

مطالعه‌ی رفتار سلولی داربست الکترورسی شده‌ی پلی‌کاپرولاکتون/ژلاتین حاوی نانوذرات هیدروکسی آپاتیت و ویتامین D3

منصوره ستاری^۱، محمد رفیعی‌نیا^۲، محمدتقی خراسانی^۳، حسین صالحی رزوه^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: داربست، به عنوان یک عنصر اساسی در مهندسی بافت، باید خواص فیزیکی، شیمیایی و رفتار سلولی مناسب جهت بازسازی بافت، ارائه کند.

روش‌ها: داربست نانوکامپوزیتی مبتنی بر پلی‌کاپرولاکتون/ژلاتین حاوی نانوذرات هیدروکسی آپاتیت و ویتامین D3 توسط روش الکترورسی ساخته شد. پارامترهای محلول و فرایند، برای به دست آوردن خواص مناسب، بهینه‌سازی شدند. ریخت‌شناسی الیاف و سلول‌های MG-63 کشت داده شده، تعاملات شیمیایی میان مولکول‌های تشکیل دهنده داربست و میزان رسوب مواد معدنی، به ترتیب توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی، FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) و رنگ‌آمیزی Alizarin قرمز، نشان داده شد.

یافته‌ها: قطر متوسط داربست کامپوزیتی Polycaprolactone/gelatin/nano-hydroxyapatite/Vitamin D3 (PCL/Gel/nHA/Vit D3) برابر ۵۳۱ نانومتر به دست آمد. کشت سلول‌های استئوبلاست بر روی داربست‌ها نشان داد که افزودن Vit D3 به داربست PCL/Gel/nHA باعث اتصال و تکثیر بیشتر سلول‌ها می‌گردد. همچنین، رنگ‌آمیزی رسوب مواد معدنی داربست‌ها با رنگ Alizarin قرمز، نشان داد که میزان رسوب مواد معدنی در داربست PCL/Gel/nHA/Vit D3، به طور معنی‌داری بیشتر از داربست‌های دیگر بود ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: خواص برتر نانوذرات هیدروکسی آپاتیت و ویتامین D3 گنجانیده شده در داربست بر پایه‌ی پلی‌کاپرولاکتون/ژلاتین تأیید شد و مشاهدات نشان داد که این داربست کامپوزیتی، می‌تواند کاندیدای مناسبی برای مهندسی بافت استخوان باشد.

واژگان کلیدی: مهندسی بافت، استخوان، نانوذرات هیدروکسی آپاتیت، ویتامین D3

ارجاع: ستاری منصوره، رفیعی‌نیا محمد، خراسانی محمدتقی، صالحی رزوه حسین. مطالعه‌ی رفتار سلولی داربست الکترورسی شده‌ی پلی‌کاپرولاکتون/ژلاتین

حاوی نانوذرات هیدروکسی آپاتیت و ویتامین D3. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۲۵): ۳۸۷-۳۹۲

مقدمه

هر ساله میلیون‌ها نفر از مردم از عیوب استخوانی ناشی از جراحی، تومور و بیماری‌های استخوانی رنج می‌برند و البته بسیاری از مردم به دلیل نبود مواد استخوانی مناسب می‌میرند. مهندسی بافت، استفاده از علوم مهندسی و زیستی برای بازسازی یا جایگزین زیستی برای ترمیم یا تعویض اندام آسیب دیده و بافت از دست رفته می‌باشد (۱). روش‌های بسیاری برای ساخت داربست‌های سه بعدی، جهت مهندسی بافت استخوان وجود دارد که به تازگی از میان همه،

الکترورسی به دلیل سنتز منسوجات بافته نشده‌ی متخلخل، که شبیه به معماری و خواص مکانیکی بافت بومی Extracellular matrix (ECM) است، آسانی روش، تولید الیاف پلیمری بسیار باریک، مساحت سطحی مخصوص بالا و امکان اصلاح زیاد، مورد توجه قرار گرفته است (۲).

پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر مختلفی جهت ساخت داربست‌های مهندسی بافت انتخاب می‌شوند. از این بین، پلی‌کاپرولاکتون (Polycaprolactone یا PCL)، به دلیل سازگاری

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه مهندسی پزشکی، دانشکده‌ی فنی مهندسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

۲- دانشیار، مرکز تحقیقات بیوسنسور، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشیار، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران و گروه مهندسی پزشکی، دانشکده‌ی فنی مهندسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

۴- استادیار، گروه علوم تشریح و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: m_rafienia@med.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: محمد رفیعی‌نیا

روش‌ها

مواد: پلی‌کاپرولاکتون (۸۰ کیلودالتون = MW, Sigma)، ژلاتین (نوع B، از پوست گاو، Merck)، ویتامین D3 (داروسازی زهراوی) و نانوذرات هیدروکسی آپاتیت (نیک سرام رازی) خریداری شدند.

الکتروریسی نانوالیاف: محلول (۱۶ درصد وزنی) PCL در مخلوط حلال‌های کلروفرم/متانول، و ژلاتین (۸ درصد وزنی) در اسید استیک، تهیه شد. PCL و ژلاتین با نسبت حجمی ۷۰:۳۰ مخلوط گردیدند. محلول‌های PCL/Gel/nHA و PCL/Gel/nHA/Vit D3 به ترتیب از مخلوط کردن محلول (۰/۱ میکرولیتر) ویتامین D3 تهیه شدند (۱۱). داربست‌ها با استفاده از روش الکتروریسندگی ساخته شدند.

ریخت‌شناسی داربست‌ها: ریخت‌شناسی و قطر الیاف و درصد تخلخل داربست‌ها به ترتیب با استفاده از دستگاه Scanning electron microscope (SEM) (Philips XL30) و نرم‌افزار Matlab، مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به صورت مقدار میانگین \pm انحراف استاندارد گزارش شد (۱۲).

طیف‌سنجی Fourier transform infrared spectroscopy

(FTIR): تجزیه و تحلیل شیمیایی با استفاده از طیف‌سنجی FTIR (IFS-66 V/S, Bruker, Ettlingen, Germany) در محدوده‌ی عدد موج بین ۴۰۰۰-۴۰۰ سانتی‌متر در دمای اتاق انجام شد (۱۲).

مطالعه‌ی ریخت‌شناسی سلول‌ها بر روی داربست: پس از ۱ و ۷ روز از زمان کشت، داربست‌ها سه بار با Phosphate-buffered saline (PBS) شستشو داده و با گلو تار آلدئید ۳ درصد تثبیت و با اتانول (۵۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد) آب‌گیری شدند. در نهایت، ریخت‌شناسی سلول‌های MG-63 کشت داده شده بر روی هر نمونه، با استفاده از SEM مشاهده شد (۱۳).

رنگ‌آمیزی کلسیم: رنگ‌آمیزی Alizarin قرمز (Sigma-Aldrich) برای تشخیص رسوب کلسیم خارج سلولی در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ بعد از کشت استفاده شد (۱۴). ساختارهای سلول-داربست توسط پارافرمالدهید ۴ درصد، ثابت و پس از آن با ۲ درصد محلول Alizarin قرمز، رنگ‌آمیزی شدند. همچنین، برای اندازه‌گیری کمی مقدار رسوب کلسیم، چگالی نوری محلول در ۵۶۲ نانومتر با استفاده از Micro plate reader، خوانده شد.

بررسی آماری: به منظور بررسی تفاوت معنی‌دار بین داده‌های به دست آمده از آزمون آماری ANOVA (با مقدار $P < 0/05$) استفاده گردید. نتایج آزمایشگاهی به صورت مقدار میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شد.

با اغلب داروها، قیمت پایین و قابلیت حل شدن در بیشتر حلال‌های آلی، مناسب‌تر است، اما فقدان سایت‌های شناسایی سلولی سطحی و آب‌دوستی ضعیف، استفاده از این پلیمر را برای چسبندگی، تکثیر و تمایز سلولی محدود می‌سازد. از این رو، ترکیب این پلیمر با پلیمرهای طبیعی مانند ژلاتین (Gelatin یا Gel) مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳). اولین تلاش موفقیت‌آمیز الکتروریسی مخلوط PCL/Gel، چند سال پیش توسط انجام شد (۴). انجام تحقیقات ثابت کرد که با افزودن ژلاتین، تکثیر و نفوذ سلولی نسبت به داربست PCL خالص سنتزی، به طور قابل توجهی افزایش یافته است (۴).

