مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۳، شماره ۵، مرداد ۱۳۹۴
صفحه: ۴۷۵- ۴۶۴

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 23, No.5, Jul-Aug 2015
Pages: 464-475

بررسي رشد و تكثير سلول‌هاي بنيادی مزانشیمی مشتق از پالپ دندان بر روی غشای نانو متخلخل PLLA

محمد حسین پور قرا[۱]، علیرضا طالبی*[۲]، حسین نهنگی[۳]، مرتضی انوری[۴]، فاطمه صادقیان[۵]، آرش‌یونس‌نیا[۶]، مرتضی محمدزاده[۷]

چکیده

مقدمه: داربست بافتی دارای وظایف و اعمال مشابه ماتریکس خارج سلولی بوده و جزء مهمی در تکنیک‌های مهندسی بافت محسوب می‌گردد. PLLA یکی از داربست‌هایی است که در این زمینه استفاده می‌شود. PLLA در این مطالعه به صورت غشای نانو متخلخل می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی زیست سازگاری و تاثیر غشای نانو متخلخل PLLA بر روی تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد.

روش بررسی: غشای نانو متخلخل PLLA به وسیله فرایند جدایی فازی تهیه شد و برای شناسایی نوع پلیمرهای بکار رفته در ساختمان آن از آزمون FTIR استفاده شد. سپس سلول‌های مزانشیمی پالپ دندان بر روی نانو غشاء و همزمان در محیط عاری از نانو غشاء کشت داده شد. اندازه‌گیری حیات و تکثیر سلول‌ها پس از چسبیدن سلول‌ها به کف پلیت در یک دوره دو هفته‌ای با استفاده از آزمون MTT در روزهای پنجم، هفتم و نهم و همچنین اولترا استراکچر و میزان چسبندگی سلول‌های مزانشیمی بر روی این غشاء با استفاده از میکرسکوپ الکترونی(SEM) مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: توانایی زیست سازگاری غشای نانو مناسب بوده و سلول‌ها به خوبی به سطح غشاء چسبیده‌اند. قابلیت حیات سلول‌های مزانشیمی در گروه نانو مثبت به‌طور معنی‌داری($p<۰/۰۰۱$) از گروه نانو منفی بیشتر بود. بیشترین تأثیرگذاری نانو غشاء بر میزان حیات سلولی در روز نهم و کمترین تأثیرگذاری در روز پنجم مشاهده‌شد.

نتیجه‌گیری: نانو غشای PLLA به علت زیست تخریب پذیر بودن و عدم سمیت‌زایی، میزان چسبندگی و نیز تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی را افزایش می دهد و با گذشت زمان این فرایند تشدید می‌شود.

واژه‌های کلیدی: غشای نانو متخلخل PLLA، سلول‌های بنیادی مزانشیمی پالپ دندان، پالپ دندان

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم تشریحی، پردیس بین الملل، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران
۲،۴- دانشیار گروه علوم تشریحی، مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران
۳- استادیار گروه علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران
۵- کارشناس ارشد گروه زیست- سلول‌های بنیادی، مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران
۶- دانشجوی دکترای نانو بیوتکنولوژی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران
۷- دانشجوی کارشناسی ارشد آمار زیستی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران
- این مقاله برگرفته از پایان نام کارشناسی ارشد دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد می‌باشد.
* (نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۳۱۵۳۲۱۷۴، پست الکترونیکی: prof_talebi@ssu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۲/۳

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-29]

مقدمه

در برخی از ناهنجاری‌های استخوانی نظیر تروما، شکستگی و عفونت استخوانی، تومور و اختلالات متابولیکی اقدامات معمول درمان آسیب‌های استخوانی پاسخگو نمی‌باشد. از این رو در چنین شرایطی مداخلات جراحی یک ضرورت اجتناب‌ناپذیر است(۱). عمده‌ترین روش‌هایی که جراحان برای درمان نقص‌های استخوانی بکار می‌برند استفاده از ایمپلنت‌های فلزی و پیوندهای استخوانی به صورت آلوگرافت و اتوگرافت می‌باشد(۴-۲). بکارگیری هر یک از این روش‌ها مشکلاتی را برای بیمار به همراه دارد. از جمله این مشکلات می‌توان به محدود بودن منابع اخذ استخوانی(۵) دردناک بودن محل برداشت استخوان‌ها از فرد بیمار و همچنین احتمال تحریک سیستم ایمنی بیماران در هر یک از روش‌های مذکور اشاره کرد. ایمپلنت‌های فلزی نیز در دراز مدت یون‌های سمی تولید می‌کند و می‌توانند برای بیمار زیان‌آور باشد. از این رو استفاده از بیوماتریال‌های زیست تخریب‌پذیر که با استفاده از مهندسی بافت توسعه یافته‌اند سریعاً در حال گسترش می‌باشد. این مواد با کشت در بدن بیمار به تدریج تخریب شده و محصولات ناشی از تخریب و تجزیه این داربست‌ها هیچگونه عارضه‌ای برای بدن ندارد(۸-۶) در طی دو دهه اخیر توجهات زیادی در جهت استفاده ازمواد جایگزین در زمینه علم پزشکی و به ویژه در مهندسی بافت شده است(۱۱-۹). مهندسی بافت به عنوان یک علم بین رشته‌ای با هدف توسعه مواد زیست سازگار و زیست تخریب‌پذیر و با دیدگاه بهبود عملکرد بافت‌های طبیعی، توجه بسیاری از متخصصین علوم مهندسی و پزشکی را به خود جلب نموده است(۱۲). مهندسی بافت استخوان با استفاده از جایگزین‌های زیستی مناسب، زمینه بازسازی و احیای فعالیت‌های طبیعی بافت‌های استخوانی آسیب دیده را فراهم می‌کند(۱۳) و ضرورتاً نیاز به سه جزء دارد: سلول‌های پیش‌ساز استخوانی، فاکتور رشد استخوانی و داربستی برای چسبندگی و حفظ عملکرد سلول‌ها(۱۴،۱۵) .

