

## اثر نانوذرات رزوراترول – Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) و نانوذرات کورکومین – PLGA به طور هم‌زمان در تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از چربی به استئوبلاست

فاطمه عروجعلیان<sup>۱</sup>، محمد رضانی<sup>۲</sup>، مونا علی بلندی<sup>۳</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC یا Mesenchymal stem cell) توانایی تمایز به استئوبلاست‌ها را دارند که این تمایز توسط شاخص‌های رشد متعددی هدایت می‌شود. استفاده از متابولیت‌های گیاهی می‌تواند مانند شاخص‌های رشد، تمایز سلول‌های بنیادی را کنترل کند. هدف از انجام پژوهش حاضر، ارزیابی اثرات هم‌زمان نانوذرات رزوراترول – Poly (lactic-co-glycolic acid) و کورکومین – PLGA بر هدایت MSC مشتق از چربی به سمت تمایز استئوبلاستی بود.

**روش‌ها:** MSC انسانی به دست آمده از بافت چربی انسان، پس از تعیین هویت با استفاده از فلوسایتومتری، تحت تأثیر نانوذرات رزوراترول و کورکومین به منظور تعیین اثرات تمایزی این دو ترکیب به صورت توأم قرار گرفت. تأثیر سیتوتوکسیک رزوراترول و کورکومین به روش MTT و اثرات تمایزی آن به وسیله رنگ‌آمیزی Alizarin red بررسی گردید.

**یافته‌ها:** با توجه به نتایج آزمون MTT، مشخص شد که استفاده از نانوذرات رزوراترول – PLGA و کورکومین – PLGA تا غلظت ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر، باعث کاهش رشد یا کاهش درصد بقای سلولی نشد. رنگ‌آمیزی Alizarin red نشان داد که تیمار نانوذرات رزوراترول – PLGA و کورکومین – PLGA، موجب افزایش رسوب یون‌های معدنی بر ماتریکس خارج سلولی در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر شد.

**نتیجه‌گیری:** استفاده از ترکیبات فعالی مانند نانوذرات رزوراترول – PLGA و کورکومین – PLGA به طور هم‌زمان، به دلیل دارا بودن ترکیبات فعالی همچون رزوراترول و کورکومین، می‌تواند سبب افزایش تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های استئوبلاست شود. همچنین، می‌تواند موجب شود که در غلظت‌های پایین، اثربخشی بیشتری داشته باشد.

**واژگان کلیدی:** نانوذرات؛ رزوراترول؛ کورکومین؛ سلول‌های بنیادی مشتق از چربی؛ استئوبلاست

**ارجاع:** عروجعلیان فاطمه، رضانی محمد، مونا بلندی علی. اثر نانوذرات رزوراترول – Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) و نانوذرات کورکومین – PLGA به طور هم‌زمان در تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از چربی به استئوبلاست. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۰؛ ۳۹ (۶۵۴): ۹۶۴-۹۷۲.

### مقدمه

می‌تواند یک راهبرد جدید برای طب بازساختی و ترمیم بافت‌های از دست رفته یا صدمه دیده ارائه نماید. تحقیقات متعددی بر روی فرایند تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دنبال استفاده از شاخص‌های رشد مختلف و یا استفاده از تکنیک‌های دست‌ورزی ژن‌ها به منظور تغییر فعالیت ژن‌ها و پروتئین‌های درگیر در مسیر تمایز صورت گرفته است (۱-۲).

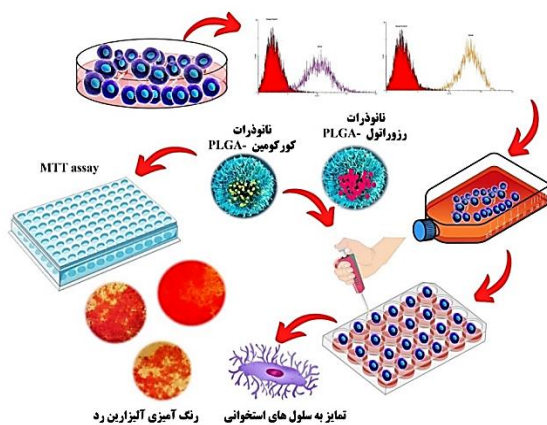
رزوراترول (Resveratrol) نوعی ترکیب پلی‌فنولیک است که در گیاهانی مانند بابونه، بادام‌زمینی و انگور یافت می‌شود. مطالعات نشان داده است که این ترکیب در کاهش خطر حمله‌ی قلبی و دیابت نقش

استفاده از پیوند استخوان، روش استاندارد برای درمان شکستگی‌های اسکلتی یا جایگزینی و بازسازی استخوان از دست رفته است. شایع‌ترین پیوند استخوان، اتوگرافت می‌باشد، اما استفاده از آن می‌تواند منجر به عوارضی همچون درد، عفونت، زخم، خونریزی و نارسایی در قسمت‌های پیوند شده گردد. بعضی از شکستگی‌های استخوانی با وجود جراحی یا درمان‌های مختلف دیگر، بهبود پیدا نمی‌کنند و به ضایعات غیر جوش خورنده تبدیل می‌شوند. مهندسی بافت با ترکیب تکنولوژی مهندسی و روش‌های بیولوژیک،

- ۱- استادیار، گروه فن‌آوری‌های نوین پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
  - ۲- استاد، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
  - ۳- استادیار، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
- نویسنده‌ی مسؤو: مونا علی بلندی؛ استادیار، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی، و مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

Email: alibolandim@mums.ac.ir

سلول‌ها با استفاده از نانوپارتیکل‌های سنتزی رزوراترول-PLGA و کورکومین-PLGA فراهم گردید. پس از تعیین خصوصیات و مقایسه‌ی آن با محیط تمایزی استاندارد و همچنین، مقایسه با دو ماده رزوراترول و کورکومین به تنهایی در سه غلظت مشابه با نانوذرات لود شده با رزوراترول و کورکومین، اثرات القایی تمایز به استخوان در آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱).



