



ساخت داربست نانوفیبر هیبریدی PCL/PLGA با قابلیت رهایش کنترل شده انسولین به منظور کاربرد آن در مهندسی بافت غضروف

عارفه بصیری^۱، قاسم عموعابدینی^{۲*}، محمد واسعی^۳، مسعود سلیمانی^۴

۱- کارشناسی ارشد مهندسی پزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲- دانشیار گروه مهندسی علوم زیستی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- دانشیار گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، تهران، ایران

۴- دانشیار گروه هماتولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۶/۲۴

چکیده

مقدمه: پلی لاکتیک کوگلایکولیک اسید (PLGA) و پلی کاپرولاکتون (PCL) از پلیمرهایی می‌باشند که در زمینه رهایش دارو و ساخت داربست‌های مهندسی بافت مورد توجه قرار گرفته‌اند. هدف از این مطالعه ساخت داربست نانوفیبر هیبریدی PCL/PLGA است که بتواند علاوه بر ایجاد بستری مناسب برای اتصال و رشد سلول‌ها به عنوان حاملی برای رهایش کنترل شده انسولین در دوره زمانی معین عمل کند.

روش بررسی: سلول‌های کندروسیت از بافت غضروف تیغه بینی با استفاده از آنزیم کلاژناز جداسازی و به صورت تک لایه کشت داده شد، سپس سلول‌های پاساژ سوم بر روی داربست‌ها کاشته شدند. میزان رهایش انسولین از داربست نانوفیبر هیبریدی PCL/PLGA در طی ۲۲ روز به وسیله تست رادیوایمنی (RIMA) به دست آمد. چسبندگی، پراکندگی و مورفولوژی سلول‌ها به وسیله رنگ‌آمیزی بافتی H&E و رنگ آمیزی آلیشیان بلو بررسی شد.

نتایج: داربست نانوفیبر هیبریدی PCL/PLGA دارای رهایش آهسته و مداوم انسولین در طی سه هفته می‌باشد. کندروسیت‌ها به طور یکنواخت در سراسر داربست پراکنده شده‌اند به خوبی به درون حفرات داربست فرورفته‌اند و مورفولوژی گرد خود را حفظ کرده‌اند.

نتیجه‌گیری: بنابراین داربست نانوفیبر هیبریدی PCL/PLGA بستر مناسبی را برای رشد کندروسیت‌ها به منظور تشکیل بافت مهندسی شده غضروفی فراهم می‌کند.

واژه‌های کلیدی: مهندسی بافت، رهایش کنترل شده، انسولین، پلیمر PLGA، کندروسیت، نانوفیبر

* (نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۳۳۱-۲۵۱۲۲۳۴، پست الکترونیکی: amoabediny@ut.ac.ir

مقدمه

هدف مهندسی بافت، تولید اجزای بیولوژیک برای تولید یا جایگزینی بافت آسیب دیده است و به این منظور به سه عامل نیاز می‌باشد: سلول مناسب، داربست مناسب و عوامل رشد و محرک‌های تمایز به منظور رسیدن به دودمان مناسب. بیشتر استراتژی‌ها برای مهندسی بافت غضروف بر پایه زیست مواد قابل جذب به عنوان داربست موقت برای نگهداری کندروسیت‌ها یا سلول‌های بنیادی استوار می‌باشد(۱). داربست‌ها به صورت الگویی سه بعدی برای اتصال سلول‌ها و تشکیل بافت در محیط آزمایشگاه یا بدن استفاده می‌شوند(۲)، همچنین می‌توانند به عنوان حامل‌هایی برای رهایش کنترل شده مولکول‌های زیست فعال در بافت‌های مهندسی شده بکار روند. آنها سلول‌ها را هدایت می‌کنند تا رشد کرده، ماتریکس خارج سلولی و سایر مولکول‌های بیولوژیکی را تهیه کنند و تشکیل بافت عمل کننده و یا عضو خاص را سهولت بخشند(۳). داربست‌ها باید با سلول‌ها برهم کنش مثبت داشته باشند تا سبب افزایش عملکردهای چسبندگی، رشد، مهاجرت و تقسیم سلولی شوند. یکی از عوامل تعیین کننده برهم کنش داربست با سلول‌ها میزان آبدوستی - آبریزی سطح داربست می‌باشد که میزان چسبندگی، گسترش و رشد سلول‌ها بر روی سطوحی با میزان آبدوستی متعادل (صرف نظر از نوع سلول مورد استفاده) نسبت به سطوح خیلی آبدوست یا خیلی آبریز، بیشتر است(۴). پلی‌گلایکولیک اسید (PGA: Poly Glycolic Acid)، پلی‌لاکتیک اسید (PLA: Poly Lactic Acid) و کوپلیمر پلی‌لاکتید کوگلایکولیک اسید (PLGA: Poly Lactic Acid-co-Glycolic Acid) از خانواده پلی‌استرهای آلیفاتیک خطی و پلیمرهای زیستی سنتزی هستند که به علت خاصیت زیست تخریب پذیری قابل کنترل و تأیید شدن در موسسه غذا و دارو در آمریکا (FDA: Food and Drug Administration) در ساخت داربست‌های موقت مهندسی بافت و سامانه‌های دارورسانی بیشترین استفاده را دارند(۵-۹). این پلیمرها به علت خاصیت کندروژنز در ساخت داربست‌های مهندسی بافت غضروف نیز به کار رفته است(۱۰-۱۵). پلی‌استرهای آلیفاتیک خطی دیگری