Sait و همکاران برای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان به هپاتوسیت‌ها از(PLLA: Polylactic acid) استفاده نموده و میزان تکثیر سلولی را بین هشت تا هجده برابر بیشتر از گروه بدون نانوفایبر مشاهده کردند(۱۶). Smite و همکاران سلول‌های بنیادی جنینی را بر روی نانوفیبرهای ماتریکسی و ورقه‌های صاف کشت داده و نشان دادند که میزان تکثیر این سلول‌ها بر روی نانو فیبرها به طور معنی‌داری از ورقه‌های صاف بیشتر می‌باشد. داربست مورد استفاده در این مطالعه برخلاف مطالعات پیشین، غشای نانو متخلخل PLLA بوده که علاوه بر شباهت بسیار زیادی به نانو فیبرها در اصول اولیه، از برخی جهات نیز امتیازاتی نسبت به نانوفیبرها دارد. از جمله امتیازاتی که غشای نانو متخلخل نسبت به نانوفیبرها داراست می‌توان به مقاومت بیشتر، کنترل بیشتر بر روی اندازه منافذ در هنگام ساخت غشاء و همچنین روش تولید آسان‌تر نسبت به نانوفیبر اشاره کرد. در این مطالعه، با کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی که از پالپ دندان جدا شده است بر روی غشای نانو متخلخل PLLA، توانایی زیستی این سلول‌ها روی غشای مورد نظر بررسی گردیده است.

روش بررسی

در این مطالعه بنیادی کاربردی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در دو گروه کشت بر روی غشای نانو متخلخل و کشت ساده مورد بررسی قرار گرفتند سپس میزان تکثیر و بقای این سلول‌ها در دو گروه در سه روز مختلف ارزیابی گردید.

برای کشت از غشای پلی ال-لاکتیک اسید که با روش متداول ریخته‌گری محلول پلیمری تهیه شده بود، استفاده گردید(۱۷). در این روش ساخت، ابتدا از ترکیب ۲۰٪ وزنی PLLA، ۷٪ وزنی پلی‌اتیلن گلیکول(PEG: Polyethylene Glycol) با جرم مولکولی ۴۰۰۰ گرم بر مول و محلول کلروفرم، محلول پلیمری را به دست آورده و برای تهیه محلول یکنواخت، محلول حاصل را در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت و با سرعت چرخش ۵۰۰ دور بر دقیقه، سانتریفوژ نموده پس از سرد شدن محلول، با استفاده از یک کاردک مخصوص با شکاف ۲۰۰ تا ۲۵۰ میکرومتر، بر روی شیشه استریل کشیده شد(شیشه باید با استفاده از آب دو بار تقطیر و سپس استون به‌طور کامل تمیز و استریل شود کشیده شده و یا ریخته‌گری می‌شود.) پلیمر PEG استفاده شده در محلول این غشاء به عنوان حفره ساز عمل می‌کند و تخلخل غشاء PLLA

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-29]

را افزایش می‌دهد. به علت فراریت بالای کلروفرم و تغییر غلظت محلول، قبل از کشیدن محلول PLLA، باید توجه داشت که شیشه مورد استفاده صاف و صیقلی باشد تا غشایی یکنواخت و بدون نقصی به دست آید. بعد از کشیدن لایه PLLA بر روی شیشه، فوراً آن را به مدت ۶ ساعت در اون ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده تا محلول کلروفرم از لایه PLLA تبخیر شده و حفرات کوچک ایجاد گردد. در نهایت برای به دست آوردن غشای PLLA خالص با حفرات بزرگ، لایه تقریباً خشک شده را برای مدت یک روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در داخل حمام آب دو بار تقطیر قرار داده تا پلیمر PEG از آن خارج شود. قبل از کشت سلول، غشاها را با الکل ۷۰٪ و محلول FBS و همچنین DMEM استریل شدند.

برای شناسایی ترکیبات پلیمرهای بکار رفته در ساختمان نانو غشاء از آزمون طیف‌سنجی مادون قرمز(Fourier Transform Infra-Red) بهره گرفته شد(۱۸). در این آزمون، نور مادون قرمز در بازه فرکانسی ۵۰۰ تا cm^{-1} ۴۵۰۰ به نمونه تابانده شد و طیف جذبی آن بدست آمد. هر یک از پیک‌های جذب در طیف مادون قرمز از یک نوع باند ارتعاشی در بافت نتیجه می‌شود، بنابراین، با مطالعه تغییرات قله‌های جذب نمونه در اثر تابش فرابنفش هم از نظر شدت و هم از نظر فرکانس، می‌توان به تغییرات شیمیایی و ساختاری ایجاد شده در بافت پی‌برد. ریخت‌شناسی غشاهای نانو متخلخل بدست آمده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل VEGATESCAN3 در دانشگاه یزد تعیین شد. کلیه نمونه‌ها، ابتدا با لایه‌ای از طلا پوشانده شده و سپس عکس‌های مربوط با اعمال ولتاژ ۱۵ کیلوولت تهیه شدند. اندازه حفرات موجود در غشای نانو متخلخل با استفاده از نرم‌افزار Micro Structure Measurement و عکس‌های گرفته شده اندازه‌گیری شد.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی پالپ دندان انسانی از آزمایشگاه سلول‌های بنیادی پژوهشکده علوم تولید مثل یزد تهیه گردید. در ابتدا غشاها به مدت ۳۰ دقیقه در الکل ۷۰٪ غوطه‌ور و شستشو داده شد. سپس آنها سه بار و هر بار به مدت ۳۰ دقیقه با PBS شستشو شد. شستشوی دوم دو بار و هر بار به مدت یک ساعت با DMEM انجام گردید. غشاها را به‌اندازه هر یک از چاهک‌ها بریده و در کف پلیت قرارداده شد. تعداد $۱۰^{۵}\times$ ۱/۵ سلول در هر یک از چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه قرار داده شد سپس این سلول‌ها در محیط کشت DMEM با غلظت ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک جنتامایسین کشت داده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO2 انکوبه شد. سلول‌ها پس از ۵-۳ با پاساژ مورد استفاده قرار گرفتند.

