی زنده بودن سلول‌های BMSCs

سلول‌های با هسته سبز و سیتوپلاسم قرمز یا نارنجی، سلول‌های در حال مرگ و سلول‌های با هسته و سیتوپلاسم کاملا سبز سلول‌های زنـده مـی‌باشـند. همـان‌طورکـه در تصاویر مشخص است اکثریت سلول‌ها پس از شش روز زنده بودند و درصد بسیارکمی از سلول‌هـا دچـار مـرگ سلولی شده‌اند.



تصویر شماره ۳: رنگ‌آمیزی آکریدین اورنـج از سـلول‌هـای BMSCs در روز ششم است که سلول‌ها زنده به رنگ سبز و سلول‌های در حال مرگ که سیتوپلاسم آن‌ها به رنگ نارنجی یا قرمز دیده می‌شود.

جدول شماره ۱: درصد سلول‌های زنده در روزهـای دوم، چهـارم و ششم، درچندین میدان مختلف تعـداد سـلول‌هـای مـرده و زنـده در ۱۰۰ عدد شمارش و میانگین گرفته شد.

گروه ها	درصد سلولهای زنده در روز دوم	درصد سلولهای زنده در روز چهارم	درصد سلولهای زنده در روز ششم
شاهد (Cont.)	۹۳/۲ ± ۱/۰	۹۵/۲ ± ۱/۵	۹۷/۴ ± ۲/۴
با نانوالیاف	۹۰/۸ ± ۱/۷	۹۳/۶ ± ۱/۴	۹۴۳/۶ ± ۳/۰

بحث

تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان‌دهنـده وجـود الیاف با قطر بین ۱۰۰ تا ۲۷۰ نانومتر و با تخلخل بالا بـود که به خوبی توانسته بـود الیـاف ماننـد مـاتریکس خـارج سلولی را برای سلول شبیه سـازی نمـوده و چسـبندگی و اتصال مناسبی با سلول‌ها داشته باشـدکه نتـایج حاصـل از رشـد سـلول‌هـا روی آن و نیـز نتـایج حاصـل از تعـداد سلول‌های زنده موئید آن است.

از نکات ضروری ساخت داربسـت‌هـا در مهندسـی بافت آن است که ساختار تهیـه شـده بایـد شـبیه سـاختار طبیعی ماتریکس خارج سلولی باشـد. مـاتریکس خـارج سلولی طبیعی نه تنها یک ساختار فیزیکی بـرای حمایـت سلول ایجاد می‌کنـد، بلکـه موجـب ایجـاد یـک شـرایط خاص حاوی اتصال اختصاصـی بـرای سـلول، مهـاجرت مواد درون سلولی و خارج سلولی، تنظیم تکثیر سلولی و فاکتورهای رشد مختلف می‌گردد.

با توجه به این‌که در دسـتگاه الکتروریسـی از فویـل آلومینیومی استفاده شد در ادامه کـار بایـد نـانو الیـاف از

فویل جدا گردد که جداسازی آن به سختی مقدور بود و از طرفی در محیط کشت سلولی ایجاد سمیت سلولی می‌کرد لذا در تحقیق اخیر به جای فویل آلومینیومی از غشاء کیتوسان به عنوان بستری برای تهیه نانو الیاف بر روی آن استفاده گردیدکه انتقال و تثبیت آن در کف پلیت راحت بوده و سمیتی برای رشد سلول‌ها نداشت.