مثل پلی‌کاپرولاکتون (PCL: Poly Capro Lactone) نیز در مهندسی بافت استفاده می‌شوند. PCL نرخ تخریب آهسته‌تری نسبت به PLA، PGA و PLGA دارد. نرخ تخریب آهسته PCL برای کاربرد در کاشتنی‌های طولانی مدت و رهایش کنترل شده طولانی مدت استفاده زیادی دارد. PCL به علت خاصیت کندروژنز و استحکام مکانیکی در مهندسی بافت غضروف استفاده شده است(۱۶-۱۹). همچنین PCL همراه با پلیمرهایی با نرخ تخریب سریع‌تر مانند PLGA در ساخت داربست مهندسی بافت بکار رفته است(۲۰). در طراحی داربست بهتر است از برخی ویژگی‌های خاص ماتریکس خارج سلولی تقلید شود. به خوبی مشخص است که بسیاری از مولکول‌های بیولوژیکی، اجزای ماتریکس خارج سلولی و سلول‌ها در مقیاس نانو برهم کنش دارند. بنابراین طراحی داربست‌های سنتزی با مشخصات نانو از جنبه‌های جدید و کارآمد در مهندسی بافت است(۳). در میان نانو ساختارها، نانوالیاف به علت ساختار پیوسته‌شان در مقایسه با نانوذرات برای استفاده به عنوان جزء اصلی یک داربست مناسب‌تر هستند. مزیت داربست متشکل از الیاف پیوسته فوق ریز، تخلخل زیاد، توزیع متغیر اندازه حفرات، نسبت بالای سطح به حجم و از همه مهم‌تر شباهت به ماتریکس خارج سلولی طبیعی است. بنابراین سبب تسهیل در چسبندگی سلول‌ها شده و به رشد آنها کمک می‌کنند(۲۱). ترکیب خواص فوق داربست‌های نانوالیافی را برای مهندسی بافت مناسب کرده است(۲۲).

الکترورسی فرآیندی جهت تولید انواع نانوالیاف و میکروالیاف از محلول‌های مواد پلیمری، سرامیکی و یا محلول‌های کامپوزیتی متشکل از پلیمر - نانوذرات و همچنین مذاب‌های مواد مذکور می‌باشد. داربست‌های نانوالیاف الکترورسی شده شامل حفرات متصل به هم هستند و پایداری مکانیکی و ساختاری دارند که سبب ارجحیت آنها در برابر داربست‌های ساخته شده به روش جدایش فازی و خودآرایی است(۲۳، ۲۲). پلیمرهای مختلفی از جمله PCL، PLGA و PVA به روش الکترورسی برای مهندسی بافت غضروف استفاده شده‌اند(۲۷-۲۴). رشد و تکامل بافت غضروف به شدت به سیگنال‌های بیوشیمیایی

آنها در شرایط تولید بافت جدید نیاز دارد (۳۱،۳۲). تا به حال سیستم‌های مختلفی از جمله هیدروژل‌ها، میکروکپسول‌ها و نانوذرات به عنوان حامل عوامل رشد در مهندسی بافت غضروف به کار رفته‌اند و پلیمرهای مختلفی در ساخت این حامل‌ها استفاده شده است (۲۵،۳۳،۳۴). در میان پلیمرهای مورد استفاده PLGA به علت زیست سازگاری و داشتن تأییدیه FDA در سیستم‌های رهایش دارو و به علت خاصیت کندروژن در مهندسی بافت غضروف به طور گسترده‌ای استفاده شده است (۲۵). هدف از این مطالعه ساخت داربست نانوفیبر هیبریدی PCL/PLGA است که بتواند علاوه بر ایجاد بستری مناسب برای اتصال و رشد سلول‌ها، به عنوان حامی برای رهایش کنترل شده انسولین در دوره زمانی معین عمل کند.

روش بررسی

داربست نانوفیبر هیبریدی PCL/PLGA به روش الکترورسی و با استفاده از دو نازل سنتز شد.

به منظور تهیه محلول PCL، مقدار ۱/۲ گرم PCL به مدت چهار ساعت در ۷/۵ میلی‌لیتر کلروفرم و ۲/۵ میلی‌لیتر DMF در دور ۱۰۰ rpm روی همزن مغناطیسی حل شد.

به منظور تهیه محلول PLGA حاوی انسولین، مقدار ۰/۵ گرم PLGA به مدت چهار ساعت در ۵/۲۵ میلی‌لیتر کلروفرم در دور ۱۰۰ rpm روی همزن مغناطیسی حل شد. سپس ۱/۷ میلی‌لیتر دی‌متیل‌فرمامید (DMF) به این ترکیب اضافه شد و به مدت یک ساعت همزده شد. مقدار چهار میلی‌گرم انسولین در ۶۰ میکرولیتر PBS حل شد و به مدت ۲۰ دقیقه ورتکس شد. محلول انسولین حاصل به محلول PLGA در حالت هم خوردن اضافه شد و به مدت یک ساعت در دور ۱۰۰۰ rpm همزده شد.

جهت تهیه داربست حاوی انسولین هر یک از محلول‌های PCL و PLGA-انسولین در سرنگ‌های جداگانه کشیده شد و پس از اتصال سر سرنگ‌ها به کانکتور، هر کدام در یک سمت دستگاه الکترورسی نصب شدند.

تنظیمات دستگاه الکترورسی برای داربست در جدول یک آورده شده است.