مورفولوژی سلول‌های کاشته شده بر روی نانو غشاء PLLA با استفاده از میکروسکوپ الکترونی بررسی شد. پلیت‌های کشت سلول پس از هفت روز، توسط محلول گلوتارآلدهید ۲/۵٪ و بافر سدیم کاکو دیلات در دمای اتاق تثبیت و به مدت نیم ساعت در هر یک از غلظت‌های مختلف افزایشی اتانول (۵۰٪-۷۰٪-۱۰۰٪) آبگیری شدند. سپس به مدت یک شب در یخچال نگهداری شده و در روز بعد نانو غشاها به آرامی از کف پلیت جدا و به استاپ آلومینیومی چسبانده شدند. توسط دستگاه Sputter coater پوششی از طلا بر روی نانو غشاء حاوی سلول قرار گرفته و نمونه‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ VEGATESCAN3 (Tescan- آمریکا) بررسی و عکس‌برداری شد. بررسی زیست سازگاری نانو غشای PLLA بر پایه رنگ سنجی MTT قابلیت حیات سلول‌های کشت داده شده بر روی غشای نانو تخلخل PLLA با استفاده از نمک تترازولیوم-2,5-(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-MTT. (diphenyl tetrazolium bromideسیگما- آمریکا) بررسی شد. در یک پلیت ۹۶ خانه‌ای کف نیمی از چاهک‌ها نانو غشاء قرار داده و نیمی دیگر عاری از نانو غشاء به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. تعداد $۱۰^{۴}$سلول در یک پلیت ۹ خانه‌ای در شرایط استاندارد کشت شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و Co2 ۵ درصد انکوبه شد. پس از ۵ روز محیط رویی سلول‌ها به آرامی خارج و پس از ۲-۳ بار شستشو با PBS به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه، ۱۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه شد، سپس به مدت ۴ ساعت مجدداً در انکوباتور قرار گرفت. پس از سپری شدن این مدت محیط رویی هر چاهک تخلیه شده و به منظور حل شدن بلورهای فورمازان ۱۵ میکرولیتر(SDS: Sodium Dodecyl Sulfate) به آن اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در تاریکی قرار داده شد. میزان

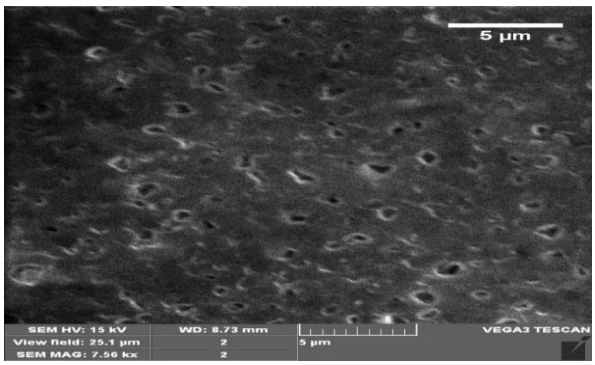
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-29]

جذب محلول در طیف ۵۷۰ نانومتر با استفاده از ELISA-reader خوانده شد. این آزمایش سه بار در روزهای پنجم، هفتم و نهم برای سلول‌های مزانشیمی انجام گردید.

داده‌ها با استفاده از انجام آزمون One-Sample Kolmogorov-Smirnov در زیر گروه‌های نانو و غیر نانو در هر سه روز مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای مقایسه میزان MTT در گروه نانو منفی و گروه نانو مثبت در هر یک از دوره‌های زمانی با توجه به نرمال بودن داده‌ها از آزمون Independent Samples Test استفاده شد. برای بررسی میزان MTT برای هر یک از گروه‌ها به‌طور مجزا در طی دوره‌های زمانی مختلف به علت عدم برقراری فرض برابری واریانس‌ها با استفاده از آزمون لون($p<۰/۰۰۱$) از آزمون Welch به‌جای آزمون One Way Anova برای آنالیز واریانس استفاده شد و برای بررسی بیشتر از آزمون Tomhane's T برای مقایسات جفتی استفاده شد. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

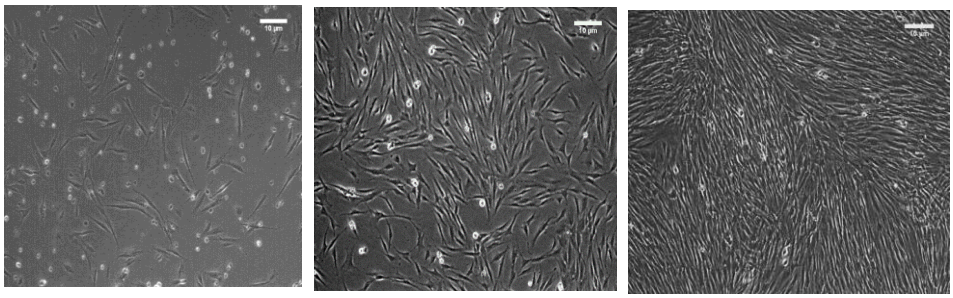
از سطوح نمونه‌ها به کمک SEM تصویربرداری به عمل آمد. نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی بیانگر تشکیل ساختارهای پیوسته و یکنواخت در نانو غشاء است که فاقد دانه بوده و از سطح یکنواختی برخوردارند. این مسئله تأییدکننده این مطلب است که غلظت‌های انتخاب‌شده دارای چسبندگی(Viscosity) کافی بوده و زنجیرهای پلیمری درگیری خوبی با یکدیگر داشته‌اند که منجر به عدم تشکیل دانه در نانو غشاء شده است. برای کشت سلول مزانشیمی بر روی داربست غشایی نانو متخلخل، از سطح‌رویی آن استفاده شده که دارای حفرات کوچک‌تر و سطحی براق‌تر است. ضخامت داربست غشایی ۱۰۰-۱۵۰ نانومتر بوده و اندازه حفرات موجود در سطح این داربست با استفاده از نرم‌افزار Micro structure Measurement و عکس‌های گرفته شده، اندازه‌گیری شد که در حدود ۲۰۰-۱۵۰ نانومتر بوده است(شکل ۱).



شکل ۱: تصویر میکروسکوپ الکترونی نانو غشاء قبل از کشت سلول

روزانه کشت سلولی، با میکروسکوپ فاز کنتراست مشاهده می‌شد که بر اساس این مشاهدات، سلول‌ها یک روز پس از کشت به کف فلاسک چسبیده و کلونی‌هایی با ظاهر سلول‌های فیبروبلاستی تشکیل دادند(شکل ۲، A) علاوه بر این سلول‌ها، تعدادی سلول کروی نیز در محیط کشت حضور داشتند.

