Journal of North Khorasan University of Medical Sciences
No 61, Volume 16, Issue 1

Check for updates

Research Article

Collagen-Hydroxyapatite Scaffold Platform Incorporating Dimethyloxalylglycine Loaded Polymersomes Decorated with BMP-2 Peptide for Bone Tissue Engineering

Marzieh Mohammadi[1], Maryam Babaei Mahani[2], Mohammad Ramezani[3], Mona Alibolandi[4*]

[1]Assistant Professor, Department of Pharmaceutics, School of pharmacy and Targeted Drug Delivery Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[2]Post Doctorate, Central Research Laboratory, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[3]Distinguished Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[4]Associate Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

***Corresponding author:** Mona Alibolandi, Associate Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. E-mail: alibolandim@mums.ac.ir.

DOI: **10.32592/nkums.16.1.1**

How to Cite this Article:
Mohammadi M, Babaei Mahani M, Ramezani M, Alibolandi M. Collagen-Hydroxyapatite Scaffold Platform Incorporating Dimethyloxalylglycine Loaded Polymersomes Decorated with BMP-2 Peptide for Bone Tissue Engineering. J North Khorasan Univ Med Sci. 2024;16(1):1-11. DOI: 10.32592/nkums.16.1.1

Received: 04 Nov 2023
Accepted: 15 Nov 2023

Keywords:
Bone differentiation
Collagen
DMOG
Nano hydroxyapatite
Scaffold
Tissue engineering

Abstract

Introduction: Recent advances in the field of nanotechnology have led to the development of platforms for healing or repairing damaged tissues. The present study aimed to provide a bone extracellular matrix (ECM) mimetic platform made of hydroxyapatite and collagen loaded with nanopolymersomes encapsulating dimethyloxalylglycine (DMOG) and decorated with BMP-2 peptide in order to accelerate and increase the differentiation of mesenchymal stem cells to bone tissue.

Method: In this study, polymersome nanoparticles carrying DMOG and targeted with BMP-2 peptide were prepared. The physicochemical properties of nanoparticles were evaluated. Thereafter, it was loaded into collagen-nanohydroxyapatite scaffolds and the expression levels of osteogenic genes OCN and OPN and angiogenic genes vcam, vwf, and kdr were checked in mesenchymal stem cells.

Results: The surface charge and particle size of the synthesized nanoparticles were reported as -6 mv and 141 nm, respectively. The nanoparticles were able to slowly release 35% of the loaded DMOG within 30 days. The results demonstrated that the expression levels of OCN and OPN genes in cells exposed to polymersomes targeted with BMP-2 peptide were 27 and 2 times more than those of non-targeted polymersomes, respectively. In addition, the expression of angiogenic genes, vwf, kdr, and vcam, displayed a significant increase in targeted polymersomes compared to the non-targeted types (11.7-, 12.8-, and 2.17-fold, respectively).

Conclusion: It seems that providing an environment similar to the bone ECM by combining an osteomimetic scaffold made of collagen-nanohydroxyapatite, DMOG as an angiogenic factor, and BMP-2 as the osteogenic factor can be effective in accelerating and increasing the differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts.

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2025-06-06]

Copyright *© 2024 The Author(s); Published by Journal of North Khorasan University of Medical Sciences. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.*

مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی
دوره ۱۶، شماره ۱، بهار ۱۴۰۳

مقاله پژوهشی

داربست کلاژن هیدروکسی آپاتایت حامل پلیمرزوم‌های بارگذاری‌شده با دی‌متیل‌اگزالیل‌گلایسین و هدفمندشده با پپتید BMP-2 جهت مهندسی بافت استخوان

مرضیه محمدی[۱]، مریم بابایی ماهانی[۲]، محمد رمضانی[۳]، مونا علی بلندی[۴*]

[۱]استادیار، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات داورسانی هدفمند، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
[۲]پسادکترا، آزمایشگاه جامع تحقیقات، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
[۳]استاد ممتاز، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
[۴]دانشیار، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
[*]**نویسنده مسئول:** مونا علی بلندی، دانشیار گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران. ایمیل: alibolandim@mums.ac.ir.

DOI: 10.32592/nkums.16.1.1

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۲۴

واژگان کلیدی:
داربست، کلاژن
DMOG
نانوهیدروکسی آپاتایت
تمایز به استخوان
مهندسی بافت

چکیده

مقدمه: درمان شکستگی‌های استخوانی ترمیم‌ناپذیر یکی از چالش‌های پزشکی است؛ زیرا نه بافت استخوانی می‌تواند بازسازی شود و نه روش‌های بازسازی فعلی مؤثر هستند. پیشرفت‌های نوظهور در زمینه نانوتکنولوژی به توسعه مواد جدید، داربست‌ها و استراتژی‌های داورسانی برای ترمیم بافت‌های آسیب‌دیده منجر شده است. هدف از این مطالعه فراهم کردن شرایط مشابه ماتریکس خارج‌سلولی با ساخت داربست کلاژن هیدروکسی آپاتیت و بارگیری آن با حامل‌های پلیمرزومی حامل دی‌متیل‌اگزالیل‌گلایسین (DMOG) و هدفمندشده با پپتید BMP-2 به‌منظور تسریع و افزایش تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استخوان است.

روش کار: در این مطالعه، نانوذرات پلیمرزومی حامل DMOG و هدفمندشده با پپتید BMP-2 تهیه شد. خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات ارزیابی شد. سپس، درون داربست‌هایی از جنس کلاژن نانوهیدروکسی آپاتیت بارگیری شد و میزان بیان ژن‌های استئوژنیک OCN، OPN و ژن‌های آنژیوژنیک vcam، vwf، kdr در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بررسی شد.