به تازگی، Gautam و همکاران گزارش دادند که افزودن ژلاتین به داربست PCL برای اتصال و تکثیر سلول‌ها سودمند است (۵). در واقع، تکثیر سلول‌ها بر روی داربست کامپوزیتی PCL/Gel در مقایسه با PCL خالص، افزایش داشته است. عدم زیست‌فعالی PCL، به یک نگرانی در مورد این پلیمر تبدیل شده است؛ چرا که در آن، بافت استخوان جدید نمی‌تواند با سطح پلیمر اتصال محکمی برقرار کند (۶). بنابراین، ترکیبی از نانوذرات هیدروکسی آپاتیت (nHA یا Nano-hydroxyapatite) و PCL می‌تواند مشکلات مختلف از جمله زیست‌فعالی، زیست تخریب‌پذیری و استحکام مکانیکی را که برای مهندسی بافت استخوان مفید است، حل کند (۷).

Causa و همکاران، کامپوزیت‌های nHA/PCL را مورد ارزیابی قرار دادند. تهیه‌ی کامپوزیت با درصد‌های مختلفی از HA صورت گرفت. تا ۱۳ درصد از HA، ذرات به طور کامل دیسپرس شدند، اما با افزایش درصد ذرات، توزیع آن‌ها در کامپوزیت ناهمگن شد. خواص مکانیکی، ساختاری، زیست‌سازگاری و Osteoconductivity، مورد ارزیابی قرار گرفت. با افزایش HA بین ۲۰-۳۰ درصد، مدول الاستیک افزایش می‌یافت. آن‌ها ادعا کردند که تعادل دقیقی بین خواص مکانیکی و ساختار کامپوزیت و فعالیت زیستی آن وجود دارد (۸).

بازسازی استخوان، فرایند پویایی است که سلول‌های استئوبلاست و استئوکلاست، آن را هماهنگ می‌کنند و پس از جذب، مرحله‌ی شکل‌گیری استخوان رخ می‌دهد. ناهماهنگی و عدم توازن در این فرایند، می‌تواند منجر به کمبود چگالی و پوکی استخوان شود. ویژگی بارز و نمونه‌ی کمبود ویتامین D، اختلال در شکل‌گیری و مینرالی شدن استخوان می‌باشد. ویتامین D برای تنظیم مواد معدنی کلسیم و فسفر در بدن مورد نیاز است و نقش مهمی در حفظ ساختار مناسب استخوان، ایفا می‌کند (۹-۱۰). هدف از انجام این مطالعه، ساخت داربست PCL/Gel/nHA/Vit D3، به روش الکتروریسی و بررسی ساختار الیاف، ریخت‌شناسی سلول‌های کشت داده شده و میزان رسوب کلسیم بر روی داربست، برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان بود.

یافته‌ها

ریخت شناسی نانوالیاف: برای تولید الیاف صاف و بدون بید، پارامترهای مختلفی نظیر غلظت محلول‌های پلیمری، ولتاژ اعمال شده، فاصله‌ی بین سوزن و جمع کننده، نرخ جریان محلول پلیمری و نسبت پلیمر در محلول مؤثر هستند و ریخت‌شناسی نانوالیاف الکترورسی شده به این پارامترها بستگی دارد. این پارامترها، با استفاده از شرایط بهینه‌ای شامل ولتاژ ۱۸ کیلو ولت، نرخ جریان محلول پلیمری ۱ میلی لیتر بر ساعت، فاصله‌ی سوزن تا جمع کننده‌ی ۱۳ سانتی متر به دست آمد (۳).