در آزمایشی که توسط Chengdu و همکارانش انجام شد، نشان داده شد که داربست‌های نانوفیبری به‌وسیله یک مجموعه عظیمی از سوراخ‌های ریز، محیط مناسب برای اتصال و تکثیر سلول است(۱۶). این گروه در مطالعه دیگری نشان دادندکه امکان تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادین مزانشیمی مغز استخوان انسانی به سمت هپاتوسیت‌ها روی نانو داربستی متشکل از پلی کاپرولاکتون، کلاژن و پلی اترسولفون وجود دارد و داربست مذکور برای این منظور بسیار مناسب بوده است در حالی‌که هدف ما عدم تمایز سلولی و حفظ بنیادی بودن آن‌ها بوده است(۱۷). در تحقیقی که Mengyan و همکاران انجام دادند نشان داده شد که در کشت سلول‌های قلب رت روی نانو الیاف، سلول‌ها در مواجهه با نانو الیاف هم رشد و تکثیر خوبی داشته و هم مورفولوژی خو د را حفظ کرده‌اند(۱۸). برای به دست آوردن سلول‌های استرومایی مغز استخوان بهتر است از موش ۸ هفته به وزن ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم استفاده گردد. رعایت شرایط استریل به ویژه در کشت دادن سلول ضروری است. بعد از کشت سلولی روی نانو الیاف و مقایسه ان با محیط کشت فاقد الیاف تفاوتی از لحاظ میزان رشد ومورفولوژی و نیز سمیتی برای رشد سلول‌ها روی نانو الیاف مشاهده نشد (در صورت سمیت الیاف تهیه شده، رشد سلول‌ها مطلوب نبوده و دچار مرگ سلولی می‌شدند). در تحقیقی که حرفه دوست و همکاران انجام دادند، نشان داده شد که بعد از کشت سلول‌های فیبروبلاست روی نانو الیاف کیتوسان/ پلی اتیلن اکسایداختلاف معنی‌داری بین نمونه و شاهد از لحاظ میزان زنده بودن سلولی و مورفولوژی وجود ندارد که در مطالعه اخیر نیز این موارد تائید می‌گردد بنابراین می‌توان از نانو الیاف‌های زیست سازگار و زیست تخریب‌پذیر به عنوان بستری مناسب در مهندسی بافت و سایر موارد پزشکی بهره برد(۱۹).

در تحقیقی که توسط panseri و همکارانش روی غلظت‌های مختلف محلول PLGA از ۲ تا ۷ درصد در حلال HFIP با ولتاژها، نرخ تغذیه و فواصل مختلف انجام شد، بهترین نتیجه را در غلظت محلول ۷ درصد، ولتاژ ۱۲ کیلو ولت، نرخ تغذیه و به فاصله ۱۰ سانتی‌متری از صفحه جمع کننده به دست آوردند(۲۰).

در تحقیقی که توسط Martin و همکاران برای کشت و تمایز سلول های مغز استخوان روی پلیمر PLGA انجام شد. برای ایجاد ماتریکس مناسب و شبیه به بافت از پلیمر پلی اتیلن اکساید به همراه PLGA استفاده کرده‌اند(۲۱). پلیمر PLGA به علت روزنه‌هایی که دارد، می‌تواند ارتباط و اینترکشن با سلول‌ها ایجاد کند ولی تهیه آن به صورت نانو الیاف ماتریکسی برای کشت سلولی مناسب است و در مهندسی بافت کاربرد دارد. در تحقیقی دیگر گروه Kim و همکاران از پلیمر مذکور به همراه نسبت‌های متفاوتی از هیدروکسی آپاتیت برای تمایزسلول‌های مغزاستخوان استفاده کرده‌اند و نتایج حاصل از کارشان نشان می‌دهد از هیدروکسی اپاتیت در تمایز سلول‌های استخوان کمک زیادی می‌کند(۲۲).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که:

۱. سلول‌های BMSCs به راحتی می‌توانند روی نانوالیاف PLGA تکثیر طبیعی داشته و از این نظر با گروه کنترل مشابهت فراوانی دارند.

۲. PLGA سمیتی برای رشد سلول‌ها ندارد و در بیش‌تر تحقیقات بیولوژی و پزشکی کاربرد دارد (رشد سلول‌ها و عدم مرگ سلولی روی بستر تهیه شده و نیز منابع مربوط به استفاده از این ماده عدم سمیت آن را تائید می کند.).

۳. شکل و مورفولوژی سلول‌های BMSCs روی نانوالیاف PLGA در طول مطالعه حفظ شده و به سلول‌های گروه شاهد بسیار شبیه بود.