شکل ۱. شماتیک انجام کار در تحقیق حاضر

به منظور تهیه‌ی نانوذرات رزوراترول-PLGA، ابتدا انکپسولاسیون رزوراترول در PLGA (Sigma-Aldrich، آمریکا) (۵۰:۵۰) با روش هم‌رسوبی مطابق با روش قید شده در تحقیق پیشین انجام شد (۵). میزان بارگیری رزوراترول در داخل ماتریکس پلیمری با رسم منحنی استاندارد آن در Dimethyl sulfoxide (DMSO) و جذب در ۳۱۰ نانومتر و سپس حل نمودن مقداری از فرمولاسیون در DMSO و خواندن جذب در ۳۱۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید (۵). ساخت نانوذرات کورکومین-PLGA با استفاده از تکنیک Emulsification solvent evaporation و نسبت ۱ به ۱۰ دارو به پلیمر مطابق پژوهش قبلی انجام شد (۱۳). پس از تهیه‌ی نانوذرات حاوی کورکومین، این فرمولاسیون‌ها از نظر اندازه‌ی ذره‌ای و پتانسیل زتا با Dynamic light scattering (DLS) مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به این که پروفایل رهایش فرمولاسیون تهیه شده، در Phosphate-buffered saline (PBS) با pH = ۷/۴ تعیین می‌شود، به منظور بررسی پروفایل رهایش، مقداری از فرمولاسیون در کیسه‌ی دیالیز ۵۰ کیلودالتون ریخته شد و در داخل بافر PBS و دمای ۳۷ و ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و pH = ۷/۴ قرار داده شد و با سرعت ۷۰ دور در دقیقه انکوبه گردید. در فاصله‌های زمانی معین، از خارج از کیسه‌ی دیالیز نمونه‌برداری و به جای آن به همان مقدار از بافر مربوط جایگزین شد. جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه طیف‌سنجی

دارد (۳-۴). اثرات آنتی‌اکسیداتیو، ضد التهاب، ضد آنژیوژنیک و ضد سرطانی آن نیز در تحقیقات فراوانی مشخص شده است (۳-۷)، اما حلالیت ضعیف این ترکیب و متابولیسم سریع آن در بدن، سبب کاهش فراهمی زیستی آن می‌شود (۴). استفاده از نانوحامل‌ها در پژوهش‌های مختلف، منجر به افزایش فراهمی زیستی و تأثیر این ترکیب شده است. از نانوذرات مختلف زیست سازگار برای انتقال رزوراترول در مطالعات بازسازی، ترمیم و مینرالیزاسیون استخوان استفاده شده است (۶-۷).

در تحقیقات فراوانی خواص متعدد کورکومین (Curcumin) از جمله فعالیت ضد سرطانی و ضد التهابی (۳) و همچنین، تأثیر بالقوه‌ی مثبت کورکومین بر روند پیشگیری از پوکی استخوان نیز گزارش شده است (۸-۹). در پژوهش‌های مختلفی، نقش کورکومین حاصل از زردچوبه بر روی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مورد بررسی قرار گرفته است (۱۰-۱۱).

همواره نیاز به نانوذرات جهت رسانش کارآمد شاخص‌های رشد یا ترکیبات طبیعی که اثرات آن‌ها در تحریک به تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های بدن احساس شده است. نانوذرات پلیمری، یکی از جذاب‌ترین نانوذرات در زمینه‌ی رسانش ترکیبات طبیعی به سلول‌های بنیادی می‌باشد. در این بین، نقش پلیمرهای طبیعی از جمله کیتوسان و پلیمرهای سنتزی تأیید شده بسیار حایز اهمیت است. در میان پلیمرها، poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) مورد تأیید FDA (Food and Drug Administration)، زیست تخریب‌پذیر و زیست سازگار است و در مطالعات بسیاری مورد توجه و استفاده می‌باشد (۱۲).

هدف از تحقیق حاضر، بارگذاری رزوراترول یا کورکومین در داخل پلیمر PLGA و تهیه‌ی نانوذرات پلیمری حاوی این ترکیبات طبیعی بود. سپس توانایی کورکومین و رزوراترول به فرم آزاد و به صورت انکپسوله شده در داخل نانوپارتیکل‌های PLGA بر روی تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از چربی به سلول‌های استخوانی با استفاده از اندازه‌گیری میزان مینرالیزاسیون سنجیده خواهد شد. پیش‌بینی می‌شود که با انکپسولاسیون رزوراترول و کورکومین در داخل نانوذرات پلیمری، افزایش پایداری آن‌ها نسبت به فرم آزاد و رهایش کنترل شده‌ی آن‌ها، تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های استخوانی تشدید شود.

## روش‌ها

در این مطالعه، ابتدا با جداسازی و تکثیر سلول بنیادی از بافت چربی، ضمن بررسی رفتار سلول‌ها و تعیین هویت سلولی از طریق فلوسایتومتری در محیط کشت مغذی، امکان تمایز کنترل شده‌ی

اطمینان از حفظ مورفولوژی سلول‌ها، تا ۱۰ پاساژ به طور پیوسته کشت داده شد و سلول‌ها برای انجام تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. بعد از سه بار پاساژ سلولی، برای تأیید ماهیت مزانشیمی سلول‌های بنیادی کشت یافته، از تکنیک فلوسایتومتری استفاده گردید (۱۴).