وابسته است. توالی، تداوم و شدت تحریک می‌تواند در این که چطور سلول در محیط بازسازی بافت ترشح ماتریکس داشته باشد، نقش بازی کند. مولکول‌های بیواکتیو شامل عوامل رشد، پروتئین‌های چسبندگی، پپتیدها و هر چیز دیگری است که برای تولید یک پاسخ بیولوژیکی به سلول‌ها متصل می‌شود. عوامل رشد یکی از عوامل بسیار رایج برای افزایش رشد بافت در ساختارهای مهندسی شده می‌باشد. بسیاری از عوامل رشد در تحریک تکثیر سلول و سنتز ماتریکس در غضروف مفصلی در هر دو شرایط *In vitro* و *In vivo* مؤثر هستند (۲۸). انسولین نخستین پروتئینی است که ساختمان کریستالی و توالی اسید آمینه‌های آن مشخص و با روش‌های شیمیایی سنتز شد. همچنین اولین پروتئینی است که با استفاده از روش DNA نوترکیب برای مصارف تجاری تهیه شد و در سال ۱۹۸۲ میلادی به تأیید FDA رسید (۲۹). انسولین به علت مشابهت ساختاری با Insulin like Growth Factor-1 (IGF-1) که یک عامل رشد مؤثر در تکثیر و تمایز کندروسیت‌ها می‌باشد، می‌تواند گیرنده‌های این عامل رشد را در کندروسیت تحریک کند. اخیراً انسولین به علت هزینه کمتر و دسترسی آسان‌تر نسبت به عوامل رشد توجه محققین را برای تشکیل بافت مهندسی شده غضروفی به خود جلب کرده است (۳۰). داربست‌ها می‌توانند به عنوان حامل‌هایی برای رسانش کنترل شده یک مولکول زیست فعال بکار روند. در این تکنولوژی داربست می‌تواند برای مدت معین عامل پروتئینی قابل انتشاری مانند عامل رشد را آزاد کند. اصطلاح رهایش کنترل شده غالباً اشاره به رهایش مولکول‌های زیست فعالی می‌کند که از حالت اتصال یا به دام افتادن رها شده و به وضعیت قابل انتشار تبدیل شوند به طوری که بتوانند عملکرد بیولوژیک خود را اعمال کنند. به عبارت دیگر هدف از رهایش کنترل شده، عرضه مولکول‌های زیست فعال در یک غلظت بهینه است. بدین معنی که غلظت آنها نه آنقدر کم باشد که فاقد اثردهی لازم شود و نه آنقدر زیاد باشد که عوارض سمی ایجاد کند. به علت هزینه بالای عوامل رشد و کوتاه بودن نیمه عمر آنها، مهندسی بافت به حفظ فعالیت زیستی طولانی مدت این عوامل و فراهم کردن مقادیر مورد نیاز

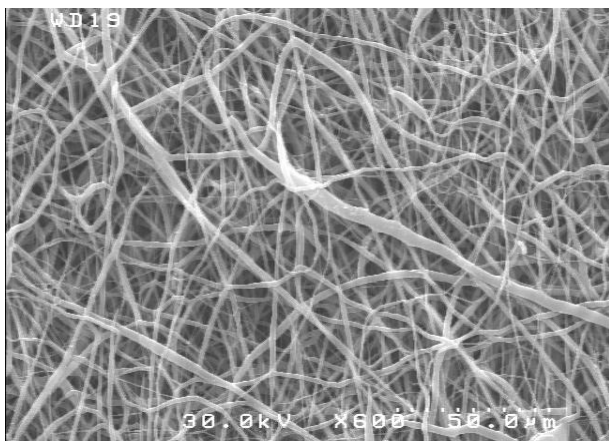
جدول ۱: تنظیمات دستگاه الکترورسی برای ساخت داربست‌های بر پایه PCL/PLGA

زاویه نازل	۴۵ درجه
سرعت نازل	۱۵ میلی متر در دقیقه
سرعت درام	۲۳۰ rpm
فاصله نازل تا جمع کننده برای محلول PLGA	۱۵ سانتی متر
فاصله نازل تا جمع کننده برای محلول PCL	۱۷ سانتی متر
دبی برای محلول PLGA	۰/۷ میلی لیتر در ساعت
دبی برای محلول PCL	۰/۵ میلی لیتر در ساعت
ولتاژ برای هر سه محلول	۲۴ کیلوولت

انسولین موجود در هر نمونه با تست RIMA و با استفاده از دستگاه گاماکانتر (Gama Matic Kantron, Switzerland) بررسی شد. رنگ‌آمیزی‌های بافتی طبق روش‌های معمول رنگ‌آمیزی H&E و آلیشیان بلو انجام شد.

نتایج

داربست هیبریدی PCL/PLGA که به روش الکترورسی تولید شده است دارای دو نوع نانوفیبر با اندازه‌های مختلف می‌باشد که به طور نسبتاً یکنواخت در سراسر داربست توزیع شده‌اند (شکل ۱). قطر الیاف PCL در بازه بین ۷۰۰ تا ۹۰۰ نانومتر می‌باشد در حالی که قطر الیاف PLGA بین ۲۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر است.



شکل ۱: عکس میکروسکوپ الکترونی از داربست نانوفیبری PCL/PLGA قبل از کاشت سلول بر روی آن (Scal bar=50 μm)

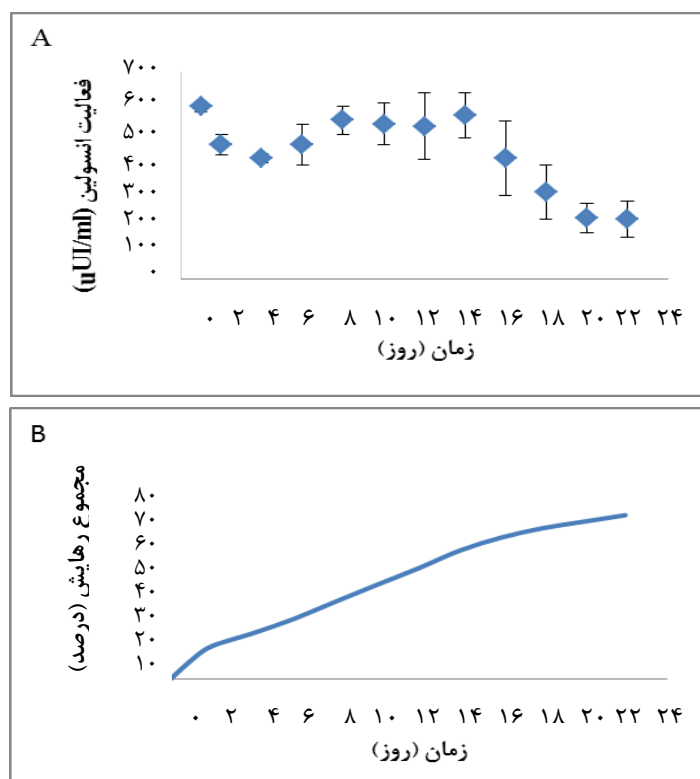
نتایج به دست آمده از تست RIMA که در طی ۲۲ روز انجام گرفته است، به صورت منحنی فعالیت انسولین بر حسب زمان و نمودار سینتیک رهایش انسولین رسم شد (نمودار ۲).