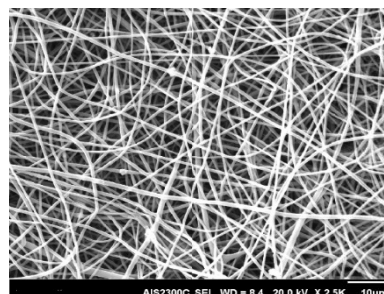
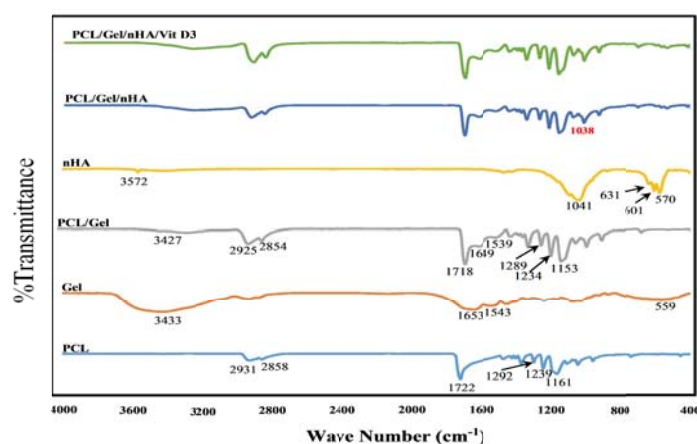
تصویر SEM داربست کامپوزیتی PCL/Gel/nHA/Vit D3 در شکل ۱ آمده است. ساختار نانوالیاف PCL/Gel/nHA/Vit D3، از الیاف منفرد، یکنواخت و تصادفی با قطر متوسط حدود ۵۳۱ نانومتر و میانگین تخلخل و اندازه‌ی منافذ به ترتیب ۸۰/۶۲ درصد و ۶/۸۳ میکرومتر تشکیل شده بود. همچنین، nHA به خوبی و با موفقیت در طول الیاف گنجانیده شد. در کل، برای داربست نانوکامپوزیتی PCL/Gel/nHA/Vit D3، ریخت‌شناسی صاف و بدون بید با قطر الیاف یکنواخت و میزان تخلخل بهینه با اندازه‌ی مناسب مشاهده شد.

طیف‌سنجی FTIR: نتایج تجزیه و تحلیل شیمیایی FTIR، برای توصیف گروه‌های عاملی در داربست کامپوزیتی PCL/Gel/nHA/Vit D3 در شکل ۱ (سمت چپ)، ارائه شده است. طیف FTIR مربوط به داربست کامپوزیتی PCL/Gel، تمام باندهای مشخصه‌ی مربوط به PCL (پیک‌های 2931 cm^{-1} و 2858 cm^{-1} ، 2854 cm^{-1} و 2925 cm^{-1} ، 1718 cm^{-1} و 1653 cm^{-1})، پیک قوی در موقعیت 1722 cm^{-1} ، متعلق به C=O، پیک 1161 cm^{-1} ، مربوط به گروه (C-O-C) و Gel (در موقعیت‌های 3433 cm^{-1} ، 3233 cm^{-1} ، 1653 cm^{-1} ، 1543 cm^{-1} ، 1292 cm^{-1} ، 1239 cm^{-1} ، 1153 cm^{-1} ، 1041 cm^{-1} ، 631 cm^{-1} و 570 cm^{-1})، تمام باندهای مشخصه‌ی مربوط به nHA (پیک‌های 3572 cm^{-1} ، 1038 cm^{-1})، پیک 1041 cm^{-1} در طیف مربوط به HA بود که به سمت عدد موج پایین تر میل پیدا کرده است. ظاهر شدن همه‌ی قله‌های مشخصه‌ی مربوط به PCL، ژلاتین و nHA در نانوالیاف کامپوزیتی PCL/Gel/nHA، تأیید کننده‌ی اختلاط موفق nHA در داربست کامپوزیتی PCL/Gel، می‌باشد (۳).

1543 cm^{-1} و 559 cm^{-1}) را نشان داد که البته این پیک‌ها با کمی شیفت به سمت عدد موج‌های کمتر از طیف اصلی خود، قابل مشاهده هستند (۴). کاهش عدد موج پیک‌های طیف FTIR مربوط به داربست کامپوزیتی PCL/Gel، نسبت به پیک‌های اصلی خود، می‌تواند به دلیل برخی تعاملات مولکولی بین PCL و ژلاتین باشد. طیف FTIR مربوط به PCL/Gel/nHA، تمام باندهای مشخصه‌ی مربوط به PCL/Gel و nHA واقع در 570 cm^{-1} و 601 cm^{-1} (متعلق به $\nu_4\text{PO}_4$)، 631 cm^{-1} (متعلق به حالت آزاد پیوند هیدروژنی یون OH)، 1041 cm^{-1} (مربوط به $\nu_3\text{PO}_4$) و 3572 cm^{-1} (متعلق به حالت کششی پیوند هیدروژنی یون OH) را نشان داد؛ با این تفاوت که پیک 1038 cm^{-1} مشاهده شده در طیف PCL/Gel/nHA، پیک 1041 cm^{-1} در طیف مربوط به HA بود که به سمت عدد موج پایین تر میل پیدا کرده است. ظاهر شدن همه‌ی قله‌های مشخصه‌ی مربوط به PCL، ژلاتین و nHA در نانوالیاف کامپوزیتی PCL/Gel/nHA، تأیید کننده‌ی اختلاط موفق nHA در داربست کامپوزیتی PCL/Gel، می‌باشد (۳).