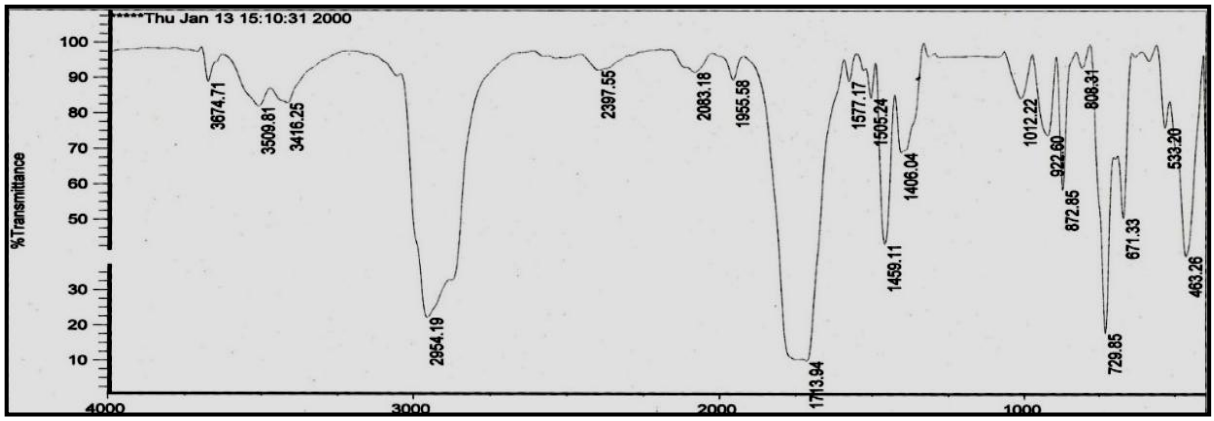
سلول‌ها به‌تدریج و پس از گذشت ۳-۲ روز، تراکم یافته و شروع به پوشاندن کف ظرف نمودند. شکل۲(B). این سلول‌ها، دوکی‌شکل و دارای زوائد سلولی کمی بودند. سلول‌های فیبروبلاستی تکثیر شده و مورفولوژی فیبروبلاستی خود را در طی دوره کشت حفظ کردند. این سلول‌ها اندکی بزرگ‌تر شده و سرعت تکثیر آنها افزایش یافتند. به‌طوری که پس از گذشت ۵ روز، فلاسک کشت از سلول‌ها پرشده و آماده برای دومین پاساژ آماده بود. شکل۲(C).



شکل ۲: A: تصویر میکروسکوپ فاز کنتراست از سلول‌های مزانشیمی پالپ دندان انسانی(40×): B: یک روز پس از کشت، چسبیدن به کف فلاسک و تشکیل کلونی‌هایی با ظاهر سلول‌های فیبروبلاستی. C: به‌تدریج و پس از گذشت ۳-۲ روز، تراکم یافته وشروع به پوشاندن کف ظرف نمودند.

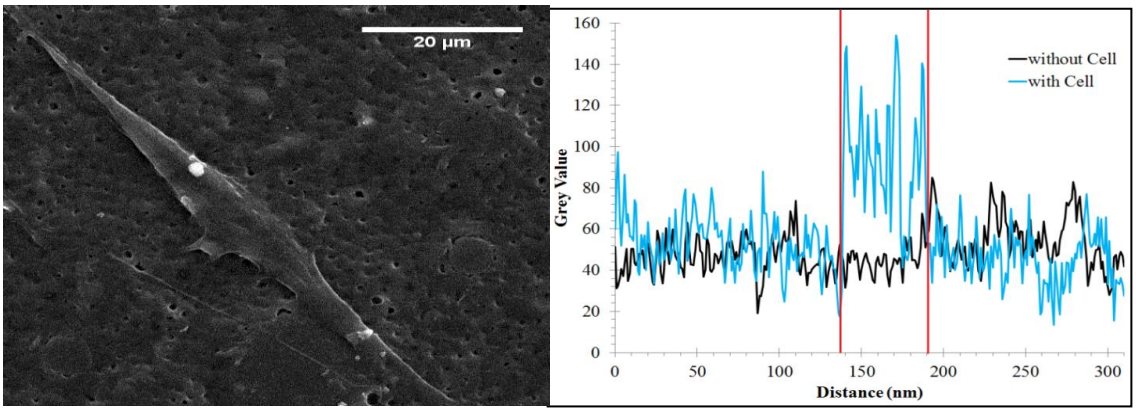
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-29]

طیف مادون‌قرمز داربست غشایی نانو متخلخل پلی (L-لاکتیک‌اسید) در شکل ۳ نشان داده شده است. تفسیر این طیف به صورت زیر است: جذب در $^{-1}$۳۴۱۶/۲۵cm مربوط به ارتعاش کششی گروه هیدروکسیل گروه عاملی کربوکسیلی (-COOH) در انتهای زنجیره، جذب در $^{-1}$۲۹۵۴/۱۹cm مربوط به ارتعاش کششی CH_2- زنجیره اصلی جذب در ۱-۱۷۱۳/۹۴cm مربوط به ارتعاش کششی گروه عاملی کربونیل(C=O-)، جذب در ۱-۱۴۵۹/۱۱cm مربوط به ارتعاش خمشی CH2- زنجیره اصلی و جذب در ۱-۱۰۱۲/۲۲cm و ۱۱۷۱/۸۴ مربوط به ارتعاش کششی C-O- است. این پیک‌ها مرتبط به پلیمر پلی(L-لاکتیک‌اسید) هستند. البته پیک‌های مرتبط به پلی‌اتیلن گلیکول نیز موجود است مانند جذب در ۱-۳۴۱۶/۲۵cm مربوط به ارتعاش کششی گروه هیدروکسیل، جذب در ۱-۲۹۵۴/۱۹cm مربوط به ارتعاش کششی CH2- زنجیره اصلی، جذب در۱-۱۴۵۹/۱۱cm مربوط به ارتعاش خمشیCH2-.



شکل ۳: آزمون طیف سنجی مادون قرمز برای شناسایی ترکیبات بکار رفته در ساختمان غشای نانو متخلخل

اتصال و رشد سلول‌ها بر سطح نانو غشاء سلول‌ها به‌خوبی در میان نانو فیبرها نفوذ کرده و شبکه سه‌بعدی مناسبی از سلول‌ها ایجاد شده است. شبکه سلولی ایجاد شده بیانگر حفظ خصوصیات ریخت شناختی سلول طی فرایند کاشت است. برای تجزیه و تحلیل تصویر ۴ از نرم‌افزار ImageJ استفاده گردید. با استفاده از این نرم‌افزار، پلات‌هایی از وضعیت سطح غشاء در محل چسبندگی سلول و همچنین در اطراف آن تهیه شد. همان‌طور که در نمای دوبعدی این نقشه دیده می‌شود در محل فاقد سلول، تغییرات سطوح یکنواخت بوده و حاکی از عدم وجود شی خارجی بر روی غشاء می‌باشد؛ اما در محل چسبندگی سلول، میزان Gray value ناگهان زیاد شده و در لبه‌های سلول از شدت بیشتری برخوردار می‌باشد.



شکل ۴: تصویر میکروسکوپ الکترونی و نمودار تغییرات وضعیت سطح نانو غشاء در محل چسبندگی سلول‌های بنیادی مزانشیمی و پیرامون آن

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-29]

توانایی زیستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر روی نانو غشای PLLA بر اساس آزمایش MT: بررسی شد.