یافته‌ها: بار سطحی و اندازه ذره‌ای نانوذرات سنتزشده به‌ترتیب، ۶- و ۱۴۱ نانومتر بود. نانوذرات ۳۵ درصد از DMOG بارگیری‌شده را طی ۳۰ روز و به‌صورت آهسته، آزاد کردند. نتایج بررسی بیان ژن‌های OCN و OPN نشان داد که میزان بیان این دو ژن در سلول‌هایی که در معرض پلیمرزوم‌های هدفمندشده با پپتید BMP-2 بودند، در مقایسه با پلیمرزوم‌های غیرهدفمند به‌ترتیب، ۲۷ و ۲ برابر بود. نتایج بررسی میزان بیان ژن‌های آنژیوژنیک نیز نشان داد که میزان بیان ژن‌های آنژیوژنیک vcam، vwf، kdr در پلیمرزوم‌های هدفمند نسبت به انواع غیرهدفمند به‌ترتیب، ۱۱/۷، ۱۲/۸ و ۲/۱۷ برابر بود.

نتیجه‌گیری: چنین به نظر می‌رسد که فراهم کردن محیط شبیه ماتریکس خارج‌سلولی استخوانی با کنار هم قرار دادن داربست استئومیمتیک کلاژن نانوهیدروکسی آپاتایت، فاکتور آنژیوژنیک DMOG و فاکتور استئوژنیک BMP-2 می‌تواند در تسریع و افزایش تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی از سلول‌های استخوانی مؤثر باشد.

مقدمه

بازسازی بافت استخوان با کمک مواد زیستی رویکردی امیدوارکننده برای درمان شکستگی‌های استخوانی غیرقابل درمان ناشی از افزایش سن، آسیب‌های مرتبط با ورزش یا حوادث است [۱-۳]. یکی از نگرانی‌های اصلی در مهندسی بافت استخوان آن است که رشد درونی استخوان و رگ‌زایی به قسمت‌های محیطی داربست‌ها محدود می‌شود، درحالی‌که تأمین مواد مغذی و زنده ماندن سلول اغلب در قسمت‌های مرکزی مهار می‌شود [۴]. برای افزایش رگ‌زایی، از فاکتورهای رشد آنژیوژنیک گران‌قیمت مانند فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) در ترکیب با داربست‌ها استفاده شده است [۵]. بااین‌حال، چنین رویکردهایی به‌دلیل مشکلات متعددی مانند هزینه‌های بالا، بی‌ثباتی پروتئین و دوزهای بالای فاکتور رشد استفاده‌شده محدود هستند. علاوه بر این، مطالعات نشان داده‌اند که استفاده از یک عامل رشد منفرد ممکن است به ایجاد عروق نابالغ منجر شود [۶].

رویکردی مؤثر برای تحریک رگ‌زایی، فعال‌کردن آبشاری از ژن‌های پیش‌رگ‌زا (Provasculogenic) با استفاده از مسیر فاکتور القایی هیپوکسی (HIF) است [۷]. HIF-1α یک تنظیم‌کننده کلیدی رگ‌زایی است که توسط HIF پرولیل هیدروکسیلاز در شرایطی با میزان اکسیژن معمول (normoxic) تجزیه می‌شود [۸]، به‌طوری که مهارکننده‌های پرولیل هیدروکسیلاز تخریب HIF-1α را مسدود و آبشار رگ‌زایی را آغاز می‌کنند. دی‌متیل‌اگزالیل‌گلایسین (DMOG) مولکولی کوچک و

Copyright © 2024 *The Author(s); Published by Journal of North Khorasan University of Medical Sciences. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.*

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2025-06-06]

نفوذکننده به داخل سلول است که HIF-1α را تثبیت می‌کند و قادر به القای ریزمحیط هیپوکسیک است [۹]؛ در نتیجه، عاملی پیش‌رگ‌زا است. قبلاً نشان داده شده بود که HIF-1α نقش مهمی در القای رگ‌زایی و استخوان‌زایی دارد [۱۰]. مطالعات نشان داده‌اند که فعال شدن HIF-1α در استئوبلاست‌ها به بهبود عروق استخوانی با واسطه VEGFمنجر می‌شود [۱۱]. علاوه بر این، مطالعات نشان داده‌اند که آزادسازی آهسته DMOG به‌طور قابل توجهی، خواص رگ‌زایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان (hBMSCs) را در مقایسه با داروی آزاد بهبود می‌بخشد [۶]. همچنین، گزارش شده است که فعال شدن طولانی‌مدت مسیر HIF در بافت‌های غیرهدفمند ممکن است باعث بیماری‌هایی مانند سرطان یا افزایش فشار خون شریان ریوی شود [۱۲]. برای به حداقل رساندن چنین اثرهایی و طراحی ساختاری کارآمد برای بهبود بازسازی استخوان، پیشنهاد شده است که حامل‌های هدفمندی تهیه شوند که به‌طور خاص، مولکول دارو را به سلول‌های هدف خود تحویل دهند [۱۳،۱۴].