لازم به ذکر است که داربست‌ها بعد از الکترورسی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در آون خشک شدند. داربست‌های PCL/PLGA با پانچ ۱۶mm به صورت دایره برش داده شدند. سپس به مدت دو ساعت در پلیت چهارخانه در اتانول ۷۰٪ قرار گرفت (الکل اتانول از قبل ۷۰٪ تهیه شده و فیلتر شد). قرار گرفتن در الکل برای حذف مواد توکسیک داربست، استریل نمودن داربست و همچنین برای افزایش قطر منافذ آن می‌باشد. بعد از دو ساعت الکل روی داربست‌ها با محیط Low glucose بدون سرم جایگزین شد و به مدت یک تا دو روز درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO₂ ۵٪ قرار گرفت. قرار گرفتن در محیط برای این است که عامل الکل که به درون بافت منفذدار داربست نفوذ کرده است از محیط حذف شود.

جهت اندازه‌گیری رهایش کنترل شده انسولین در طی ۲۲ روز از هر یک از داربست‌های حاوی انسولین سه قطعه به صورت تصادفی انتخاب شد و درون پلیت‌های چهارخانه قرار گرفت. برای اندازه‌گیری رهایش انسولین ۶۰۰ میکرولیتر (PBS: Phosphate Buffered Saline) به هر خانه اضافه شد و پلیت‌ها در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO₂ ۵٪ قرار گرفت. به همان مقدار محلول PBS در پلیت جداگانه‌ای به عنوان کنترل ریخته شد. PBS هر خانه هر دو روز یک بار به مدت ۲۲ روز برداشته شده و در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس به هر خانه PBS جدید اضافه شد و پلیت‌ها مجدداً در انکوباتور قرار گرفت. پس از به دست آمدن همه نمونه‌ها بعد از ۲۲ روز آنها را دفریز کرده و مقدار

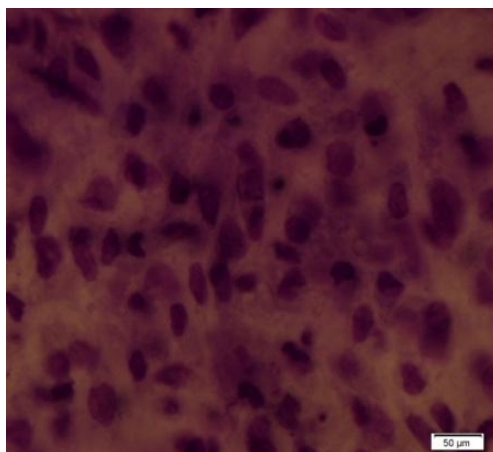
دارای رهایش آهسته و مداوم در طی سه هفته می‌باشد. در اینجا با توجه به نتایج به دست آمده فعالیت زیستی دارو در تمام طول دوره زمانی مورد مطالعه وجود دارد. نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین (H&E) توزیع یکنواخت سلول بر روی داربست را نشان می‌دهد (شکل ۲)

همانطور که در منحنی B مشاهده می‌شود، داربست حاوی انسولین دارای رهایش مداوم انسولین بین $400-600 \mu\text{IU/ml}$ از روز اول تا روز ۱۶ می‌باشد و پس از آن تا روز ۲۱ از میزان آن کاسته می‌شود ولی مقدار آن همواره بیش از $200 \mu\text{IU/ml}$ (18 ng/ml) می‌باشد. با توجه به نمودار یک مشاهده می‌شود که سیستم رهایش انسولین مورد مطالعه



نمودار ۱: رهایش کنترل شده انسولین از نانوفیبر PCL/PLGA.

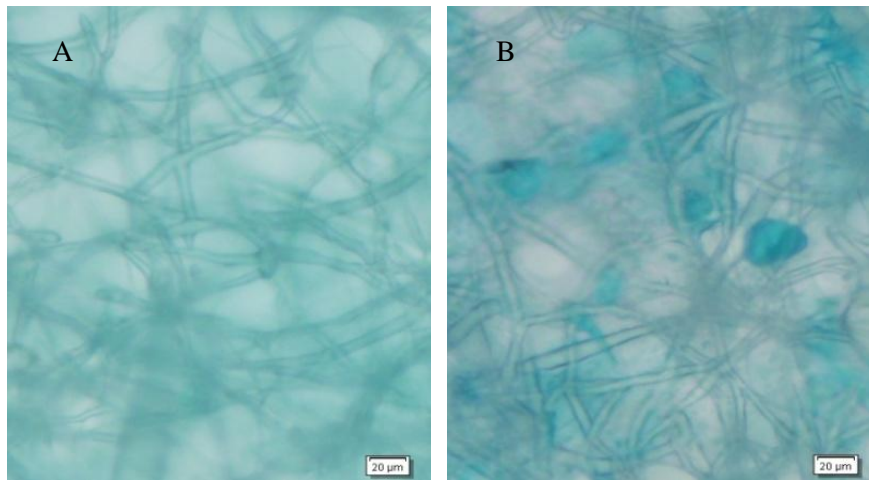
منحنی مربوط به مقدار رهایش انسولین برحسب فعالیت آن در محلول PBS در روزهای مختلف با فاصله زمانی دو روز (A)، منحنی سینتیک رهایش انسولین (B)



شکل ۲: توزیع یکنواخت سلول‌ها بر روی داربست با استفاده از رنگ آمیزی H&E (Scal bar=50 μm)

عکس فرورفتن سلول به درون نانوفیبر و تعامل با آن را تأیید می‌کند (شکل ۳).