تمامی داده‌ها در گروه نانو و غیر نانو در هر سه روز نرمال بودند.(آزمون One-Sample Kolmogorov-Smirnov)

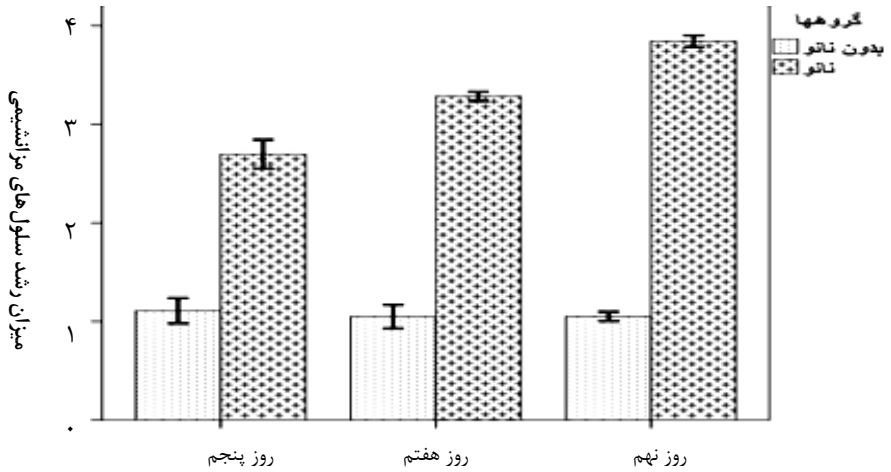
	D1mes.Nonano	D1mes.nano	D2mes.Nonano	D2mes.nano	D3mes.Nonano	D3mes.nano
Exact Sig. (۲-tailed)	۰/۲۴۲	۰/۳۶۶	۰/۹۹۵	.۰/۴۱۰	۰/۸۵۴	.۰/۵۲۳

جدول: بررسی توانایی زیستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر روی نانو غشای plla

میزان MTT گروه نانو مثبت در روز پنجم ۰/۰۴۳ ± ۲/۸۶۳ و در گروه نانو منفی ۰/۰۳۳ ± ۱/۰۹۱ به دست آمد. با انجام آزمون Independent Samples Test اختلاف معنی‌داری در میزان MTT دو گروه مشاهده گردید(P<۰/۰۰۱). میزان MTT در گروه نانو مثبت در روز پنجم به مقدار ۰/۰۵۴± ۱/۷۷۱ از گروه نانو منفی بیشتر بود.

همچنین میزان MTT گروه نانو مثبت در روز هفتم ۰/۰۱۰ ± ۳/۱۶۲ و در گروه نانو منفی ۰/۰۳۲ ± ۱/۰۱۲ به دست آمد. با انجام آزمون Independent Samples Test اختلاف معنی‌داری در میزان MTT دو گروه مشاهده گردید(P<۰/۰۰۱). میزان MTT در گروه نانو مثبت به مقدار ۰/۰۳۳ ± ۲/۱۵۰ از گروه نانو منفی بیشتر بود.

میزان MTT گروه نانو مثبت در روز نهم ۰/۰۲۱ ± ۳/۷۳۱ و در گروه نانو منفی ۰/۰۱۴ ± ۱/۰۵۸ به دست آمد. با انجام آزمون Independent Samples Test اختلاف معنی‌داری در میزان MTT دو گروه مشاهده گردید(P<۰/۰۰۱). میزان MTT در گروه نانو مثبت به مقدار ۰/۰۲۵± ۲/۶۷۳ از گروه نانو منفی بیشتر بود. (نمودار ۱)

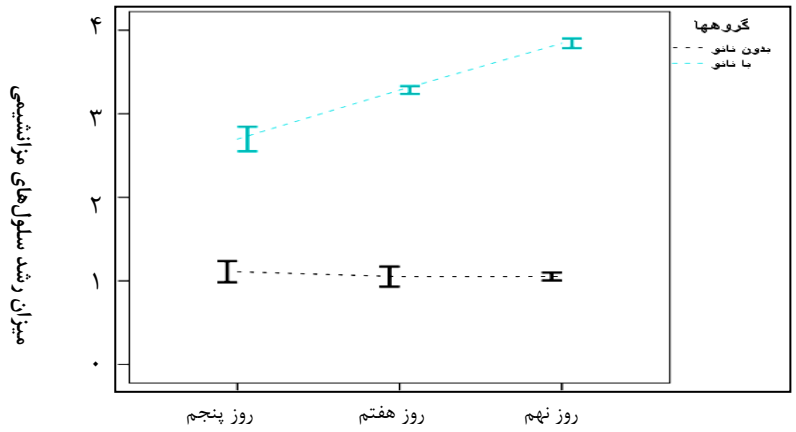


نمودار ۱: میزان رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر روی نانوغشای PLLA در طول سه دوره زمانی(P<۰/۰۵)

جهت مقایسه میزان MTT در گروه نانو مثبت در طول سه دوره زمانی با انجام آزمون Welch اختلاف معنی‌داری در گروه نانو مثبت بین حداقل یکی از سه دوره زمانی با بقیه در میزان MTT مشاهده گردید(p<۰/۰۰۱). برای بررسی جزئیات بیشتر و مقایسه میزان MTT هر یک از دوره‌های زمانی با یکدیگر از آزمون Tomhane's استفاده گردید. با انجام این آزمون، میزان MTT در هر سه دوره زمانی با یکدیگر متفاوت بودند(p<۰/۰۰۱). میزان MTT در دوره دوم به مقدار

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-29]

۰/۰۴۴ ± ۰/۲۹۹ و در دوره سوم به مقدار ۰/۰۴۸ ±۰/۸۶۸ از دوره اول بیشتر بوده و میزان MTT در دوره سوم به مقدار ۰/۰۲۳ ±۰/۵۶۹ از دوره دوم بیشتر بود. این نتیجه نشان می‌دهد که با افزایش زمان کشت، تکثیر سلولی نیز افزایش پیداکرده است به‌طوری‌که بیشترین میزان تکثیر در روز نهم و کمترین میزان تکثیر در روز پنجم بوده است. (نمودار ۲)