جهت اثبات مزانشیمی بودن سلول‌های بنیادی جدا شده از نشانگرهای سطحی آن‌ها، از فلوسایتومتری استفاده شد. فلوسایتومتری تکنیکی برای شمارش و بررسی مشخصات سلول‌ها است که برخی نشانگرها مثبت بودند و بیان بالایی دارند و برخی دیگر نشانگرهای منفی و بیان پایینی دارند. سپس آنتی‌بادی‌های کوژوگه با فلورسانس ایزوتیوسیانان (Anti-Human-CD99-FITC (FITC)، Anti-Human-CD44-FITC (شاهد مثبت)، همراه با Anti-Human-CD34-FITC (شاهد منفی) (Dako Corporation, Glostrup, دانمارک) مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور، از سلول‌های جدا شده در پاساژ سوم استفاده شد. غلظت مناسبی (نسبت ۱:۱۰) از آنتی‌بادی‌های نشان‌دار ذکر شده، همراه با شاهد منفی به آن اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. پس از شستشو با PBS، آنالیز فلوسایتومتری با استفاده از FACSort (Becton Dickinson, San Jose CA, آمریکا) انجام شد.

سمیت سلولی نانوذرات رزوراترول و کورکومین با استفاده از روش (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide-۳ (MTT) روی سلول‌های بنیادی استخراج شده مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور، سلول‌ها با تعداد بهینه شده‌ی ۱۰ هزار برای سلول‌ها در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای با حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل اختصاصی به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. سپس غلظت‌های نانوذرات رزوراترول و کورکومین به هر چاهک اضافه گردید. جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط پلیت ریدر (شرکت BioTek، آمریکا) برای هر چاهک خوانده شد و به صورت تکرار سه‌تایی مورد آزمایش قرار گرفت (۱۵).

درصد سمیت با استفاده از رابطه‌ی ۲ محاسبه گردید. این رابطه، میزان سلول‌های زنده را با روش MTT نشان می‌دهد و بیان‌کننده‌ی درصد بقای سلول‌ها است. با کم کردن این مقدار از ۱۰۰ درصد، سمیت مشخص شد و داده‌ها به صورت میانگین آماری از سه آزمایش مستقل ارائه شد.

رابطه‌ی ۲ سمیت سلولی (درصد) = میانگین جذب سلول‌های تیمار شده / میانگین جذب سلول‌های کنترل  $\times 100$  به منظور بررسی تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از چربی به استخوان، ویال‌هایی که در پاساژ سوم فریز شده بود، خارج گردید و محتویات آن در فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربع در محیط DMEM ۱۰ درصد حاوی FBS همراه با آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و

فرابنفش در ۳۱۰ نانومتر برای رزوراترول و در ۴۲۱ نانومتر اندازه‌گیری و با استفاده از منحنی کالیبراسیون غلظت کورکومین در محلول نهایی مشخص گردید. در نهایت، بازدهی کپسوله‌سازی با استفاده از رابطه‌ی ۱ محاسبه شد.

رابطه‌ی ۱ بازدهی کپسوله‌سازی دارو (درصد) = غلظت داروی انکپسوله شده / غلظت داروی اولیه  $\times 100$

برای انجام مطالعه‌ی حاضر، بافت چربی از نواحی شکم و پهلو یک بیمار ۳۰ ساله توسط پزشک جراح در کلینیک جراحی مشهد تحت جراحی لیپوساکشن خارج گردید. تحقیق با کد IR.MUMS.REC.1396.269 طبق مجوز کمیته‌ی اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام گرفت. با کسب رضایت شخصی از بیمار، ۱۰۰ سی‌سی از نمونه‌ی بافت چربی توسط پزشک جراح در اختیار آزمایشگاه قرار داده شد. برداشت در اتاق عمل و تحت شرایط استریل انجام گرفت. نمونه‌ی چربی داخل بطری استریل حاوی محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich، آمریکا)، دارای آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین / استرپتومایسین (۱۰ درصد) در حداقل زمان به آزمایشگاه منتقل گردید.

به منظور جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی انسانی مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور، جداسازی سلول‌های بنیادی از بافت چربی، هم حجم نمونه‌ی لیپوساکشن از بافر PBS حاوی آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین / استرپتومایسین به آن اضافه گردید. سپس برابر حجم نمونه‌ی بافت چربی، آنزیم کلاژناز تیپ ۱ با غلظت ۰/۰۷۵ درصد که در محیط کشت DMEM حل شده و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفته بود، اضافه گردید و به مدت ۶۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار (دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، سرعت ۵۰۰ دور در دقیقه) قرار داده شد و سپس آنزیم کلاژناز توسط سرم جنین گاوی (Fetal bovine serum یا FBS) خنثی شد و نمونه (با استفاده از مش‌های استاندارد) با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. در نهایت، فلاسک حاوی سلول، داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد  $CO_2$  قرار داده شد. پس از جداسازی سلول‌های بنیادی، هر ۳-۵ روز یکبار محیط کشت تعویض گردید و از محیط کشت تازه‌ی DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS استفاده شد. در این مرحله، رشد و مورفولوژی سلول‌ها با میکروسکوپ نوری ارزیابی گردید (۱۴).