در رنگ‌آمیزی آلبانین بلو گلیکوزآمینوگلیکان‌های سولفات‌ها در سیتوپلاسم کندروسیت‌ها به رنگ آبی دیده می‌شوند. این



شکل ۳: رنگ‌آمیزی آلبانین بلو، نفوذ کندروسیت‌ها با مورفولوژی گرد و سیتوپلاسم حاوی گلیکوزآمینوگلیکان‌های سولفات‌ها در درون تخلخل‌های داربست (A) داربست بدون سلول (A)، داربست با سلول (B) (Scal bar=20 μm).

بحث و نتیجه‌گیری

آبدوست مثل پلی‌اتیلن‌اکساید (۳۸)، پلی‌اتیلن‌گلایکول (۳۹)، پلی‌وینیل‌الکل (۳۶) و پوشش‌دهی با پلیمرهای آبدوست (۴۰) می‌باشد. در این مطالعه انسولین به عنوان یک ماده آبدوست در ترکیب داربست به کار رفته است. با توجه به نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی بافتی مشخص است که سلول‌ها به خوبی به داربست هیبریدی سنتزی چسبیده‌اند و در سراسر داربست به طور یکنواخت پراکنده شده‌اند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که انسولین به چسبندگی سلول‌ها به داربست نیز کمک می‌کند.

با توجه به مطالعات انجام شده پیشین مشخص شده است که غلظت‌های ۱-۱۰۰۰ ng/ml انسولین بر تکثیر و تمایز کندروسیت مؤثر است (۴۱). مقدار رهایش نانوفیبر تولید شده در این مطالعه در همین طیف یعنی بین ۲۰۰-۶۰۰ IU/ml قرار دارد.

رهایش ناگهانی (Burst release) در اکثر سیستم‌های رهایش دارویی به علت هدر رفتن مقادیر زیادی از دارو و همچنین اثرات سمی احتمالی آن مطلوب نمی‌باشد و بسیاری از تحقیقات برای جلوگیری از ایجاد این نقص در این سیستم‌ها انجام گرفته است (۴۲). با توجه به نمودار مشاهده می‌شود که

پلی‌استرهای آلیفاتیک خطی مثل PCL و PLGA به طور گسترده در مهندسی بافت استفاده می‌شوند. PLGA، به علت طبیعت مکمل PLA و PGA، برای داربست‌های موقت مهندسی بافت و حامل‌های کوتاه مدت دارو استفاده می‌شوند. PCL به علت نرخ تخریب آهسته برای کاربرد در کاشتنی‌های طولانی مدت و رهایش کنترل شده طولانی مدت استفاده می‌شود. یکی از محدودیت‌های استفاده از PCL و PLGA در تولید دوباره بافت مسئله آبگریزی آن است. به علت اینکه پلیمرهای معمول سنتزی زیست تخریب‌پذیر آبگریز هستند، داربست‌های متخلخل ساخته شده از این پلیمرها در بستر کشت سلول شناور می‌شوند و یا وقتی سلول‌ها در بستر کشت بر روی داربست متخلخل قرار می‌گیرند یا به داخل آن برای کاشته شدن تزریق می‌شوند، اکثر حفرات خالی می‌ماند چون داربست بستر کشت را جذب نمی‌کند. مهم است که توزیع یکنواختی از سلول‌های اولیه کاشته شده در حجم داربست به دست آید (۳۶). تلاش‌هایی برای آبدوست کردن داربست‌های پلیمری زیست تخریب‌پذیر و به دست آوردن کشت سلول متراکم و یکنواخت صورت گرفته است که شامل اکسایش با محلول پرکلریک اسید (۳۷)، ترکیب کردن با پلیمرهای

همکاران با بررسی اثر میکروسفرهای PLGA حاوی انسولین بر کندروسیت‌های استخراج شده از فمور خوک نشان دادند که انسولین موجب القای تکثیر سلول‌ها و تولید ماتریکس خارج سلولی می‌شود (۴۷). در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که رهایش کنترل شده انسولین از یک ستون لیپیدی باعث افزایش وزن تر (Wet weight) ساختارهای ترکیبی پلیمر-کندروسیت (بیش از ۳/۲ برابر) و افزایش مقدار گلیکوز آمینوگلیکان‌ها و کلاژن در ساختار (به ترتیب بیش از ۴/۲ برابر و ۳/۲ برابر) می‌شود (۴۸). Patricia و همکاران نیز اثر انسولین لود شده در داربست حاوی ذرات کیتوزان را بر تمایز کندروسیتی سلول‌های مشتق از بافت چربی (ATDC) با بررسی مورفولوژی سلول، بیان ژنی، محتوای DNA و گلیکوز آمینوگلیکان‌ها به اثبات رساندند (۴۹). در این مطالعه نشان داده شد که نانوفیبرهای PLGA حامل مناسبی برای رهایش کنترل شده هستند، همچنین هیبرید این نانوالیاف با نانوالیاف PCL باعث افزایش طول دوره زمانی رهایش می‌شود. این سیستم رهایش مقدار انسولین مورد نیاز کندروسیت‌ها را به مدت ۲۱ روز تأمین می‌کند. مزیت این سیستم رهایش عدم رهایش ناگهانی در ابتدای دوره است که از ایجاد سمیت و به هدر رفتن دارو جلوگیری می‌کند. انسولین چسبندگی کندروسیت به داربست را افزایش داده و موجب پراکندگی یکنواخت سلول‌ها بر روی داربست شده است. طبق نتایج به دست آمده، مقدار انسولین رهایش یافته از داربست در طی ۲۲ روز در محدوده مورد نیاز سلول‌های غضروفی می‌باشد و با توجه به این که دوره تمایزی سلول‌های غضروفی ۲۱ روزه است و انسولین در فرایند کندروژنز و ترشح ماتریکس غضروفی نیز مؤثر است، در مطالعات بعدی می‌توان اثر این داربست را بر روی تمایز کندروژنیک و تشکیل بافت غضروفی در شرایط درون تن (In vivo) را بررسی نمود. همچنین می‌توان به بررسی اثر این سیستم رهایش بر مهندسی سایر بافت‌های بدن و سیستم‌های دارورسانی به عنوان مثال در درمان دیابت پرداخت.