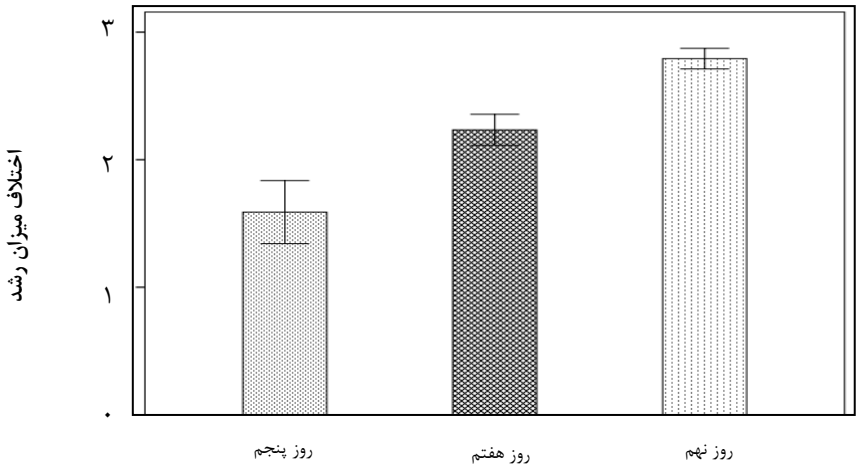


نمودار ۲: نمودار تغییرات رشد سلول‌های مزانشیمی دو گروه نانو مثبت و نانو منفی در طول سه دوره زمانی(P<۰/۰۵)

با انجام آزمون Welch اختلاف معنی‌داری در گروه نانو منفی در طی سه دوره زمانی در میزان MTT مشاهده نگردید(p=۰/۲۴۱).

جهت بررسی بیشترین تأثیر نانو غشاء در دوره‌های زمانی به تعیین ماکزیمم اختلاف میزان MMT بین گروه نانو مثبت و منفی در طی سه دوره پرداخته شده است. مقدار اختلاف در میزان MTT گروه نانو مثبت و نانو منفی دوره اول ۰/۰۶۰ ± ۱/۷۷۱ بوده و مقدار این اختلاف در دوره دوم ۰/۰۳۳± ۲/۱۵۰ و در دوره سوم ۰/۰۲۴±۲/۶۷۳ بوده است. با انجام آزمون Welch تفاوت معنی‌داری بین این اختلافات وجود دارد(p<۰/۰۰۱)؛ بنابراین برای بررسی بیشتر از آزمونTomhane's برای مقایسات جفتی استفاده گردید که به شرح زیر می‌باشد:

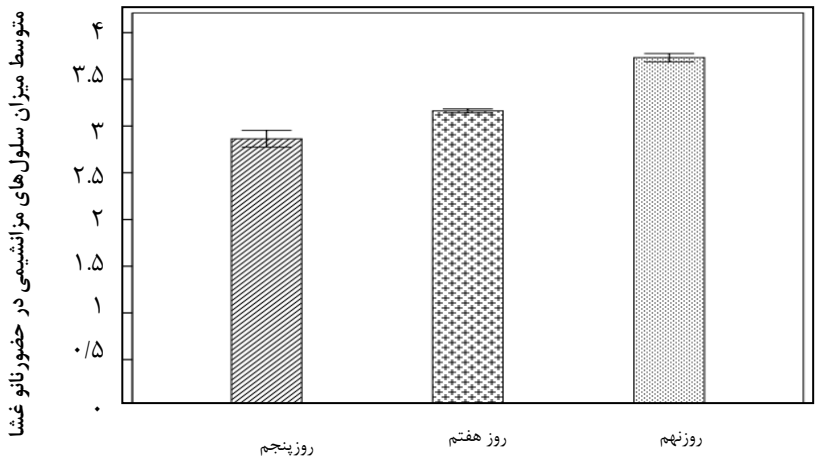
اختلاف میزان MTT بین نانو مثبت و نانو منفی در دوره دوم به‌اندازه ۰/۰۶۹ ±۰/۳۷۸ از دوره اول بیشتر و به اندازه ۰/۰۴۱ ±۰/۵۲۳ از دوره سوم، کمتر است و اختلاف میزان MMT در گروه سوم به اندازه ۰/۰۶۵±۰/۹۰۲ از دوره اول بیشتر می‌باشد. با مقایسه مقدار میانگین هر یک می‌توان دریافت که بیشترین تأثیرگذاری نانو غشاء در میزان MTT در دوره سوم و کمترین تأثیرگذاری در دوره اول مشاهده شده است. (نمودار ۳)



نمودار ۳: اختلاف میزان رشد سلول‌های مزانشیمی دو گروه نانو مثبت و نانو منفی در طول سه دوره زمانی(p<۰/۰۵)

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-29]

نتایج مربوط به چسبندگی سلولی بر سطح داربست‌ها نشان داد که با افزایش زمان کشت، تکثیر سلولی افزایش پیداکرده است، به‌طوری‌که بیشترین میزان تکثیر در روز نهم و کمترین آن در روز پنجم اتفاق افتاده است. به نحوی که در این مطالعه، تکثیر سلولی روی داربست نانو غشاء نسبت به گروه‌های کنترل بالاتر بوده است که این امر بیانگر مناسب بودن ساختار داربست تهیه شده برای اهداف مهندسی بافت است. (نمودار ۴)



نمودار ۴: متوسط میزان رشد سلول‌های مزانشیمی در حضور نانو غشاء($p< ۰/۰۵$)

بحث

در تحقیق حاضر، نخست با استفاده از PLLA داربست‌های مناسب آماده‌سازی شد. مزایای استفاده از PLLA، زیست سازگاری، قابلیت جذب زیستی و عدم شکل‌گیری پاسخ‌های ایمنی علیه آن(اهداف پیوند) و در دسترس بودن آن می‌باشد. داربست‌هایی که در تحقیقات مشابه برای کشت و ارزیابی مورداستفاده قرار گرفته، از دسته نانو فیبرهایی بوده که اغلب به روش الکترواسپاینینگ سنتز شده است. داربستی که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت غشای نانو متخلخل PLLA بوده که به وسیله فرایند جدایی فازی و ریخته‌گری سنتز شده، علاوه بر اینکه در اصول اولیه شباهت بسیار زیادی به نانو فیبرها دارد، از برخی جهات نیز دارای امتیازاتی می‌باشد. ازجمله امتیازاتی که نانو غشاء نسبت به نانو فیبرها داراست، می‌توان به مقاومت بیشتر و کنترل بیشتر بر روی اندازه منافذ در هنگام ساخت غشاء، همچنین روش تولید آسان‌تر نسبت به نانو فیبر اشاره کرد.