در این راستا، مطالعات به‌سمت تثبیت پپتیدها و پروتئین‌های القای استخوان بر سطح نانوذرات برای بهبود جذب سلولی و درعین‌حال، آزادسازی موضعی دارو برای القای تمایز به استئوبلاست حرکت کرده‌اند. مطالعات قبلی از بیس فسفونات‌ها [۱۵]، پپتید اسیدی آرژنین-گلایسین-اسپارتیک اسید (RGD) [۱۶]، تتراسایکلین‌ها و سایر پروتئین‌های غیرکلاژنی [۱۷] به‌عنوان لیگاندهای هدف‌گیری استخوان برای بهبود استخوان‌سازی بهره برده‌اند. ژو و همکاران، نانوذرات سیلیکا مزوپور را با پپتید BMP-2 برای تحویل هدفمند دگزامتازون به سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) تزئین کردند. نتایج آن‌ها تأیید کرد که پیوند پپتید BMP-2 می‌تواند جذب سلولی و تمایز استخوانی را به‌طور قابل توجهی افزایش دهد [۱۸].

BMP-2 پروتئینی از خانواده TGF-β با خواص القای استخوان است. همچنین، سازمان غذا و داروی ایالات متحده امریکا برای استفاده بالینی در هم‌جوشی ستون فقرات آن را تأیید کرده است [۱۹]. پپتید BMP-2 دنباله‌ای از ۲۰ اسیدآمینه مشتق‌شده از اپی‌توپ بندانگشتی BMP-2 با اثرهای القای استخوان کارآمد است [۲۰]. مطالعات دقیقی وجود دارد که تأیید می‌کند که BMP-2 از گیرنده‌های سطح سلولی MSC برای تمایز استخوانی استفاده می‌کند [۲۱].

موضوع دیگر در توسعه ساختارهایی که می‌توانند جایگزین پیوند استخوان (Bone graft substitutes) شوند، ساخت پلت‌فرمی داربست‌مانند شبیه ساختارهای زیستی (Biomimetic) است. داربستی مطلوب علاوه بر توانایی القای رشد سلول‌های استخوانی، استخوان‌سازی و زیست‌سازگار بودن، باید دارای ساختار متخلخل سه‌بعدی با استحکام بیومکانیکی مناسب باشد [۲۲]. علاوه بر این، نشان داده شد که داربست‌ها باید ریزمحیط‌هایی شبیه به ماتریکس خارج‌سلولی بافت استخوانی با رهاسازی پایدار فاکتورهای رشد و با الگوی زمانی مناسب برای بهبود استخوان‌زایی فراهم کنند [۲۳].

پلیمرزوم‌ها وزیکول‌های پلیمری خودتشکیل‌شونده (Self-assembled) هستند که از بلاک‌های کوپلیمری آمفی‌فیل زیست‌تخریب‌پذیر ساخته شده‌اند که ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی منحصربه‌فردی دارند؛ از جمله پایداری زیاد، مدت‌زمان گردش در خون بالا (Long circulation time)، زیست‌تخریب‌پذیری و قابلیت آهسته‌رهش کردن داروها [۲۴, ۲۵]. پلیمرزوم‌ها همانند لیپوزوم‌ها قادر به انکپسوله کردن داروها و مواد هیدروفیل در هسته و هیدروفوب در دولایه هستند. این خصوصیات منحصربه‌فرد باعث شده است که به‌عنوان حامل‌های دارویی مطلوب در نانومدیسن به آن‌ها توجه شود. ازاین‌رو، در این مطالعه، از نانوذرات پلیمرزومی برای بارگیری DMOG استفاده شد.

از سوی دیگر، استخوان طبیعی از فیبریل‌های کلاژن تشکیل شده است که با آنالوگ‌های کلسیم‌فسفات، مثل هیدروکسی آپاتایت، پوشانده شده است. آب‌دوستی زیاد، زیست‌تجزیه‌پذیری قابل کنترل، تحریک پایین پاسخ التهابی میزبان، سمیت کم و تسهیل اتصال سلول به سطح از جمله ویژگی‌هایی هستند که باعث می‌شوند برخی مواد کاربرد زیادی در مهندسی بافت استخوان داشته باشند. یکی از ویژگی‌های مهم کلاژن ویژگی ساختاری آن است که به‌دلیل یکپارچگی ساختاری آن در استخوان به‌عنوان الگویی برای رسوب کلسیم‌فسفات و کلسیم‌کربنات عمل می‌کند.

با وجود این، یکی از معایب کلاژن خالص آن است که استحکام مکانیکی و سختی کافی ندارد و بنابراین، عملکرد ساختاری مناسب چه در تست‌های برون‌تن و چه در کاشت داربست در درون‌تن را دارا نیست. برای برطرف کردن این مشکل، مواد زیست‌فعال غیرآلی معمولاً به کلاژن اضافه می‌شوند و از کامپوزیت‌های کلاژن مواد غیرآلی استفاده می‌شود [۲۶]. برای رفع این مشکل، کامپوزیت‌های زیادی از کلاژن ساخته شده است؛ از جمله کلاژن هیدروکسی آپاتایت [۲۷]، کلاژن تری‌کلسیم‌فسفات [۲۸] و کلاژن سیلیکا [۲۹, ۳۰].

اخیراً، آزمایشگاه تحقیقاتی مهندسی بافت در کالج سلطنتی جراحان ایرلند داربستی به نام Hydroxy CollR را اختراع کرده است که داربستی متخلخل از جنس کلاژن هیدروکسی آپاتایت است و زیست‌سازگار، زیست‌جذب، دارای توانایی القای رشد سلول‌های استخوانی (osteoconductive) و استخوان‌سازی است [۲۲].