سیستم رهایش انسولین مورد مطالعه دارای رهایش آهسته و مداوم در طی سه هفته می‌باشد. در مطالعات پیشین مشخص شده است که حفظ فعالیت زیستی دارو و افزایش نیمه عمر آن از موارد قابل توجه در سیستم‌های رهایش دارو می‌باشد (۳۱). در اینجا با توجه به نتایج به دست آمده فعالیت زیستی دارو در تمام طول دوره زمانی مورد مطالعه وجود دارد و این نشان‌دهنده کارایی این سیستم رهایش در حفظ فعالیت زیستی انسولین می‌باشد.

در رابطه با اثر انسولین بر کندروسیت، Garcia و همکاران به بررسی رشد کندروسیت انسانی بر روی داربست نانوفایبر PCL در محیط حاوی سرم (FCM) و محیط حاوی انسولین ترنسفرین سلنیوم (ICM) پرداختند و بر اساس نتایج به دست آمده مشخص شد که بیان ژن کلاژن II در کشت کندروسیت‌های انسانی بر روی داربست PCL بیشتر از کشت تک لایه و کشت پلت (قرصی شکل) این سلول‌ها است. همچنین القای بیان ژن کلاژن II در محیط ICM بیشتر از محیط FCM بوده در صورتی که بیان ژن اگریکان در کشت تک لایه کندروسیت‌ها و در محیط ICM به طور قابل توجهی بیشتر از کشت بر روی PCL و کشت پلت مشاهده شده است. آنها نشان دادند که کندروسیت‌های کاشته شده بر روی داربست‌های PCL کشت شده در ICM به خوبی فنوتیپ تمایزی خود را حفظ کرده و ماتریکس خارج سلولی خاص بافت غضروفی را تولید می‌کنند (۱۶). اثر انسولین موجود در داربست سنتز شده در این مطالعه بر روی کندروسیت، نتایج حاصل از مطالعات پیشین را در مورد حفظ مورفولوژی گرد و فنوتیپ تمایزی سلولی تأیید می‌کند.

در سال‌های اخیر با شناسایی اثر انسولین بر تکثیر و تمایز سلول‌های غضروفی، محققان به بررسی سیستم‌های رهایش انسولین با استفاده از پلیمرهای مختلف به ویژه PLGA و به شکل‌های مختلف از جمله میکروسفر و نانوذرات در مهندسی بافت غضروف پرداختند (۴۳-۴۶). به عنوان مثال Kristian و

References:

- 1- Redman SN, Oldfield SF, Archer CW. *Current strategies for articular cartilage repair*. Eur Cells Mater 2005; 9: 23-32.
- 2- Lee JH, Park TG, Park HS, Lee DS, Lee YK, Yoon SC, et al. *Thermal and mechanical characteristics of poly(l-lactic acid) nanocomposite scaffold*. Biomaterials 2003; 24(16): 2773-78.
- 3- Smith LA, Ma PX. *Nano-fibrous scaffolds for tissue engineering*. Colloids Surf B: Biointerfaces 2004; 39(3): 125-31.
- 4- Lee JH, Lee HB. *A wettability gradient as a tool to study protein adsorption and cell adhesion on polymer surfaces*. J Biomater Sci Polym Ed 1993; 4(5): 467-81.
- 5- Li WJ, Cooper JR, Mauck RL, Tuan RS. *Fabrication and characterization of six electrospinning poly(α -hydroxy ester)-Based fibrous scaffolds for tissue engineering applications*. Acta Biomater 2006; 2(4): 377-85.
- 6- Giteau A, Venier-Julienne MC, Aubert-Pouessel A, Benoit JP. *How to achieve sustained and complete protein release from PLGA-based microparticles?* Int J Pharm 2008; 350(1-2): 14-26.
- 7- Heller J. *Controlled release of biologically active compounds from bioerodible polymers*. Biomaterials 1993; 1(1); 51-57.
- 8- Zong X, Ran S, Kim KS, Fang D, Hsiao BS, Chu B. *Structure and morphology change during in vitro degradation of electrospun poly(glycolid-co-lactid) nanofiber membrane*. Biomacromolecules 2003; 4(2): 416-23.
- 9- Miao X, Tan DM, Li J, Xiao Y, Crawford R. *Mechanical and biological properties of hydroxyapatite/tricalcium phosphate scaffolds coated with poly(lactic-co-glycolic acid)*. Acta Biomater 2008; 4(3): 638-45.
- 10- Uematsu K, Hattori K, Ishimoto Y, Yamauchi J, Habata T, Takakura Y, et al. *Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a three-dimensional poly-lactic-glycolic acid (PLGA) scaffold*. Biomaterials 2005; 26(20): 4273-79.
- 11- Sittiger M, Reitzel D, Dauner M, Hierlemann H, Hammer C, Kastenbauer E, et al. *Resorbable polyesters in cartilage tissue engineering: biocompatibility of polymer fiber structures to chondrocytes*. J Biomed Mater Res 1996; 33(2): 57-63.
- 12- Gang EH, Ki1 CS, Kim JW, Lee J, Cha BG, Lee KH, et al. *Highly porous three-dimensional poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) microfibrillar scaffold prepared by electrospinning method: a comparison study with other PLGA type scaffolds on Its Biological Evaluation*. Fibers and Polymers 2012; 13(6): 685-91.
- 13- Qi Y, Du Y, Li W, Dai X, Zhao T, Yan W. *Cartilage repair using mesenchymal stem cell (MSC) sheet and MSCs-loaded bilayer PLGA scaffold in a rabbit model*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 2014; 22(6): 1424-33.