با مقایسه‌ی طیف FTIR داربست PCL/Gel/nHA و PCL/Gel/nHA/Vit D3 مشاهده شد که هیچ تفاوتی بین این دو طیف وجود ندارد که این موضوع را می‌توان به میزان کم ویتامین D3 استفاده شده در این داربست کامپوزیتی نسبت داد.

ریخت‌شناسی و چسبندگی سلول‌ها: برای مطالعه‌ی رفتار چسبندگی سلول‌های کشت داده شده بر روی داربست‌ها، تصاویر SEM بعد از ۱ و ۷ روز از زمان کشت، مطالعه شد (شکل ۲). تصاویر SEM نشان داد که سلول‌های MG-63 به خوبی روی داربست‌های مختلف تکثیر یافتند. در روز اول، سلول‌ها سطح



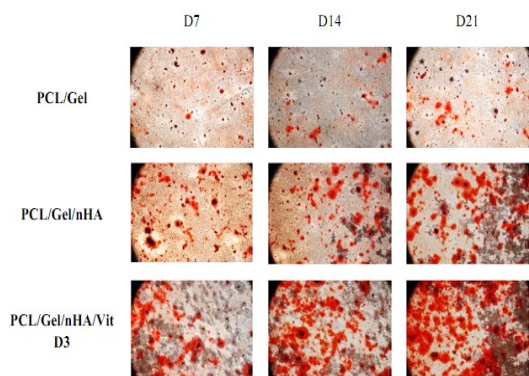
شکل ۱. (راست) تصویر Scanning electron microscope (SEM) داربست کامپوزیتی PCL/Gel/nHA/Vit D3 و (چپ) طیف

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) نانوالیاف Polycaprolactone/gelatin/nano-hydroxyapatite

(PCL/Gel/nHA) و PCL/Gel، PCL/Gel/nHA/Vit D3

در سطح ماتریس نانوالیاف PCL/Gel مخلوط شده با nHA و ویتامین D3، نشان داد (۱۵).

رنگ‌آمیزی کلسیم: رسوب مواد معدنی ماتریکس به عنوان یک رویداد مهم در طول تمایز استئوبلاست، در نظر گرفته می‌شود (۱۳). رنگ‌آمیزی توسط Alizarin قرمز برای تمام داربست‌ها پس از ۷، ۱۴ و ۲۱ روز پس از کشت انجام شد (شکل ۳). رنگ‌آمیزی Alizarin قرمز داربست‌ها پس از ۷ روز، معدنی شدن را در تمام داربست‌ها تأیید می‌کند که البته میزان آن‌ها کم است. رنگ‌آمیزی رسوب مواد معدنی در داربست PCL/Gel برای روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ همانند یکدیگر بود و تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها وجود نداشت ($P \leq 0/050$). با گذشت زمان، رسوب کلسیم در دو داربست PCL/Gel/nHA و PCL/Gel/nHA/Vit D3 افزایش یافت. رنگ‌آمیزی سلول‌ها با Alizarin قرمز ۱۴ و ۲۱ روز پس از کشت، نشان داد که میزان رسوب کلسیم در ماتریس PCL/Gel/nHA/Vit D3 به طور معنی‌داری بیشتر از داربست PCL/Gel/nHA در همان دوره بوده است ($P \leq 0/050$). این نتایج را می‌توان به دلیل حضور nHA و Vit D3 در داربست‌ها دانست که منجر به افزایش رسوب کلسیم شده است (۱۶).