نشان داده شده است که نانوهیدروکسی آپاتیت قابلیت ادغام در استخوان را برای داربست افزایش داده است و داربست‌های سه‌بعدی متخلخل نانوهیدروکسی آپاتایت که همراه سلول‌های مغز استخوان در کف ظرف کاشته شده‌اند، به چسبیدن به کف ظرف و تکثیر و تمایز سلول‌ها کمک زیادی کرده‌اند که در زمینه ترمیم ضایعات استخوانی، امیدوارکننده است. نانوهیدروکسی آپاتیت را می‌توان به‌منظور ساخت ایمپلنت‌هایی با کیفیت بهتر به کار برد؛ زیرا نانوساختار استخوان طبیعی را بسیار خوب تقلید و osteointegration را تقویت می‌کند، ضمن آنکه

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2025-06-06]

خواص مکانیکی طبیعی دارد و واکنش‌های ایمنی کمتری ایجاد می‌کند و روی پاسخ سلولی کنترل بیشتری دارد [۳۱].

با توجه به اینکه استخوان به‌صورت عمده از کلاژن و هیدروکسی آپاتایت تشکیل شده است و با توجه به خصوصیات مطلوب این دو ماده و نیز باتوجه به اینکه در حال تأیید شدن توسط FDA است، در این مطالعه، از داربستی از جنس کلاژن هیدروکسی آپاتایت استفاده خواهیم کرد. چنان‌که اشاره شد، پلیمرزوم‌ها قادرند مواد محلول در آب را در هسته بارگیری کنند. در این مطالعه، DMOG درون نانوپلیمرزوم‌ها بارگیری شدند تا به‌مرور آزاد شوند و تحریک آنژیوژنز صورت گیرد. در ضمن، پپتیدهای BMP-2 به‌صورت کوالانس در سطح پلیمرزوم‌های آمینه قرار داده شدند. پس از طراحی و ساخت، نانوذرات داخل داربستی از جنس کلاژن هیدروکسی آپاتایت قرار گرفت، سلول‌های بنیادی جداشده از چربی انسانی روی داربست نهایی کاشته شد و میزان افزایش تمایز به استخوان و میزان تغییر در آنژیوژنز در این سلول‌ها بررسی شد.

روش کار

مواد و دستگاه‌ها

پپتید KIPKASSVPTELSAISTLYL و FAM-KIPKASS-VPTELSAISTLYL از شرکت China Peptides (چین) خریداری شد. نانوهیدروکسی آپاتایت از شرکت سیگما (امریکا) تهیه شد. کلاژن نوع ۱ از شرکت سیگما تهیه شد. پلی‌کاپرولاکتون (Mw: 14000 Da) و متوکسی‌پلی‌اتیلن‌گلایکول (Mw: 5000Da) از شرکت سیگما تهیه شد.

سنتز و خصوصیات NH2-PEG-b-PCL

تهیه کوپلیمر NH2-PEG-b-PCL مطابق پروژه قبلی انجام شد [۳۲]. به‌صورت خلاصه، پلیمر پلی‌کاپرولاکتون (PCL) کربوکسیله به پلیمر پلی‌اتیلن‌گلایکول (PEG) آمینه متصل شد. برای این منظور، ۵۰ میلی‌گرم PCL (Mw: 14000 Da) در دیوکسان حل شد. سپس، ۱۵ میلی‌گرم سوکسینیک‌انیدرید، ۵ میلی‌گرم دی‌متیل‌آمینوپیریدین (DMAP) و تری‌اتیل‌آمین به محلول اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت، در دمای اتاق هم زده شد. سپس، به کمک دستگاه تبخیر روتاری (Rotary evaporator) دیوکسین حذف شد. برای حذف و هیدرولیز سوکسینیک‌انیدرید باقی‌مانده، آب داغ (۲۰ میلی‌لیتر) اضافه شد و مخلوط به مدت ۱ ساعت حرارت داده شد. سپس، PCL-COOH با افزودن دی‌کلرومتان به محلول استخراج شد و در نهایت، حلال تبخیر شد.

در مرحله بعد، PCL-COOH به NH2-PEG-NH2 متصل شد، به‌طوری که 200 میلی‌گرم PCL-COOH در کلروفرم (۲۰ میلی‌لیتر) حل شد. سپس، ۵ میلی‌گرم EDC و ۵ میلی‌گرم NHS به محلول اضافه شد و به‌آرامی، به مدت ۱ ساعت، هم زده شد تا گروه‌های کربوکسیلیک‌اسید فعال شوند. سپس، ۱۴۰ میلی‌گرم NH2-PEG-NH2 در کلروفرم (۲۰ میلی‌لیتر) حل شد و در نهایت، محلول حاوی PCL-COOH فعال‌شده به‌صورت قطره‌ای، به محلول NH2-PEG-NH2 اضافه شد. اجازه داده شد که مخلوط به مدت ۴۸ ساعت، هم زده شود. حلال به کمک دستگاه تبخیر روتاری، تبخیر شد و محصول نهایی در dH2O حل شد و با استفاده از کیسه دیالیز (۳۵۰۰ دالتون) در برابر آب دیونیزه دیالیز شد تا بقایای آن حذف شود. محصول نهایی سنتز و خشک شد.