اندازه‌گیری و سنجش قابلیت حیات و رشد سلول‌ها در بسیاری از تحقیقات، یک معیار بسیار ارزشمند به حساب می‌آید. استفاده از نمک‌های تترازولیوم، روش مطمئن، بی خطر و دقیق مبتنی بر عناصر رادیواکتیو به حساب می‌آید. نمک زرد رنگ، به وسیله سلول‌های زنده جذب شده و(MTT) تترازولیوم(Formazan) کریستال‌های بنفش رنگ نامحلول فورمازان تشکیل می‌گردند که با افزودن یک شوینده حل می‌شوند. این رنگ با روش‌های اسپکتروفتومتری قابل سنجش و اندازه‌گیری است. برای هر نوع سلول، یک رابطه خطی میان تعداد سلول‌ها و میزان جذب اندازه‌گیری شده وجود دارد که این رابطه امکان تعیین دقیق هرگونه تغییرات در میزان تکثیر سلول‌ها را فراهم می‌سازد(۱۹). به طور کلی نتایج آزمون MTT نشان داد که سلول‌های مزانشیمی گروه‌های نانو مثبت، افزایش جذب بیشتری نسبت به گروه نانو منفی دارند و در نتیجه میزان زیست سازگاری و در نتیجه میزان تکثیر سلولی به دلیل مطلوبیت ساختار داربست افزایش پیدا می‌کند. طبق نتایج حاصل از آنالیز آماری، میزان رشد و تکثیر در مورد نمونه‌هایی که دارای سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ باشند با اهمیت تلقی می‌شود که در مورد گروه دارای غشای نانو متخلخل PLLA کلیه داده‌ها دارای مقادیر معنی‌داری نسبت به گروه کنترل بودند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که غشای نانو متخلخل

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-29]

PLLA از زیست سازگاری مطلوبی برای رشد سلول‌های مزانشیمی برخوردار است. نتایج به دست آمده در مورد توانایی چسبیدن سلول‌ها بر روی داربست‌ها، نشان داد که تمامی سلول‌های مورد استفاده در این مطالعه، توانایی اتصال و در پی آن، تکثیر سلولی روی غشای نانو متخلخل PLLA را دارا می باشند به عبارت دیگر، این غشاها توانستند شرایط فیزیکی و شیمیایی مناسبی را برای چسبیدن سلول‌ها فراهم آورند. Slahi و همکاران در مطالعه‌ای نتیجه مشابهی را در مورد کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بر روی نانو فیبر PLLA دریافت کرده‌اند(۲۰). Gabriela و همکاران نیز سلول‌های بنیادی مزانشیمی را برروی اسکافولد ترکیب PLLA و ذرات هیدروکسی آپاتیت و نانوتیوب های کربنی کشت دادند و نتیجه گرفتند اسکافولد رشد سلول‌ها را افزایش می‌دهد(۲۱). در بررسی زیست سازگاری سلول‌های بنیادی مزانشیمی که در طول سه روز متفاوت(پنجم، هفتم و نهم) انجام گرفته بود، نشان داده شد در گروه نانو منفی در طی سه دوره زمانی، ثابت بوده و در گروه نانو مثبت، سرعت تکثیر سلول‌ها با گذشت زمان بیشتر می‌شود. به‌طوری‌که در روز پنجم دارای کمترین میزان رشد و در روز نهم دارای بیشترین مقدار رشد بوده است. Seyed Jafari و همکاران سلول‌های سوماتیک خون بند ناف را بر روی نانوفیبر کشت داده و آزمایش MTT را در روزهای متفاوت اول، سوم، پنجم و هفتم انجام دادند، بجز در روز اول که تغییری در میزان رشد سلول‌ها مشاهده نشد نتایج آنها نیز مشابه نتایج این پژوهش بود و با گذشت زمان سرعت تکثیر سلول‌ها نیز افزایش پیدا کرد(۲۲). Mottaghitalab و همکاران سلول‌های بنیادی عصبی را بر روی نانو کامپوزیت‌ها کشت داده و نیز به نتیجه‌ای مشابه در مورد روند تکثیر سلول‌ها رسیده‌اند(۲۳). با دانش علمی و فنی کنونی، مهندسی بافت استخوانی در جایگزینی نقص‌های بزرگتر استخوانی، ناتوان است. علاوه بر این، چون در شرایط آزمایشگاهی مهندسی بافت استخوان زمان زیادی صرف می‌شود، در شرایط حاد، نمی‌تواند گزینه مناسبی برای حل مشکلات باشد(۲۴).

نانو غشای PLLA به دلیل مقاومت بیشتر، کنترل بیشتر بر روی اندازه منافذ در هنگام ساخت نانو غشاء و همچنین روش تولید آسان‌تر، می‌تواند جایگزین مناسبی برای نانوفیبرها در پروژه‌های آتی و همچنین در مصارف بالینی باشد.

نتیجه‌گیری

این بررسی نشان داده است که غشای نانو متخلخل به کار رفته، میزان چسبندگی و نیز تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی را افزایش می‌دهد و با گذشت زمان این فرایند تشدید می‌شود. غشای نانو متخلخل PLLA به‌دلیل مزایای عمده نسبت به نانو فیبرها و نیز خاصیت زیست تخریب پذیری و در دسترس بودن می‌تواند در پروژه‌های آتی مهندسی بافت بطور موثرتری مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از قسمتی از پایان نامه کارشناسی ارشد بوده پس از تصویب در شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یزد(واحد بین الملل) در مرکز درمانی و تحقیقاتی ناباروری دانشگاه علوم پزشکی یزد انجام شده است. از همکاری صمیمانه آقای دکتر انوری مدیر گروه آناتومی و دکتر عبدلی ریاست این مرکز و همین طور سرکار خانم صادقیان مسئول آزمایشگاه سلول‌های بنیادی این مرکز کمال تشکر را دارم.

Reference:

1- Strauss S, Neumeister A, Barcikowski S, Kracht D, Kuhbier JW, Radtke C, et al. ***Adhesion, vitality and osteogenic differentiation capacity of adipose derived stem cells seeded on nitinol nanoparticle coatings***. PloS one. 2013; 8(1): e53309.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-29]

2- Logeart-Avramoglou D, Anagnostou F, Bizios R, Petite H**.** ***Engineering bone: challenges and obstacles.*** Cellular Molecul Med. 2005;9(1):72-84.

3- Rah DK. ***Art of replacing craniofacial bone defects***. Yonsei MED J 2000; 41(6): 756-65.

4- Hannouche D, Raould A, Nizard R, Sedel L, Petite H. ***Embedding of bone samples in methylmethacrylate: a suitable method for tracking LacZ mesenchymal stem cells in skeletal tissues***. J Histochem Cytochem. 2007; 55(3): 255-62.

5- Rose FR, Oreffo RO. ***Bone tissue engineering***: ***hope vs hype.*** Biochem Biophysical R Commun 2002; 292(1): 1-7.