References

1. Subramanian A, Krishnan UM, Sethuraman S. Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration. J Biomed Sci 2009; 16: 108.
2. Han D, Gouma PI. Electrospun bioscaffolds that mimic the topology of extracellular matrix. Nanomedicine 2006; 2(1): 37-41.
3. Thissen H, Chang KY, Tebb T, Tsai WB, Glattauer V, Ramshaw J, et al. Synthetic biodegradable microparticles for articular cartilage tissue engineering. J Biomed Mater Res A 2006; 77(3): 590-598.
4. Yang F, Murugan R, Wang S, Ramakrishna S. Electrospinning of nano/micro scale poly (L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. Biomaterials 2005; 26(15): 2603-2610.
5. Chan JM, Zhang L, Yuet KP, Liao G, Rhee JW, Langer R, et al. PLGA–lecithin–PEG core–shell nanoparticles for controlled drug delivery. Biomaterials 2009; 30(8): 1627-1634.
6. Cao H, Kuboyama N. A biodegradable porous composite scaffold of PGA/β-TCP for bone tissue engineering. Bone 2010; 46(2): 386-395.
7. Fulzele S, Satturwar P, Dorle AK. Study of the biodegradation and in vivo biocompatibility of novel biomaterials. Eur J Pharm Sci 2003; 20(1): 53-61.
8. Bae HK, Chung CP, Chung DJ. Preparation and in vitro evaluation of nerve conduit using electro-spun biodegradable polymers. Key Eng Mater 2007; 342-343: 325-328.
9. Anderson JM, Shive MS. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. Adv Drug Deliv Rev 2012; 10(3): 289-293.
10. Bala I, Hariharan S, Kumar MN. PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 2004; 21(5): 387-422.
11. Tohill M, Mantovani C, Wiberg M, Terenghi G. Rat bone marrow mesenchymal stem cells express glial markers and stimulate nerve regeneration. Neurosci Lett 2004; 362(3): 200-203.
12. Cuevas P, Carceller F, Dujovny M, Garcia-Gomez I, Cuevas B, Gonzalez R, et al. Peripheral nerve regeneration by bone marrow stromal cells. Neurol Res 2002; 24(3): 634-638.
13. You Y, Lee SJ, Min BM, Park WH. Effect of solution properties on nanofibrous structure of electrospun poly (lactic-co-glycolic acid). J Appl Polym Sci 2006; 99(3): 1214-1221.
14. Yeu IS, Lee HJ, Yi JS, Yang JH, Lee IW, Lee HK. The survival and migration pattern of the bone marrow stromal cells after intracerebral transplantation in rats. J Korean Neurosurg Soc 2004; 36: 400-404.
15. Pannunzio ME, Jou IM, Long A, Wind TC, Beck G, Balian G. A new method of selecting Schwann cells from adult mouse sciatic nerve. J Neurosci Methods 2005; 149(1): 74-81.
16. Xu C, Inai R, Kotaki M, Ramakrishna S. Electrospun nanofiber fabrication as synthetic extracellular matrix and its potential for vascular tissue engineering. Tissue Eng 2004; 10(7-8): 1160-1168.
17. Kazemnejad S, Allameh A, Soleimani M, Gharehbaghian A, Mohammadi Y, Amirizade N, et al. Development of a novel three dimendional biocampatible nanofibrous scaffold for the expansion and hepatogenic differention of human bone marrow

mesenchymal stem cells. Iran J Biotecnal 2007; 5(4): 201-211.

18. Cheng M, Deng J, Yang F, Gong Y, Zhao N, Zhang X. Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. Biomaterials 2003; 24(17): 2871–2880.
19. Panseri S, Cunha C, Lowery J, Del Carro U, Taraballi F, Amadio S, et al. Electrospun micro-and nanofiber tubes for functional nervous regeneration in sciatic nerve transections. BMC Biotechnology 2008; 8(1): 39.
20. Martin I, Shastri V, Padera RF, Langer R, Vunjak-Novakovic G. Bone marrow stromal cell differentiation on porous polymer scaffolds. 45th Annual meeting, Ortopaedic Research Society,1999 Feb1-4,California.
21. Kim H, Kim HM, Jang JE, Kim CM, Kim EY, Lee D, et al. Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Stem Cell in Poly (Lactic-co-Glycolic Acid) Scaffold Loaded Various Ratio of Hydroxyapatite. Int J Stem Cells 2013; 6(1): 67-74.