تهیه و تعیین خصوصیات پلیمرزوم‌های حامل DMOG

پلیمرزوم‌های بارگذاری‌شده با DMOG با روش هیدراتاسیون فیلم تهیه شدند. در این فرایند، ۸۰ میلی‌گرم از کوپلیمر NH2-PEG-b-PCL در کلروفرم (۸ میلی‌لیتر) حل شد. برای حذف حلال، از دستگاه تبخیر روتاری استفاده شد. فیلم پلیمری نازک تهیه‌شده با ۸ میلی‌لیتر محلول آبی DMOG (۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) هیدراته شد. سپس، به مدت ۲۰ دقیقه، تحت سونیکاسیون آبی قرار گرفت و اجازه داده شد به مدت ۲۴ ساعت، هم زده شود. سپس، فیلتر شد تا داروی بارگیری‌نشده خارج شود.

بازده انکپسولاسیون (EE) و ظرفیت بارگیری دارو (DL) با استفاده از معادلات زیر تعیین شد:

$$\%EE: \frac{The\ amount\ of\ encapsulated\ drug\ into\ polymersomes\ (mg)}{Initial\ amount\ of\ the\ drug\ used\ (mg)} \times 100$$

$$\%DL: \frac{The\ amount\ of\ encapsulated\ drug\ in\ to\ polymersomal\ formulation\ (mg)}{The\ amount\ of\ polymer\ used\ in\ formulation\ (mg)} \times 100$$

هدفمند کردن پلیمرزوم‌ها با پپتید BMP-2

۴۰ میلی‌گرم از پلیمرزوم‌های NH2-PEG-PCL خالی یا بارگذاری‌شده با DMOG در ۴ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شدند. سپس، ۱-اتیل-۳-(۳-دی‌متیل‌آمین‌پروپیل)-کربودی‌ایمید (EDC، ۳ میلی‌گرم) و N-هیدروکسی سوکسینیمید (۳ میلی‌گرم) به مخلوط اضافه شد و به‌آرامی، به مدت ۳۰ دقیقه، هم زده شد تا گروه‌های آمین فعال شوند. سپس، ۱۴۸ میکرولیتر محلول پپتید BMP-2، (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت، هم زده شد. برای حذف هرگونه پپتید BMP-2 آزاد، محصول نهایی فیلتر شد و برای استفاده بیشتر، لیوفیلیزه شد.

آزادسازی دارو در شرایط برون‌تن

آزادسازی DMOG در شرایط آزمایشگاهی از نانوذرات پلیمرزومی هدفمندشده با BMP-2 با استفاده از روش دیالیز ارزیابی شد. نانوذرات سنتزشده (۱ میلی‌لیتر) به کیسه دیالیز (اندازه منافذ برابر با ۸۰۰۰ دالتون) وارد شدند و در ظرف حاوی محیط آزادسازی (بافر فسفات‌سالین، pH=۷/۴) غوطه‌ور شدند و در دستگاه انکوباتور چرخان با سرعت ۶۰ دور در دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در مقاطع زمانی مشخص، ۱ میلی‌لیتر از محیط رهاسازی خارج شد و با همان حجم محیط آزادسازی تازه جایگزین شد. سپس، نمونه‌های جمع‌آوری‌شده با استفاده از طیف‌سنجی UV-vis در طول موج ۲۳۰

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2025-06-06]

نانومتر آنالیز شدند.

بررسی میزان ورود نانوذرات به داخل سلول‌ها توسط فلوسایتومتری

فلوسایتومتری برای ارزیابی کمی میزان ورود به سلول نانوذرات حامل کربوکسی‌فلورسئین (به‌عنوان داروی مدل و فلورسنت) و هدفمندشده با BMP-2 (BMP-2 decorated polymersome) و نانوذرات حامل کربوکسی‌فلورسئین غیرهدفمند (CF loaded polymersome) به کار رفت. به‌طور خلاصه، سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج‌شده در پلیت‌های ۱۲چاهکی با تراکم سلولی اولیه ۵۰۰۰۰۰ سلول در هر چاهک کشت داده شدند و یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO2 انکوبه شدند. روز بعد، سلول‌ها با BMP-2 decorated polymersome و CF loaded polymersome به مدت ۴ ساعت تیمار شدند. پس از حذف محیط، سلول‌ها دو بار با PBS سرد (۰/۱ مولار) شسته شدند، از کف پلیت با تریپسین جدا شدند و به مدت ۸ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس، سلول‌ها جمع‌آوری شدند و با PBS سرد (۰/۱ مولار، pH = ۷/۴) شسته و سپس، مجدداً معلق شدند.

در نهایت، سلول‌هایی که نانوذرات وارد آن‌ها شده بودند و بنابراین، فلورسانس داشتند، توسط فلوسایتومتر BD FACS Caliburser و در کانال FL2 ارزیابی شدند.

ساخت داربست و بررسی مورفولوژی آن

داربست‌ها مطابق آنچه Quinlan و همکاران توضیح داده بودند، ساخته شدند [۲۲]. به‌طور خلاصه، ۰/۱۸ گرم کلاژن تاندون گاوی به ۳۲ میلی‌لیتر محلول اسید استیک ۰/۵ مولار اضافه شد. این سوسپانسیون با استفاده از یک هموژنایزر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد هموژنایز شد. سپس، در فواصل منظم و با فاصله، ۱ میلی‌لیتر از محلول حاوی ۰/۳۶ گرم HA به ۴ میلی‌لیتر محلول اسید استیک ۰/۵ مولار، اضافه شد و مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه دیگر مخلوط شد. سپس، این مخلوط توسط خلأ گاززدایی شد تا حباب‌های هوا که می‌توانستند تخلخل کنترل‌نشده‌ای را در داربست نهایی ایجاد کنند، حذف شوند. در نهایت، خصوصیات سطحی داربست توسط میکروسکوپ SEM ارزیابی شد.