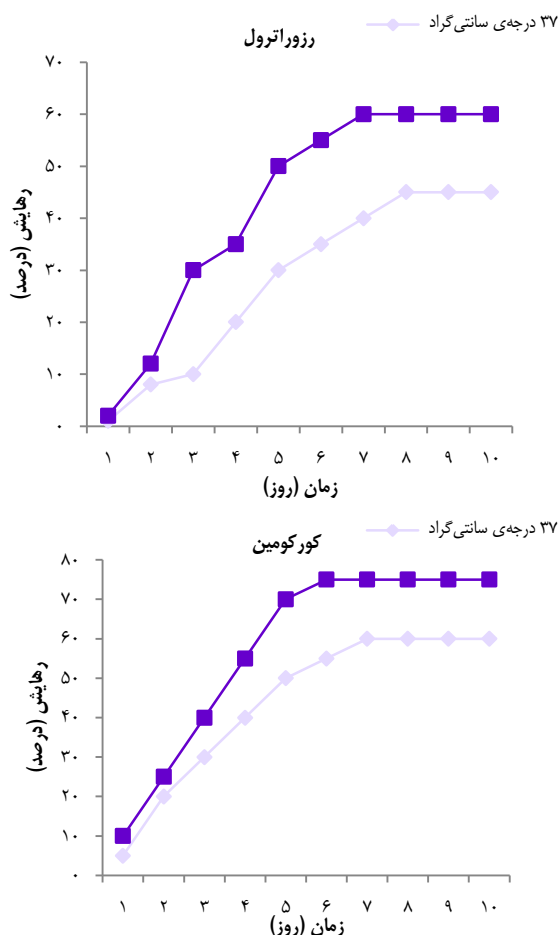
برای پاساژ سلول (Sub culture)، پس از این که با تعویض منظم محیط‌های کشت، سلول‌ها به مرحله‌ی تراکم Confluence رسیدند، انتقال سلول‌ها به فلاسک بزرگ‌تر انجام گرفت. برای

شده‌ی رزوراترول و کورکومین به ترتیب اندازه‌ی ۲۳۰ و ۱۸۰ نانومتر داشتند (جدول ۱). شاخص پراکندگی نانوذرات ۰/۲۱ به دست آمد. مقدار عددی کوچک شاخص پراکندگی، بیان‌کننده‌ی این مسأله است که نانوذرات تهیه شده همگن می‌باشند.

جدول ۱. اندازه و پتانسیل زتا نانوذرات و راندمان انکپسولیشن

نانوذرات	اندازه نانوذرات (نانومتر)	پتانسیل زتا نانوذرات (mV)	راندمان انکپسولیشن (درصد)
رزوراترول	230 ± 25	-13/5	68
کورکومین	180 ± 15	-12/7	80

میزان رهایش کورکومین و رزوراترول از نانوذرات PLGA در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در شکل ۲ ارائه شده است.



شکل ۲. پروفایل رهایش رزوراترول (A) و کورکومین (B) از سامانه‌ی نانوذرات پلیمری کورکومین-PLGA و رزوراترول-PLGA در طی زمان (بر حسب روز) و در دمای ۳۷ و ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و  $pH = 7/4$

استرپتومایسین درانکوباتور با  $CO_2$  ۵ درصد کشت داده شد. برای کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی به منظور القای تمایز، سلول‌های پاساژ ۳ در پلیت‌های ۱۲ چاهکی به میزان  $1 \times 10^4$  در هر چاهک حاوی محیط تمایز کشت داده شد. پس از رسیدن به تراکم ۸۰ درصد، محیط رویی سلول‌ها با محیط تمایز به استخوان جایگزین گردید. محیط تمایز استخوان محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS، بتاگلیسروفسفات ۱۰ میلی‌مولار، دگزامتازون ۱۰ نانومولار و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آسکوربیک اسید-2 فسفات بود. به منظور بررسی تأثیر نانوذرات رزوراترول-PLGA و کورکومین-PLGA به طور هم‌زمان بر تمایز، در تیمارهای جداگانه‌ای غلظت‌های ۲۰ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ترکیب هم‌زمان این دو ترکیب (۵۰ درصد از هر کدام) به محیط تمایز اضافه شد و بررسی سلول‌های تیمار شده به مدت ۲۸ روز انجام گرفت (۱۰، ۷). در طول آزمایش، محیط کشت هر ۳ روز یک‌بار تعویض گردید. در طی این مدت، تغییرات این سلول‌ها به طور روزانه با استفاده از میکروسکوپ نوری به دقت تحت نظر قرار گرفت و مورفولوژی آن‌ها بررسی شد. جهت مقایسه، یک تیمار به عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

برای مشخص شدن میزان مینرالیزاسیون سلولی باید ماتریکس معدنی مشخص می‌شد. برای این کار روشی به نام رنگ‌آمیزی Alizarin red استفاده شد. بدین منظور، از کیت Millipore USA vitro In شرکت Osteogenesis Assay Kit استفاده گردید. برای رنگ‌آمیزی سلول‌های تمایز یافته، محلول Alizarin red با  $pH = 4$  به مدت ۱۰ دقیقه به سلول‌ها اضافه شد. پس از سه بار شستشو با PBS، سلول‌ها زیر میکروسکوپ بررسی و تصاویر عکسبرداری گردید (۱۶).

جهت ارزیابی آماری داده‌ها، آزمون One-way ANOVA برای مقایسه‌ی بین گروه‌ها انجام شد و در صورت همگن بودن انحراف استاندارد، آزمون Tukey-Kramer به منظور مقایسه‌ی گروه‌ها به صورت جداگانه استفاده گردید.  $P < 0/05$  به منزله‌ی معنی‌دار بودن اختلاف بین دو گروه در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی از سرعت تکثیر مناسبی برخوردار بودند. میزان تکثیر و مورفولوژی این سلول‌ها قبل از فریز کردن و بعد از خارج نمودن از فریز کاملاً یکسان و مشابه بود. در طی مراحل مختلف کار با سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی، هیچ‌گونه علامتی مبنی بر آلودگی این سلول‌ها با ویروس‌ها یا مایکوپلاسما مشاهده نگردید.