- 14- Zhou XZ, Leung VY, Dong QR, Cheung KM, Chan D, Lu WW. *Mesenchymal stem cell-based repair of articular cartilage with polyglycolic acid-hydroxyapatite biphasic scaffold*. Int J Artif Organs 2008; 31(6): 480-89.
- 15- Yoo JJ, Kim Hn, Bae EH, Chun HY, Kim HJ. *Culture of human chondrocytes in a macroporous PLGA scaffold for up to sixteen weeks*. Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2011; 8(3): 300-5.
- 16- Garcia-Giralt N, Izquierdo R, Nogue's X, Perez-Olmedilla M, Benito P, Go'mez-Ribelle's JL, et al. *A porous PCL scaffold promotes the human chondrocytes redifferentiation and hyaline-specific extracellular matrix protein synthesis*. J Biomed Mater Res 2008; 85(4): 1082-89.
- 17- Chang KY, Hung LH, Chu IM, Ko CS, Lee YD. *The application of type II collagen and chondroitin sulfate grafted PCL porous scaffold in cartilage tissue engineering*. J Biomed Mater Res 2010; 92(2): 712-23.
- 18- Christensen BB, Foldager CB, Hansen OM, Kristiansen AA, Svend Le DQ, Nielsen AD, et al. *A novel nano-structured porous polycaprolactone scaffold improves hyaline cartilage repair in a rabbit model compared to a collagen type I/III scaffold: in vitro and in vivo studies*. Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy 2012; 20(6): 1692-99.
- 19- Oliveira JT, Crawford A, Mundy JM, Moreira AR, Gomes ME, Hatton PV, et al. *A cartilage tissue engineering approach combining starch-polycaprolactone fibre mesh scaffolds with bovine articular chondrocytes*. Mater Sci Mater Med 2007; 18: 295-302.
- 20- Hiep NT, Lee BT. *Electro-spinning of PLGA/PCL blends for tissue engineering and their biocompatibility*. J Mater Sci Mater Med 2010; 21(6): 1969-78.
- 21- Ma PX. *Scaffolds for tissue fabrication*. Materials Today, Review Feature 2006; 7(5): 30-40.
- 22- Li WJ, Shanti RM, Tuan RS. *Electrospinning technology for nanofibrous scaffolds in tissue engineering*. Nanotechnol Life Sci 2007; 9: 125-44.
- 23- Murugan R, Ramakrishna S. *Nano-featured scaffolds for tissue engineering: a review of spinning methodologies*. Tissue Eng 2006; 12(3): 435-47.
- 24- Liu H, Wang S, Qi N. *Controllable structure, properties, and degradation of the electrospun PLGA/PLA-blended nanofibrous scaffolds*. J Applied Polymer Sci 2012; 125(S2): E468-76.
- 25- Li WJ, Tulia R, Okafora C, Derfoul A, Danielson KG, Halla DJ, et al. *A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells*. Biomaterials 2005; 26(6): 599-609.
- 26- Coburn JM, Gibson M, Monagle S, Patterson Z, Elisseeff JH. *Bioinspired nanofibers support chondrogenesis for articular cartilage repair*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2012; 109(15): 1- 6.
- 27- Ndreu A, Nikkola L, Ylikauppila H, Ashammakhi N, Hasirci V. *Electrospun biodegradable nanofibrous*

- mats for tissue engineering*. Nanomedicine 2008; 3(1): 45-60.
- 28- Athanasion KA, Darling EM, Hu JC. *Articular cartilage tissue engineering*. Morgan & Claypool Publishers; 2009.p. 1-99.
- 29- Khafagy ES, Morishita M, Onuki Y, Takayama K. *Current challenges in non-invasive insulin delivery systems: a comparative review*. Adv Drug Deliv Rev 2007; 59(15): 1521-46.
- 30- Mueller MB, Blunk T, Appel B, Maschke A, Goepferich A, Zellner J, et al. *Insulin is essential for in vitro chondrogenesis of mesenchymal progenitor cells and influences chondrogenesis in a dose-dependent manner*. Int Orthop 2013; 37(1): 153-8.
- 31- Tabata Y. *The importance of drug delivery systems in tissue engineering*. Pharm Sci Technol Today 2000; 3(3): 80-89.
- 32- Lee S, Shin H. *Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering*. Adv Drug Deliv Rev 2007; 59(4-5): 339-59.
- 33- Spiller KL, Liu Y, Holloway JL, Maher SA, Cao Y, Liu W, et al. *A novel method for the direct fabrication of growth factor-loaded microspheres within porous nondegradable hydrogels: controlled release for cartilage tissue engineering*. J Control Release 2012; 157(1): 39-45.
- 34- Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Breton AL, Préat V. *PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications*. Control Release 2012; 161(2): 505-22.
- 35- Jaklenec A, Hinckfuss A, Bilgen B, Ciombor DM, Aaron R, Mathiowitz E. *Sequential release of bioactive IGF-I and TGF- β 1 from PLGA microsphere-based scaffolds*. Biomaterials 2008; 29(10): 1518-25.
- 36- Oh SH, Kang SG, Kim ES, Cho SH, Lee JH. *Fabrication and characterization of hydrophilic poly(lactic-co-glycolic acid)/poly(vinyl alcohol) blend cell scaffolds by melt-molding particulate leaching method*. Biomaterials 2003; 24(22): 4011-21.
- 37- Ju Ym, Oh SH, Lee KH, Choi SW, Lee JH. *A study on biodegradable polymer scaffold with uniform 3-dimensional porosity for artificial cartilage*. J Biomater Res 2000; 4: 52-59.
- 38- Subramanian A, Vu D, Larsen GF, Yilin H. *Preparation and evaluation of the electrospun chitosan/PEO fibers for potential applications in cartilage tissue engineering*. J Biomater Sci Polym Ed 2005; 16(7): 861-73.
- 39- Spasova M, Stoilova O, Manolova N, Rashkov I, Altankov G. *Preparation of PLLA/PEG nanofibers by electrospinning and potential application*. J Bioactive and Compatible Polymers 2007; 22(1): 62-76.
- 40- Maquet V, Marthin D, Malgrange B, Franzen R, Schoenen J, Moonen G, et al. *Peripheral nerve regeneration using bioresorbable macroporous polylactide scaffold*. J Biomed Mater Res 2000; 52(4): 639-51.
- 41- Chua KH, Aminuddin BS, Fuzina NH, Ruszymah BHI. *Insulin-transferrin-selenium prevent human chondrocyte dedifferentiation and promote the formation of high quality tissue engineered human hyaline cartilage*. Eur Cells Mater 2005; 9: 58-67.