کاشت سلولی و تمایز استخوانی

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی انسانی مطابق آنچه در مقاله قبلی توضیح داده شده است، استخراج و خالص‌سازی شدند [۳۳]. سپس، در یک پلیت ۲۴خانه‌ای، داربست‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر قرار داده شد. سپس، ۵۰۰۰۰ سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی انسانی درون ۵۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM با گلوکز کم و حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی سوسپانسیون شد. به‌صورت قطره‌ای، ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی روی یک طرف داربست کاشته شد و سپس، به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور (۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO2) قرار داده شد و در ادامه، دیسک‌ها برگردانده شدند. پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون، ۱ میلی‌لیتر محیط به هر چاهک اضافه شد و داربست‌ها به انکوباتور بازگردانده شدند. در روز هفتم، ساختارها دو بار در PBS شسته شدند، در نیتروژن مایع منجمد شدند و تا تجزیه‌وتحلیل، در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

ارزیابی میزان بیان ژن

برای تعیین بیان ژن‌های استخوان‌ساز استئوپونتین (*OPN*) و استئوکلسین (*OCN*) و ژن‌های مربوط به رگ‌زایی (*vcam, vwf, kdr*)، (توالی‌های پرایمری در جدول ۱ نشان داده شده‌اند)، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز کمی در زمان واقعی انجام شد. ریبونوکلئیک‌اسید کل (RNA) از سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از ۷ روز کشت با استفاده از RiboEX™ LS (GeneAll Biotechnology) استخراج شد. مقدار RNA استخراج‌شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Nanodrop UV-Vis 2000 microvolume اندازه‌گیری شد. پس از آن، برای تعیین میزان بیان mRNA از کیت One Step SYBR® PrimeScript™ (Takara) RT-PCR Kit II و دستگاه Fast Real-Time PCR System ۷۵۰۰ (Applied Biosystems, Bedford, MA, USA) استفاده شد. با استفاده از ۱۰ نانوگرم RNA استخراج‌شده برای هر واکنش بیان ژن *OPN*، *OCN* و گلیسرآلدئید ۳-فسفات دهیدروژناز (*GAPDH*) به‌عنوان کنترل درون‌زا با روش ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) ارزیابی شد. مقادیر ΔCt سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت‌داده‌شده روی داربست نانوذرات پلیمرزومی فاقد DMOG و BMP-2 کنترل در نظر گرفته شد.

تحلیل آماری

برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها، از نرم‌افزار Prism8 و تحلیل آماری ANOVA یک‌طرفه استفاده شد. مقدار احتمال کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری، معنادار تعریف شد. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شدند.

جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده‌شده

Genes	*Sequences (5'-3')*	
GAPDH	(Fw)	ACAGTTGCCATGTAGACC
	(Rv)	TTTTTGGTTGAGCACAGG
VWF	(Fw)	CCTTGGTCACATCTTCACATTCAC
	(Rv)	CTCATCCAGATCCCACACAGA
VCAM	(Fw)	ACACTTTATGTCAATGTTGCC
	(Rv)	TTGTAGAAATTAAGGTGAGAGTTG
KDR	(Fw)	ACACACCAGGAATCAGTCAGTA
	(Rv)	TGACGCAAGAACCATACCACT
OCN	(Fw)	AAGGTGCAGCCTTTGTGT
	(Rv)	AGCCATTGATACAGGTAGC
OPN	(Fw)	TTCCAAGTAAGTCCAACGAAAG
	(Rv)	GTGACCAGTTCATCAGATTCAT

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2025-06-06]

یافته‌ها

پلیمرزوم‌های حامل DMOG و هدفمندشده با BMP-2

DMOG به روش هیدراسیون فیلم پلیمری درون پلیمرزوم (PEG-PCL) بارگذاری شد و میزان انکپسولاسیون دارو با روش اسپکتروفومتری UV ۴۴ درصد حاصل شد. سپس، پپتید BMP-2 (با توجه به اینکه در محیط بافری با pH برابر با ۷/۴، بار مثبت دارد) به پلیمرزوم‌های با بار منفی به‌صورت الکترواستاتیک متصل شد. سایز پلیمرزوم‌های سنتزشده و بار سطحی آن‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است.

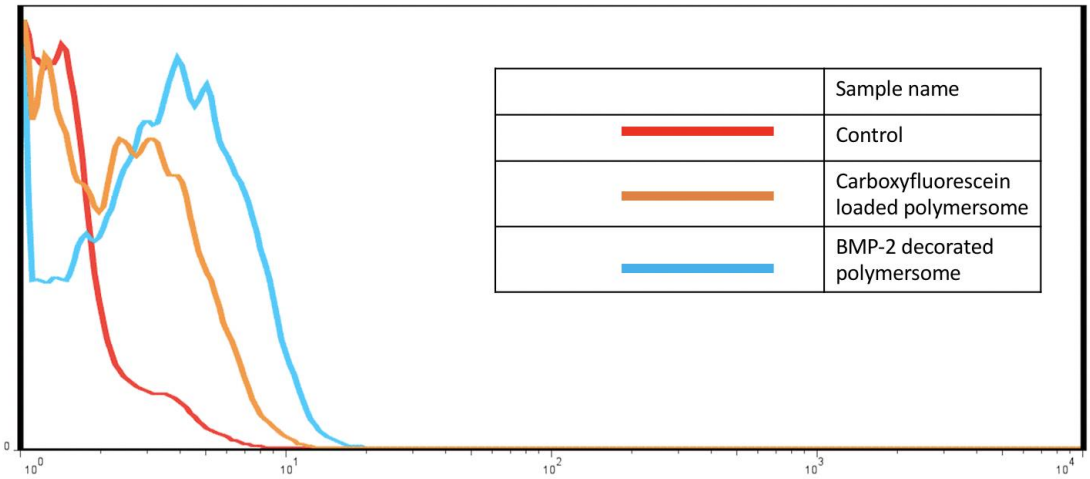
جدول ۱. اندازه ذرات، میزان پراکندگی اندازه ذره‌ای و بار سطحی ذرات