نتایج گزارش شده از DLS حاکی از این بود که نانوذرات تهیه

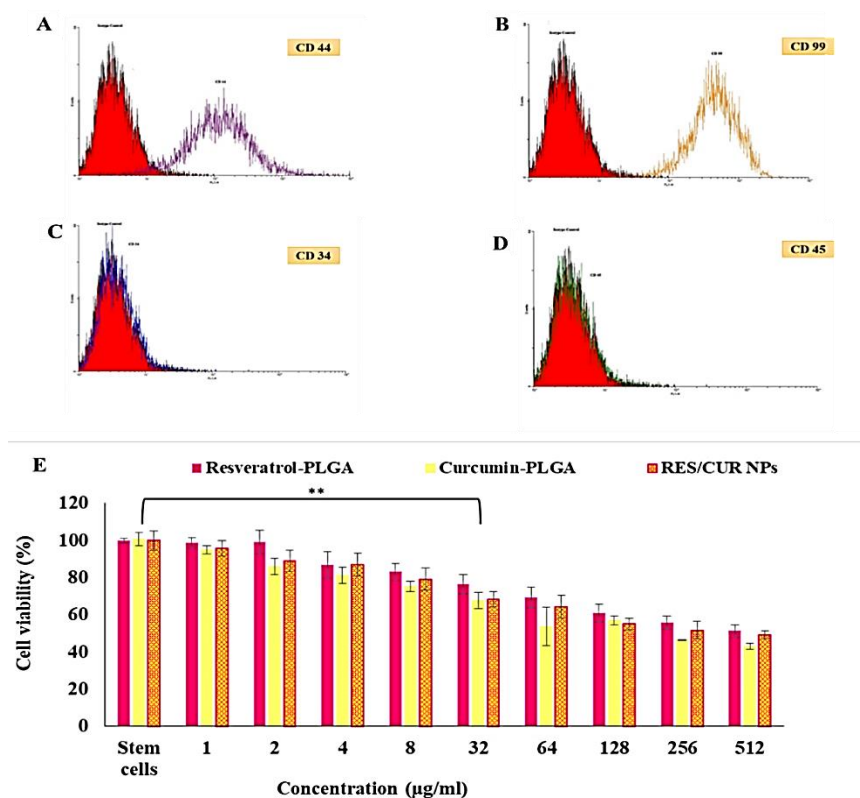
بنیادی که با غلظت ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات پلیمری تهیه شده مجاور شده بود، مشاهده گردید. بنابراین، غلظت‌های کمتر از ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) برای مطالعات تمایز به استخوان در آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. لازم به ذکر است که مجاورت هم‌زمان سلول‌ها با نانوذرات پلیمری کورکومین-PLGA و رزوراترول-PLGA، سمیت آن‌ها را افزایش نداد.

**بررسی میزان مینرالیزه شدن و رسوب کلسیم:** شکل ۴ نمای میکروسکوپی رنگ‌آمیزی Alizarin red را در روز ۲۸ از کشت نشان داد. در این نما، رنگ قرمز روشن نشان دهنده ماتریکس معدنی است. شکل‌گیری ماتریکس معدنی در گروهی از سلول‌های بنیادی که به طور هم‌زمان نانوذرات کورکومین-PLGA و رزوراترول-PLGA با غلظت ۵۰ درصد از هر کدام و به میزان ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر را دریافت کرده بودند، به صورت قابل توجهی بیشتر از گروه شاهد (C) بود که به آن شاخص‌های تمایزی رایج اضافه شده بود.

نتایج به دست آمده نشان داد که بالاترین رهائش برای نانوذرات رزوراترول-PLGA در روز هفتم، ۷۱/۵ درصد بود. از طرف دیگر، بالاترین میزان رهائش برای نانوذرات کورکومین-PLGA در روز هفتم، ۸۱/۵ درصد گزارش شد که این رهش تدریجی و آهسته برای شروع روند تمایز در سلول‌ها بسیار مناسب است.

سلول‌های جداسازی شده در پاساژ ۳ کشت، از نظر مورفولوژی و بیان نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی مانند CD44، CD99، CD34 و CD45 مورد ارزیابی قرار گرفت. در آنالیز فلوسایتومتري سلول‌های بنیادی مشتق شده از چربی، میزان بیان مثبت نشانگرهای بنیادی سطحی، CD99 و CD44 و میزان بیان منفی نشانگرهای بنیادی سطحی، CD34 و CD45 را داشتند (شکل ۳).

تأثیر نانوذرات پلیمری کورکومین-PLGA و رزوراترول-PLGA به صورت تنها و هم‌زمان بر روی سلول‌های بنیادی جدا شده از چربی انسانی بررسی شد. طبق بررسی‌ها (شکل ۳، قسمت E)، وجود اختلاف معنی‌دار ( $P \leq 0/01$ ) در درصد زنده‌مانی سلول‌های



شکل ۳. تأیید نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی استخراج شده از چربی حاصل از لیپوساکشن

**A: CD44** (شاهد مثبت اول)، **B: CD99** (شاهد مثبت دوم)، **C: CD45** (شاهد منفی اول)، **D: CD34** (شاهد منفی دوم)، **D: اثر سمیت نانوذرات پلیمری کورکومین-PLGA و رزوراترول-PLGA به تنهایی و به صورت توأم در غلظت‌های مختلف بر سلول‌های بنیادی جدا شده از چربی انسانی (داده‌های هر ستون میانگین سه تکرار می‌باشد).**  
<sup>\*\*</sup> نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ( $P \leq 0/01$ ) درصد زنده‌مانی در سلول‌های بنیادی در سلول‌های بنیادی با غلظت ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات پلیمری به کار رفته در مقایسه با سلول‌های بنیادی تیمار نشده وجود دارد.

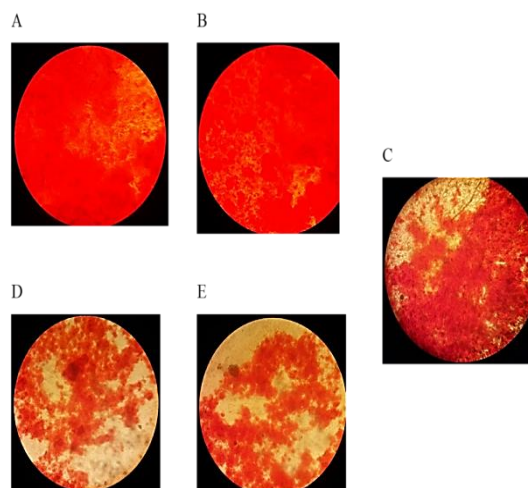
CD34 و CD45 استفاده گردید. در آنالیز فلوسایتومتری سلول‌های بنیادی مشتق شده از چربی، میزان بیان مثبت نشانگرهای سطحی سلول بنیادی CD99 و CD44 و میزان بیان منفی نشانگرهای سطحی سلول بنیادی CD34 و CD45 به دست آمد. این نتیجه هویت این سلول‌ها را به دلیل حضور این نشانگرها در سطح سلول‌های بنیادی تأیید کرد (۲۰-۱۹).