- 42- Huang X, Brazel CS. *On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems*. J Control Release 2001; 73(2-3): 121-36.
- 43- Damgé C, Maincent P, Ubrich N. *Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats*. J Control Release 2007; 117(2): 163-70.
- 44- Chena MC, Sonajeb K, Chenb KJ, Sung HW. *A review of the prospects for polymeric nanoparticle platforms in oral insulin delivery*. Biomaterials 2011; 32(36): 9826-38.
- 45- Liu J, Zhang SM, Chen PP, Cheng L, Zhou W, Tang WX, et al. *Controlled release of insulin from PLGA nanoparticles embedded within PVA hydrogels*. J Mater Sci Mater Med 2007; 18(11): 2205-10.
- 46- Mukerjee A, Sinha VR, Pruthi V. *Preparation and Characterization of Poly-ε-caprolactone Particles for Controlled Insulin Delivery*. Biomed Pharmaceutical Eng 2007; 1: 40-44.
- 47- Andreas K, Zehbe R, Kazubek M, Grzeschik K, Sternberg N, Bbumler H, et al. *Biodegradable insulin-loaded PLGA microspheres fabricated by three different emulsification techniques: investigation for cartilage tissue engineering*. Acta Biomater 2011; 7(4): 1485-95.
- 48- Appel B, Maschke A, Weiser B, Sarhan H, Englert C, Angele P, et al. *Lipidic implants for controlled release of bioactive insulin: effects on cartilage engineered in vitro*. Int J Pharm 2006; 314(2): 170-78.
- 49- Malafaya PB, Oliveira JT, Reis RL. *The effect of insulin-loaded chitosan particle-aggregated scaffolds in chondrogenic differentiation*. Tissue Eng 2010; 16(2): 1089-2008.

Preparing PCL/PLGA Hybrid Nanofiber Scaffold Capable of Controlled Releasing of Insulin for Cartilage Tissue Engineering Application

Basiri A(MSc)¹, Amooabediny GH(PhD)², Vasei M(MD)³, Solimani M(MD)⁴

^{1,2}*Department of Life Science Engineering, University of Tehran, Tehran, Iran*

³*Department of Pathology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

⁴*Department of Hematology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*

Received: 15 Sep 2013

Accepted: 13 Feb 2014

Abstract

Introduction: Poly lactic co- glycolic acid (PLGA) and poly caprolacton (PCL) are highly applicable polymers in the field of drug delivery and tissue engineering scaffolds. Therefore, this study aimed to design an insulin-loaded PCL/PLGA hybrid nanofiber scaffold in order to be applied in attachment and growth of chondrocytes. Moreover, it can provide a vehicle for the controlled release of active insulin in a certain time period.

Methods: Chondrocyte cells were isolated from septum cartilage tissue utilizing collagenase and were also cultured in monolayer, then the third-passage cells were seeded on the scaffolds. Insulin release from the PCL/PLGA hybrid nanofiber scaffold was examined by Radio Immuno Metric Assay (RIMA) during 22 days. Adherence, distribution and morphology of cells were observed by H&E and alcian blue staining.

Results: PCL/PLGA hybrid nanofiber scaffold revealed a slow and sustain release of insulin within three weeks. Chondrocytes were distributed evenly throughout the scaffolds. In addition, they sank into the pores of scaffold and maintained their rounded morphology.

Conclusion: Biological activity of insulin has been maintained during 22 days of controlled release from hybrid nanofiber PCL/PLGA scaffold. Chondrocytes were distributed evenly throughout the scaffold and revealed a rounded morphology. Therefore, this scaffold provides a suitable carrier for chondrocyte growth as well as formation of tissue engineered cartilage.

Keywords: Chondrocyte; Controlled release; Insulin; PLGA polymer; Scaffold; Tissue engineering

This paper should be cited as:

Basiri A, Amooabediny GH, Vasei M, Solimani M. *Preparing PCL/PLGA hybrid nanofiber scaffold capable of controlled releasing of insulin for cartilage tissue engineering application*. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2014; 22(3): 1175-86.

****Corresponding author: Tel: +98 331 2512234, Email: amoabediny@ut.ac.ir***