Z-average (d. nm)	Polydispersity index	Zeta potential
۱۴۱	۰/۳۴	-۶

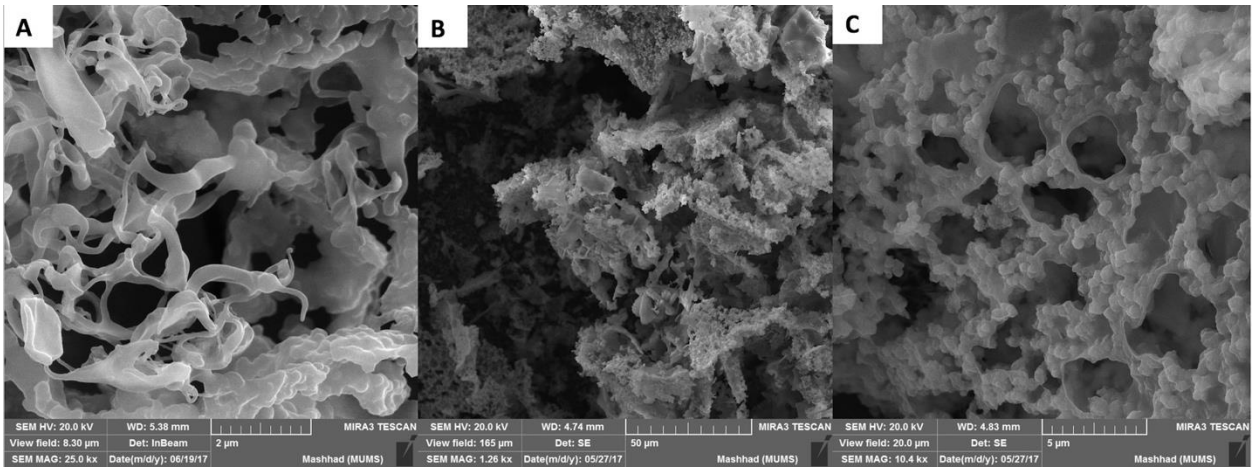
بررسی میزان ورود نانوذرات به داخل سلول‌ها توسط فلوسایتومتری

نتایج بررسی میزان ورود نانوذرات پلیمروزمی به سلول‌های بنیادی مزانشیمی نشان داد که آن نانوذرات پلیمرزومی که با پپتید BMP-2 هدفمند شده‌اند، میزان ورود به سلول بیشتری نسبت به نانوذرات غیرهدفمند داشته‌اند (شکل ۱).

در مرحله بعد، داربست‌های کلاژن نانوهیدروکسی آپاتیت ساخته شدند. شکل ۲ تصاویر SEM داربست‌های متشکل از کلاژن به‌تنهایی و کلاژن نانوهیدروکسی آپاتایت را نشان می‌دهد. چنان‌که در شکل می‌بینید، جایگیری نانوهیدروکسی آپاتیت در ساختار داربست به‌صورت واضح نشان داده شده است. نانوذرات هیدروکسی آپاتایت به‌صورت منظم، درون ساختار داربست پخش شده‌اند.



شکل ۱. بررسی میزان ورود پلیمرزوم‌های حامل کربوکسی‌فلورسئین (به‌عنوان جایگزین DMOG به‌عنوان عامل فلورسنت) و پلیمرزوم‌های حامل کربوکسی‌فلورسئین و هدفمندشده با BMP-2 توسط فلوسایتومتری پس از ۴ ساعت مجاورت با سلول‌های بنیادی مزانشیمی



شکل ۲. تصاویر مورفولوژی داربست‌ها با کمک میکروسکوپ **SEM** از **A**) داربست متشکل از کلاژن **B,C**) داربست متشکل از نانوهیدروکسی آپاتایت و کلاژن

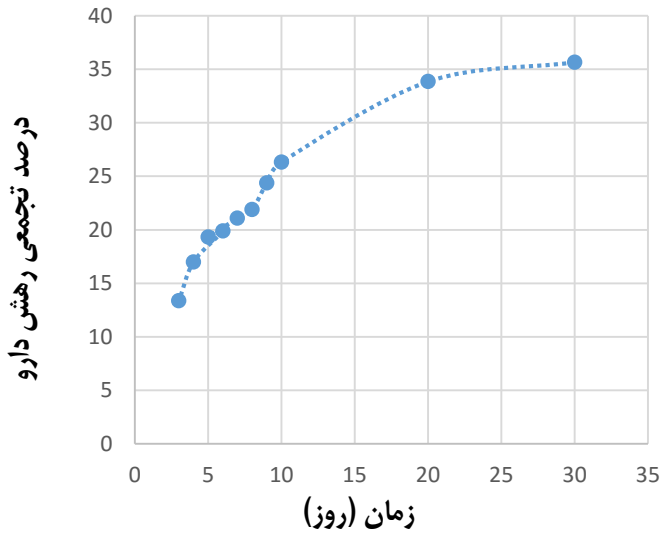
[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2025-06-06]