سلول‌های مزانشیمی از لحاظ ساختار بررسی و نتایج نشان داد که این سلول‌ها به شکل دوکی تا فیبروپلاستی می‌باشند و پس از ۷ روز شکل فیبروپلاستی آن‌ها بیشتر نمایان شد. این مشاهدات با نتایج پژوهش Raposio و همکاران (۱۶) مطابقت داشت.

نتایج به دست آمده از روش MTT نشان داد که اختلاف معنی‌داری ( $P \leq 0/01$ ) بین درصد زنده‌مانی در سلول‌های بنیادی با غلظت ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات پلیمری به کار رفته در مقایسه با سلول‌های بنیادی تیمار نشده وجود داشت. بنابراین، غلظت‌های کمتر از ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر (غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) برای مطالعات تمایز به استخوان در آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۳). نتایج حاصل از بررسی میزان مینرالیزه شدن و رسوب کلسیم که با استفاده از Alizarin red انجام شد، نشان داد که در زمان استفاده‌ی توأم از دو نانوذره، میزان مینرالیزه شدن و رسوب کلسیم به مقدار زیادی افزایش یافته است (شکل ۴، قسمت‌های A و B). نتایج حاصل از تحقیق حاضر، پژوهش‌های دیگر که به طور جداگانه انجام شده بود را تأیید می‌کرد (۱۰، ۷).

بر اساس نتایج مطالعه‌ی Moon و همکاران، درمان با رزوراترول (در غلظت ۵ میکرومولار) بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal stem cell یا MSC) در طی استئوژنز، هم‌فعالیت‌های آلکالین فسفاتاز (Alkaline phosphatase یا ALP) و هم رسوبات کلسیم را در مقایسه با گروه‌های شاهد افزایش داد و اثر تقویت‌کننده‌ی رزوراترول بر استئوژنز را اثبات نمود. علاوه بر این، درمان با رزوراترول (در غلظت ۵ میکرومولار) در طی تمایز استئوژنیک MSC، هم بیوژنز میتوکندری و هم تعداد کپی‌های میتوکندریایی (Mitochondrial DNA یا mtDNA) را افزایش داد. همچنین، نقش رزوراترول در بهبود استئوژنز و بیوژنز میتوکندریایی MSC انسانی را اثبات نمود و کاربرد احتمالی رزوراترول را به عنوان مکملی برای پوکی استخوان و یا شکستگی‌های پوکی استخوان پیشنهاد نمود (۷).

در تحقیق دیگری، اثرات کورکومین بر تمایز MSC موش صحرایی (Rat mesenchymal stem cells یا rMSCs) به استئوبلاست‌ها و سلول‌های چربی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج



شکل ۴. نتایج تست کیفی رنگ‌آمیزی با Alizarin red

در مطالعه‌ی حاضر، بهترین نتایج برای ۵۰ درصد رزوراترول (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و ۵۰ درصد کورکومین (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بود.

A و B: نتایج مربوط به استفاده‌ی هم‌زمان نانوذرات کورکومین-PLGA و رزوراترول-PLGA با غلظت ۵۰ درصد، C: استفاده‌ی هم‌زمان نانوذرات (۷۵ درصد) کورکومین-PLGA و رزوراترول-PLGA با غلظت ۲۵ درصد، D: استفاده از نانوذرات رزوراترول-PLGA به تنهایی و E: کنترل استفاده از ترکیبات تمایزی

## بحث

کاربردها و پیشرفت‌ها در استفاده از ترکیبات طبیعی برای درمان بیماری‌های مزمن استخوان، پتانسیل قابل توجهی دارد. در میان این ترکیبات طبیعی، رزوراترول و کورکومین به دلیل تأثیر چند وجهی بر بافت‌های استخوانی، یکی از امیدوارکننده‌ترین ترکیبات طبیعی به شمار می‌روند (۱۷).

در پژوهش حاضر، نانوذرات رزوراترول-PLGA و کورکومین-PLGA هر کدام به تنهایی و به طور هم‌زمان بر روی تمایز سلول‌های بنیادی با استفاده از روش‌های مختلف مانند بررسی توان زیستی و فرایند معدنی شدن ماتریکس خارج سلولی مورد بررسی قرار گرفت.

رزوراترول و کورکومین به فرم آزاد، حلالیت کمی در محیط‌های زیستی دارند و حلال‌های آلی آن (همچون الکل و DMSO) برای سلول کشنده می‌باشد (۱۸، ۱۳، ۵). از این‌رو، در مطالعات اخیر از نانوذرات مختلف جهت افزایش حلالیت ترکیبات گیاهی مانند رزوراترول و کورکومین استفاده می‌شود.

در تحقیق حاضر، سلول‌های بنیادی حاصل از لیپوساکشن یک زن ۳۰ ساله جداسازی و جهت تأیید بنیادی بودن سلول‌ها، از بررسی نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی CD99، CD44،

و آهسته‌ی ترکیبات در مجاورت سلول‌های بنیادی بود، استفاده گردید. رهایش کنترل شده، آهسته و پیوسته‌ی این دو ترکیب گیاهی توسط نانوذرات پلیمری و اثر ترکیبی مناسب آن‌ها در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از هر کدام از ترکیبات، در تحریک تمایز سلول‌های بنیادی به استئوبلاست در مقایسه با ترکیبات تمایزی رایج، بسیار چشم‌گیر بود.

### نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که استفاده از ترکیبات گیاهی به صورت انکپسوله شده در نانوذره مانند نانوذرات رزوراترول-PLGA و کورکومین-PLGA و مجاورت هم‌زمان آن‌ها با سلول‌های بنیادی، می‌تواند سبب افزایش تمایز آن‌ها به سلول‌های استئوبلاست شود.

با توجه به نتایج به دست آمده، پیشنهاد می‌گردد که نانوذرات تهیه شده برای بارگذاری در داربست‌های مورد استفاده در مهندسی بافت و پزشکی بازساختی مورد استفاده قرار گیرد. همچنین، به دلیل عدم سمیت این نانوذرات بر روی سلول‌های بنیادی، رزوراترول-PLGA و نانوذرات کورکومین-PLGA جایگزین بسیار مناسبی برای داروهای شیمیایی مورد استفاده در فرایندهای تمایز می‌باشند.

### تشکر و قدردانی

مطالعه‌ی حاضر برگرفته از طرح پژوهشی با شماره‌ی ۹۶۰۷۸۸ مصوب دانشگاه علوم پزشکی مشهد می‌باشد که تحت حمایت مالی این دانشگاه انجام گردید.

نشان داد که کورکومین، باعث افزایش فعالیت ALP و بیان mRNA اختصاصی استئوبلاست Runx2 و استئوکلسین (در زمانی که rMSCs در محیط استئوژنیک کشت شدند) گردید. در مقابل، کورکومین تمایز سلول‌های چربی را کاهش و بیان HO-1 طی تمایز استخوانی rMSCs را افزایش داد. این یافته‌ها نشان داد که کورکومین می‌تواند تمایز استئوژنیک MSC را تقویت و تشکیل سلول‌های چربی را مهار کند. اثر کورکومین بر تمایز استخوانی MSC با بیان HO-1 در ارتباط است (۱۰).

در پژوهش‌های مشابه، با انکپسوله نمودن ترکیباتی مانند شاخص‌های رشد و مواد مؤثره‌ی گیاهی، توانستند علاوه بر افزایش پایداری و مقاومت آن‌ها در برابر عوامل محیطی، رهایش و آزادسازی کنترل شده‌ی آن‌ها را فراهم نمایند. این نانوذرات با آزادسازی کنترل شده، آهسته و مداوم شاخص‌های رشد و مواد مؤثره‌ی گیاهی، این امکان را فراهم می‌آورند که سلول‌های بنیادی بتوانند به طرز مطلوب‌تری در مسیر تمایز قرار گیرند (۲۱، ۱۵).

محمدی و همکاران در مطالعه‌ی خود با انکپسوله نمودن پروتئین مورفوژنیک استخوان-۲ (Bone morphogenetic protein 2) یا BMP-2 در داخل لیپوزوم‌ها و تهیه‌ی یک فرمولاسیون آهسته رهش از آن، توانستند سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی را به طور مؤثرتری در مقایسه با BMP-2 آزاد به سلول‌های استخوانی متمایز نمایند (۲۲) که با نتایج بررسی حاضر مشابه بود.

در تحقیق حاضر، از نانوذرات پلیمری بر پایه‌ی PLGA که حاوی دو ترکیب طبیعی (رزوراترول یا کورکومین) با خاصیت زیست تخریب‌پذیری، کوچک بودن اندازه، عدم سمیت و رهایش کنترل شده

### References

- Pishavar E, Oroojalian F, Salmasi Z, Hashemi E, Hashemi M. Recent advances of dendrimer in targeted delivery of drugs and genes to stem cells as cellular vehicles. *Biotechnol Prog* 2021; 37(4): e3174.
- Zanganeh E, Masoudi S, Zavarani Hosseini A. A review on mesenchymal stem cells and their function in response to infection. *J Isfahan Med Sch* 2019; 37(522): 357-71. [In Persian].
- Schilling T, Ebert R, Raaijmakers N, Schutze N, Jakob F. Effects of phytoestrogens and other plant-derived compounds on mesenchymal stem cells, bone maintenance and regeneration. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014; 139: 252-61.
- Singh G, Pai RS. Recent advances of resveratrol in nanostructured based delivery systems and in the management of HIV/AIDS. *J Control Release* 2014; 194: 178-88.
- Singh G, Pai RS. Optimized PLGA nanoparticle platform for orally dosed trans-resveratrol with enhanced bioavailability potential. *Expert Opin Drug Deliv* 2014; 11(5): 647-59.
- Li Y, Danmark S, Edlund U, Finne-Wistrand A, He X, Norgard M, et al. Resveratrol-conjugated poly-ε-caprolactone facilitates in vitro mineralization and in vivo bone regeneration. *Acta Biomaterialia* 2011; 7(2): 751-8.
- Moon DK, Kim BG, Lee AR, In CY, Khan I, Moon KM, et al. Resveratrol can enhance osteogenic differentiation and mitochondrial biogenesis from human periosteum-derived mesenchymal stem cells. *J Orthop Surg Res* 2020; 15(1): 203.
- Mashayekhi S, Rasoulpoor S, Shabani S, Esmaeilzadeh N, Serati-Nouri H, Sheervalilou R, et al. Curcumin-loaded mesoporous silica nanoparticles/nanofiber composites for supporting long-term proliferation and stemness preservation of adipose-derived stem cells. *Int J Pharm* 2020; 587: 119656.
- Sordillo P, Helson L. Curcumin and Cancer Stem Cells: Curcumin has asymmetrical effects on cancer and normal stem cells. *Anticancer Res* 2015; 35(2): 599-614.
- Gu Q, Cai Y, Huang C, Shi Q, Yang H. Curcumin