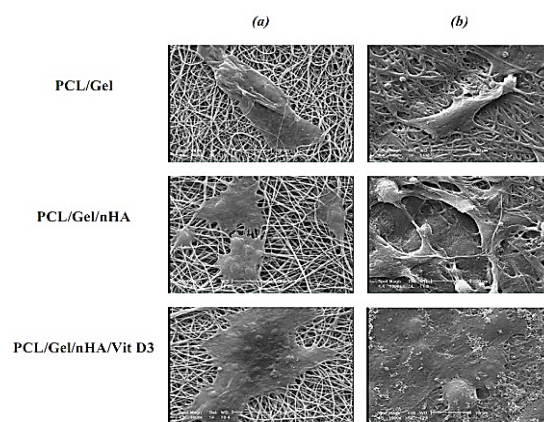


شکل ۳. جذب Alizarin قرمز سلول‌های MG-63 بر روی داربست‌های (PCL/Gel) Polycaprolactone/gelatin و (PCL/Gel/nHA) PCL/Gel/nano-hydroxyapatite (PCL/Gel/nHA/Vit D3) PCL/Gel/nHA/Vitamone D3 بعد از ۷، ۱۴ و ۲۱ روز از کشت در بزرگ‌نمایی $\times 40$

بحث

در این مطالعه، داربست‌های کامپوزیتی بر پایه‌ی PCL/Gel حاوی نانوذرات هیدروکسی آپاتیت و ویتامین D3 با استفاده از روش الکتروریسی، تهیه و خواص آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به مطالعات صورت گرفته، مشخص شد که داربست PCL/Gel/nHA دارای ریزساختاری متخلخل و همگن، با اندازه‌ی تخلخل مناسب برای چسبندگی، تکثیر، رشد درونی و مهاجرت سلول‌های استئوبلاست است.

متخلخل داربست‌های PCL/Gel/nHA و PCL/Gel/nHA/Vit D3 را پوشاندند و با پای کاذب خود در حال گسترش بودند که این موضوع، چسبندگی و فعالیت بهتر این داربست‌ها را در مقایسه با داربست PCL/Gel نشان می‌دهد. با این حال، داربست PCL/Gel/nHA/Vit D3 چسبندگی سلولی بیشتری را در مقایسه با داربست PCL/Gel/nHA نشان داد. تصاویر SEM، گسترش خوبی از سلول‌ها را روی داربست PCL/Gel/nHA/Vit D3 نشان داد که نشان دهنده‌ی اتصال و نفوذ خوب به سطح داربست و ریخت‌شناسی طبیعی و متراکم بعد از ۱ روز بود. در داربست‌های کامپوزیتی، سلول‌ها به سطح متصل شدند، اما نفوذ آن‌ها به داخل ماتریس محدود بود.



شکل ۴. ریخت‌شناسی سلول‌های MG-63 کشت داده شده روی داربست‌های (PCL/Gel) Polycaprolactone/gelatin، (PCL/Gel/nHA) PCL/Gel/nano-hydroxyapatite و (PCL/Gel/nHA/Vit D3) PCL/Gel/nHA/Vitamone D3 ۱ روز (a) و ۷ روز بعد از کشت (b) در بزرگ‌نمایی $\times 1000$

پس از ۷ روز، تصاویر مربوط به شکل ۲، مهاجرت سلول‌ها به سمت داخل نانوالیاف ماتریس و تشکیل بافت را نشان می‌دهد. سلول‌ها در امتداد سطح شبکه‌ی الیاف، تکثیر یافتند و به سرعت در تمام نمونه‌ها، به خصوص در داربست کامپوزیتی با محتوای nHA و ویتامین D3، گسترش یافتند و سلول‌ها میزان تکثیر بالاتری را در مقایسه با داربست PCL/Gel نشان دادند.