6- Shors EC. ***Coralline bone graft substitutes.*** Orthopedic Clin North Am 1999; 30(4): 599-613.

7- Agrawal C, Ray RB. ***Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering.*** Biomed Mater Res 2001; 55(2): 141-50.

8- Leong K, Cheah CM, Chua CK. ***Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs***. Biomaterials 2003; 24(13): 2363-78.

9- Beresford JN, Gallagher JA, Poser JW, Russell RG. ***Production of osteocalcin by human bone cells in vitro. Effects of 1, 25 (OH) 2D3, 24, 25 (OH) 2D3, parathyroid hormone, and glucocorticoids.*** Metab Bone Dis Relat Res 1983; 5(5): 229-34.

10- Robey PG. ***Bone matrix proteoglycans and glycoproteins***. Academic Press: San Diego; 2002.

11- Miyamoto S, Takaoka K, Yonenobu K, Ono K. ***Ossification of the ligamentum flavum induced by bone morphogenetic protein***. ***An experimental Study in mice.*** J Bone Joint Surg Br 1992; 74(2): 279-83.

12- Khademhosseini A, Langer R, Borenstein J, Vacanti JP. ***Microscale technologies for tissue engineering and biology***. Proc National Acad Sci A 2006; 103(8): 2480-7.

13- Ma PX. ***Biomimetic materials for tissue engineering***. Adv Drug Deliv Rev 2008; 60(2): 184-98.

14- Torroni A. ***Engineered bone grafts and bone flaps for maxillofacial defects: state of the art***. Oral Maxillofac Surg 2009; 67(5): 1121-7.

15- Reddi AH. ***Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials***. Tissue Eng 2000; 6(4): 351-9.

16- Saito E, Liao EE, Hu WW, Krebsbach PH, Hollister SJ. ***Effects of designed PLLA and 50: 50 PLGA scaffold architectures on bone formation in vivo*** **.**J Tissue Eng Regen Med 2013; 7(2): 99-111.

17- Fujie T, Ahadian S, Liu H, Chang H, Ostrovidov S, Wu H, et al. ***Engineered nanomembranes for directing cellular organization toward flexible biodevices***. Nano Lett 2013; 13(7): 3185-92.

18- Kamińska A, Sionkowska A. ***Effect of UV radiation on the infrared spectra of collagen***. Poly Degrad Stab 1996; 51(1): 19-26.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-29]

19- Bose S, Darsell J, Kintner M, Hosick H, Bandyopadhyay A. ***Pore size and pore volume effects on alumina and TCP ceramic scaffolds***. Mat Sci Eng: C 2003; 23(4): 479-86.

20- Slahi N, Hadjighassem M, Joghataei M, Bakhtiyari M, Ayyoubiyan M, Asadi M, et al. T***he effects of plla nanofiber scaffold on proliferation of frozen-thawed neonate mouse spermatogonial stem cells***. J Iran Anat Sci 2012; 9(37): 279-94. [Persian]

21- Ciapetti G, Granchi D, Devescovi V, Baglio SR, Leonardi E, Martini D, et al. ***Enhancing osteoconduction of PLLA-based nanocomposite scaffolds for bone regeneration using different biomimetic signals to MSCs***. Int J Molecular Sci 2012; 13(2): 2439-58.

22- Seyedjafari E, Soleimani M, Ghaemi N, Sarbolouki MN. ***Enhanced osteogenic differentiation of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells on electrospun nanofibers***. J Mater Sci: Mater Med 2011; 22(1): 165-74. [Persian]

23- Mottaghitalab F, Mottaghitalab V, Farokhi M, Amiralian N, Eslamifar A, Shokrgozar MA. ***Fabrication of chitosan/poly (vinyl alcohol)-carbon nanotube nanocomposites for neural tissue regeneration***. Modares Med Sci. Pathobiology 2010; 12(4): 59-69. [Persian]

24- Polini A, Pisignano D, Parodi M, Quarto R, Scaglione S. ***Osteoinduction of human mesenchymal stem cells by bioactive composite scaffolds without supplemental osteogenic growth factors***. PloS one 2011; 6(10): e26211.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-29]

Evaluation of Proliferation and Development of Mesenchymal Stem Cell on Nanoporous PLLA Membrane Scaffold

Hosein Pour Ghara M(MSc)[1], Talebi A(PhD)[*2], Nahangi H(PhD)[3], Anvari M(PhD)[4], Sadeghian F(MSc)[5], Younesnia A(PhD Student) [6], Mohammadzadeh M(MSc Student)[7]

[1-4]Department of Biology and Anatomy, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

[5]Department of Biology, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

[6]Department of Biotecnology, Kashan University, Kashan, Iran

[7]Department of Biostatistics, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

Received: 12 Jan 2015 ***Accepted:*** 23 Apr 2015

Abstract

Introduction: Scaffold has therole of the extracellular matrix in regulating cell survival and it is an important component in tissue engineering techniques. One of the scaffolds that was used in this field, was PLLA (poly L-lactic acid) which was usually prepared by electro spinning method. The purpose of this study was to evaluate the biocompatibility of nano-porous PLLA membrane on proliferation of mesenchymal stem cells.

Method: PLLA nano-porous membranes were prepared by phase separation process. To identify the type of polymer used in its construction, FTIR analysis was performed. Then, dental pulp mesenchymal cells were cultured on a nano-membrane and nano-membrane-free environments ,simultaneously. After attachment of the cells on the bottom of the plate, the biocompatibility and cell proliferation was assessed in a two-week period using MTT test on the fifth, seventh and ninth days of cell culture. The ultra-structure and adhesion of mesenchymal cells on the membrane were evaluated using scaning electron microscopy(SEM).

Result: Nano Membrane potential had good biocompatibility and the cells had penetrated into the surface membranes properly. The viability of mesenchymal cells cultured on nano-membranes were significantly higher than the control group. The highest effect of nano-membrane on cell viability was seen on the ninth day and the lowest effect was seen on the fifth day.

Conclusion: Due to the biodegradable and non-toxic properties of nano PLLA membrane, it could increase the adhesion and proliferation of mesenchymal stem cells and these effects will exacerbated over time.

Keyword: PLLA nano-porous membranes, Mesenchymal stem cells, Proliferation

This paper should be cited as:

Hosein Pour Ghara M, Talebi A, Nahangi H, Anvari M, Sadeghian F, Younesnia A, Mohammadzadeh M. ***Evaluation of proliferation and development of mesenchymal stem cell on nanoporous plla membrane scaffold***. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2015; 23(5): 464-75.

(Corresponding Author), Tel: 09131532174, E-mail: prof_talebi@ssu.ac.ir

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-29]