- increases rat mesenchymal stem cell osteoblast differentiation but inhibits adipocyte differentiation. *Pharmacogn Mag* 2012; 8(31): 202-8.
11. de Cassia Noronha N, Mizukami A, Caliári-Oliveira C, Cominal JG, Rocha JL, Covas DT, et al. Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. *Stem Cell Res Ther* 2019; 10(1): 131.
  12. Bootdee K, Nithitanakul M. Poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanospheres within composite poly(vinyl alcohol)/aloe vera electrospun nanofiber as a novel wound dressing for controlled release of drug. *Int J Polym Mater Polym Biomater* 2021; 70(4): 223-30.
  13. Meena R, Kumar S, Kumar R, Gaharwar US, Rajamani P. PLGA-CTAB curcumin nanoparticles: Fabrication, characterization and molecular basis of anticancer activity in triple negative breast cancer cell lines (MDA-MB-231 cells). *Biomed Pharmacother* 2017; 94: 944-54.
  14. Gholami N, Asgary S, Fazilati M. The effect of oleoresin from turmeric plant (*Curcuma longa* L.) on the increase of differentiation of human mesenchymal stem cell to bone cells. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2017; 19(1): 42-51. [In Persian].
  15. Kamath MS, Ahmed SS, Dhanasekaran M, Santosh SW. Polycaprolactone scaffold engineered for sustained release of resveratrol: therapeutic enhancement in bone tissue engineering. *Int J Nanomedicine* 2014; 9: 183-95.
  16. Raposio E, Simonacci F, Perrotta RE. Adipose-derived stem cells: Comparison between two methods of isolation for clinical applications. *Ann Med Surg (Lond)* 2017; 20: 87-91.
  17. Lavrador P, Gaspar VM, Mano JF. Bioinspired bone therapies using naringin: Applications and advances. *Drug Discov Today* 2018; 23(6): 1293-304.
  18. Ranji N. Investigation of Survivin and hTERT gene expression in gastric adenocarcinoma cell line (AGS) treated by nano Curcumin. *Journal of Molecular and Cellular Research* 2014; 27(2): 233-41.
  19. Johal KS, Lees VC, Reid AJ. Adipose-derived stem cells: Selecting for translational success. *Regen Med* 2015; 10(1): 79-96.
  20. Shukla L, Yuan Y, Shayan R, Greening DW, Karnezis T. Fat therapeutics: The clinical capacity of adipose-derived stem cells and exosomes for human disease and tissue regeneration. *Front Pharmacol* 2020; 11: 158.
  21. Mohammadi M, Alibolandi M, Abnous K, Salmasi Z, Jaafari MR, Ramezani M. Fabrication of hybrid scaffold based on hydroxyapatite-biodegradable nanofibers incorporated with liposomal formulation of BMP-2 peptide for bone tissue engineering. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2018; 14(7): 1987-97.
  22. Mohammadi M, Alibolandi M, Abnous K, Salmasi Z, Jaafari MR, Ramezani M. Comparison of liposomal formulations incorporating BMP-2 peptide to induce bone tissue engineering. *Nanomed J* 2020; 7(3): 225-30.



## The Synergism of Resveratrol-Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and Curcumin-PLGA Nanoparticles in Directing Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells towards Osteoblastic Differentiation

Fatemeh Oroojalian<sup>1</sup>, Mohammad Ramezani<sup>2</sup>, Mona Alibolandi<sup>3</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Mesenchymal stem cells are able to differentiate into osteoblasts, which is forced by several growth factors. Similar to growth factors, plant metabolites have been shown to be able to support stem cell differentiation. The aim of this study was to assess the synergistic effects of resveratrol-poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and curcumin-PLGA nanoparticles on directing adipose-derived mesenchymal stem cells towards osteoblastic differentiation.

**Methods:** Human mesenchymal stem cells derived from the adipose tissue, after being characterized by flow cytometry, were simultaneously treated with 10  $\mu$ M concentrations of each of PLGA-resveratrol and PLGA-curcumin nanoparticles. The cytotoxic effects of resveratrol and curcumin were evaluated by the MTT assay, and their differentiating potentials were evaluated by Alizarin red staining.

**Findings:** According to MTT results, neither resveratrol-PLGA nor curcumin-PLGA nanoparticles had no significant toxic effects on the target cells after 24 hours. At the 20 and 10  $\mu$ M concentrations of resveratrol-PLGA and curcumin-PLGA nanoparticles, respectively, a significant increase was observed in the proliferation of human mesenchymal stem cells. Alizarin red staining showed that treatment with resveratrol-PLGA and curcumin-PLGA nanoparticles increased the deposition of mineral ions in the extracellular matrix, an indicator of the onset of the cellular differentiation process.

**Conclusion:** The results of this study showed that the simultaneous use of bioactive compounds such as resveratrol-PLGA and curcumin-PLGA nanoparticles can direct stem cells towards osteoblastic differentiation. The simultaneous use of resveratrol-PLGA and curcumin-PLGA nanoparticles increases their efficiency at lower concentrations due to their synergistic effects.

**Keywords:** Nanoparticles; Resveratrol; Curcumin; Adipose-derived Mesenchymal stem cells; Osteoblast

**Citation:** Oroojalian F, Ramezani M, Alibolandi M. **The Synergism of Resveratrol- Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and Curcumin-PLGA Nanoparticles in Directing Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells towards Osteoblastic Differentiation.** J Isfahan Med Sch 2022; 39(654): 964-72.

1- Assistant Professor, Department of Advanced Sciences and Technologies in Medicine, School of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

2- Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy AND Pharmaceutical Research Center, Pharmaceutical Technology Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

3- Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy AND Pharmaceutical Research Center, Pharmaceutical Technology Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

**Corresponding Author:** Mona Alibolandi, Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy AND Pharmaceutical Research Center, Pharmaceutical Technology Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran; Email: alibolandim@mums.ac.ir