در روز هفتم، تصاویر SEM تراکم سلولی بالاتری را در داربست PCL/Gel/nHA/Vit D3 به نمایش گذاشت. حضور ذرات nHA در سطح داربست PCL/Gel/nHA، باعث افزایش مساحت سطحی و زبری سطح می‌گردد که به ارتقای چسبندگی و تکثیر سلول‌ها کمک می‌کند. این نتایج، مهاجرت خوب سلولی و Osteoconductivity داربست، افزایش مداوم در تجمع سلول‌ها در داربست و توانایی داربست برای حمایت از رشد سلول در طول ۷ روز از زمان کشت را

رنگ آمیزی رسوب مواد معدنی سلول‌ها با رنگ Alizarin قرمز بعد از ۲۱ روز از کشت نشان داد که رسوب کلسیم، زمانی که سلول‌ها در ماتریس PCL/Gel/nHA/Vit D3 رشد داده شدند، به طور معنی داری بیشتر از داربست‌های دیگر بود.

ریخت‌شناسی الیاف، نرخ بالای تکثیر، چسبندگی سلولی مناسب و ویژگی‌های ریخت‌شناسی سلول‌های استئوبلاست بر روی داربست PCL/Gel/nHA/Vit D3، خواص برتر هیدروکسی آپاتیت و ویتامین D3 گنجانیده شده در داربست بر پایه‌ی PCL/Gel را تأیید کردند و مشاهدات نشان دادند که این داربست کامپوزیتی، می‌تواند گزینه‌ی مناسبی برای مهندسی بافت استخوان باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از تمامی استادان، همکاران و اشخاصی که در انجام این تحقیق به هر نحوی مشارکت داشتند، به ویژه آقای دکتر مازیار ابراهیمیان، تشکر و سپاسگزاری می‌گردد.

قطر نانوالیاف داربست PCL/Gel/nHA برابر ۵۳۱ نانومتر و اندازه‌ی متوسط تخلخل این داربست کامپوزیتی ۶/۰۲ میکرومتر بود که برای چسبندگی، رشد درونی و تکثیر سلول‌های استئوبلاست مناسب می‌باشد. میزان تخلخل متوسط این داربست کامپوزیتی ۸۰/۱۱ درصد به دست آمد. تصاویر SEM، نشان دادند که سلول‌های MG-63 سطح متخلخل داربست PCL/Gel/nHA/Vit D3 را پوشاندند و با پای کاذب خود گسترش یافتند که این موضوع، چسبندگی و فعالیت بهتر این داربست را در مقایسه با داربست‌های دیگر نشان می‌دهد. حضور ذرات nHA در سطح داربست PCL/Gel/nHA، افزایش مساحت سطحی و همچنین، زبری سطح را که به ارتقای چسبندگی و تکثیر سلول‌ها کمک می‌کند، به همراه دارد. این نتایج، مهاجرت خوب سلولی و Osteoconductivity داربست، افزایش مداوم در تجمع سلول‌ها در داربست و توانایی داربست برای حمایت از رشد سلول در طول ۷ روز از زمان کشت را در سطح ماتریس نانوالیاف PCL/Gel مخلوط شده با nHA و ویتامین D3، نشان داد.

References

- Vasita R, Katti DS. Nanofibers and their applications in tissue engineering. *Int J Nanomedicine* 2006; 1(1): 15-30.
- Khorshidi S, Solouk A, Mirzadeh H, Mazinani S, Lagaron JM, Sharifi S, et al. A review of key challenges of electrospun scaffolds for tissue-engineering applications. *J Tissue Eng Regen Med* 2016; 10(9): 715-38.
- Vatankhah E, Semnani D, Prabhakaran MP, Tadayon M, Razavi S, Ramakrishna S. Artificial neural network for modeling the elastic modulus of electrospun polycaprolactone/gelatin scaffolds. *Acta Biomater* 2014; 10(2): 709-21.
- Chong EJ, Phan TT, Lim IJ, Zhang YZ, Bay BH, Ramakrishna S, et al. Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution. *Acta Biomater* 2007; 3(3): 321-30.
- Gautam S, Dinda AK, Mishra NC. Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2013; 33(3): 1228-35.
- Venkatesan J, Kim SK. Nano-hydroxyapatite composite biomaterials for bone tissue engineering--a review. *J Biomed Nanotechnol* 2014; 10(10): 3124-40.
- Chen JP, Chang YS. Preparation and characterization of composite nanofibers of polycaprolactone and nanohydroxyapatite for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011; 86(1): 169-75.
- Causa F, Netti PA, Ambrosio L, Ciapetti G, Baldini N, Pagani S, et al. Poly-epsilon-caprolactone/hydroxyapatite composites for bone regeneration: in vitro characterization and human osteoblast response. *J Biomed Mater Res A* 2006; 76(1): 151-62.
- Lien YH, Wu JH, Liao JW, Wu TM. In vitro evaluation of the thermosensitive and magnetic nanoparticles for the controlled drug delivery of vitamin D3. *Macromol Res* 2013; 21(5): 511-8.
- Curtis KM, Aenlle KK, Roos BA, Howard GA. 24R,25-dihydroxyvitamin D3 promotes the osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Mol Endocrinol* 2014; 28(5): 644-58.
- Liu H, Ding X, Zhou G, Li P, Wei X, Fan Y. Electrospinning of nanofibers for tissue engineering applications. *J Nanomater* 2013; 2013: 495708.
- Neppalli R, Marega C, Marigo A, Bajgai MP, Kim HY, Causin V. Improvement of tensile properties and tuning of the biodegradation behavior of polycaprolactone by addition of electrospun fibers. *Polymer* 2011; 52(18): 4054-60.
- Tetteh G, Khan AS, Delaine-Smith RM, Reilly GC, Rehman IU. Electrospun polyurethane/hydroxyapatite bioactive Scaffolds for bone tissue engineering: The role of solvent and hydroxyapatite particles. *J Mech Behav Biomed Mater* 2014; 39: 95-110.
- Jaiswal AK, Chhabra H, Soni VP, Bellare JR. Enhanced mechanical strength and biocompatibility of electrospun polycaprolactone-gelatin scaffold with surface deposited nano-hydroxyapatite. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2013; 33(4): 2376-85.
- Hong S, Kim G. Fabrication of electrospun polycaprolactone biocomposites reinforced with chitosan for the proliferation of mesenchymal stem cells. *Carbohydr Polym* 2011; 83(2): 940-6.
- Geng S, Zhou S, Bi Z, Glowacki J. Vitamin D metabolism in human bone marrow stromal (mesenchymal stem) cells. *Metabolism* 2013; 62(6): 768-77.

Study of Cell Behavior of the Electrospun Polycaprolactone/Gelatin Scaffold Containing Nano-hydroxyapatite and Vitamin D3

Mansoureh Sattary¹, Mohammad Rafienia², Mohammad Taghi Khorasani³, Hossein Salehi-Rozve⁴

Original Article

Abstract

Background: Scaffold, an essential element of tissue engineering, should provide proper physical and chemical properties and evolve suitable cell behavior for tissue regeneration.

Methods: Polycaprolactone/gelatin-based nanocomposite scaffolds containing nano-hydroxyapatite and vitamin D3 was fabricated using the electrospinning method. To obtain suitable properties, solution and process parameters were optimized. Fiber morphology and MG-63 cells were cultured; chemical interactions between molecules forming scaffold and the amount of mineral deposition were determined via scanning electron microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and alizarin red staining, respectively.

Findings: The mean diameter of PCL/Gel/nHA/Vit D3 nanofibers was about 531 nm. The culture of osteoblast cells on the scaffolds showed that the addition of Vit D3 to PCL/Gel/nHA scaffold caused further attachment and proliferation of the cells. In addition, stained mineral deposits scaffolds with alizarin red staining showed that the amount of mineralized deposits was significantly higher in PCL/Gel/nHA/Vit D3 scaffold than other scaffolds ($P < 0.05$).

Conclusion: Superior properties of nano-hydroxyapatite and vitamin D3 blended in polycaprolactone/gelatin-based scaffold were confirmed. The observations also revealed that the composite scaffold could be a good candidate for bone tissue engineering.

Keywords: Bone, Tissue engineering, Nano-hydroxyapatite-collagen, Vitamin D3

Citation: Sattary M, Rafienia M, Khorasani MT, Salehi-Rozve H. Study of Cell Behavior of the Electrospun Polycaprolactone/Gelatin Scaffold Containing Nanohydroxyapatite and Vitamin D3. J Isfahan Med Sch 2017; 35(425): 387-92.

1- PhD Student, Department of Biomedical Engineering, School of Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Associate Professor, Biosensor Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Associate Professor, Iran Polymer and Petrochemical Institute AND Department of Biomedical Engineering, School of Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

4- Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Mohammad Rafienia, Email: m_rafienia@med.mui.ac.ir