آزادسازی دارو در شرایط برون‌تن

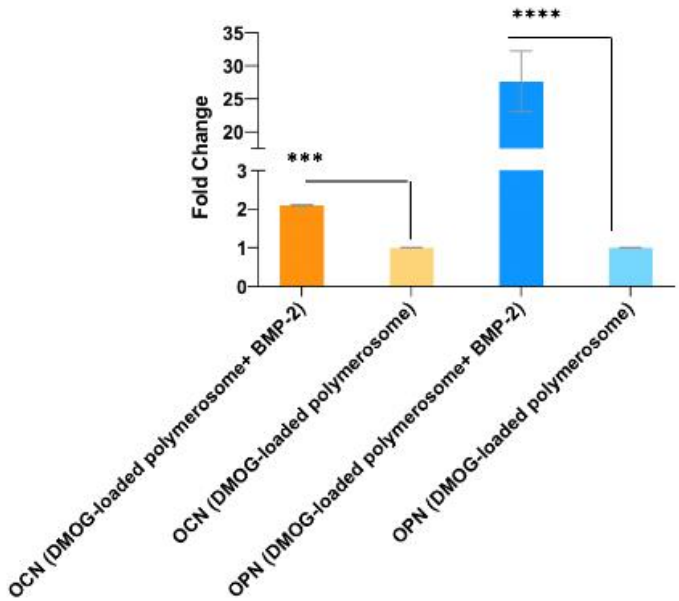
در مرحله بعد، نانوذرات حامل DMOG و پوشش‌داده‌شده با BMP-2 درون ساختار داربست قرار گرفتند و درصد تجمعی رهش دارو طی ۳۰ روز ارزیابی شد. نتایج مطالعه نشان داد که در این مدت، حدود ۳۵ درصد از DMOG بارگذاری‌شده داخل پلیمرزوم از داربست آزاد شده‌اند (شکل ۳).

ارزیابی میزان بیان ژن

نتایج بررسی میزان بیان ژن‌های مربوط به استئوژنز (*OCN* و *OPN*) و ژن‌های مربوط به رگ‌زایی (*vwf, kdr, vcam*) در شکل‌های ۴ و ۵ به‌ترتیب نشان داده شده‌اند. نتایج این مطالعه نشان داد که میزان بیان *OCN* و *OPN* در پلیمرزوم‌های هدفمند نسبت به فرمولاسیون غیرهدفمند، به‌ترتیب ۲ (P-value=۰/۰۰۰۳) و ۲۷ (P-۰/۰۰۰۱ =value) برابر بود (شکل ۴). همچنین، نتایج نشان داد که بیان ژن‌های *vwf*،*kdr*،*vcam* در پلیمرزوم‌های هدفمند نسبت به انواع غیرهدفمند، به‌ترتیب ۷/ ۱۱ (P-value=۰/۰۰۰۱)، ۱۲/۸ (P-value=۰/۰۰۰) و ۲/۱۷ (P-value=۰/۰۰۰۳) برابر بود.

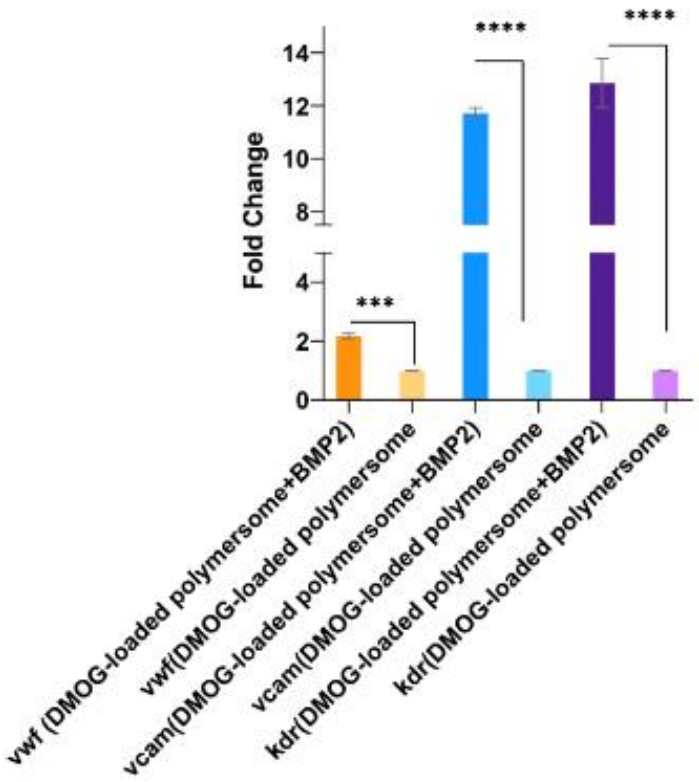


شکل ۲. پروفایل رهش DMOG از داربست حامل پلیمرزوم‌های حامل DMOG طی زمان و برحسب روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH برابر با ۷/۴



شکل ۳. بیان نسبی ژن‌های OCN وOPN توسط سلول‌های تیمارشده با پلیمرزوم حامل DMOG و هدفمندشده با BMP-2 و پلیمرزوم‌های حامل DMOG بعد از ۷ روز از شروع تمایز به سلول‌های استخوانی. میزان بیان OCN و OPN در پلیمرزوم‌های هدفمند نسبت به فرمولاسیون غیرهدفمند، به‌ترتیب ۲ (P-value=۰/۰۰۰۳) و ۲۷ (P-value=۰/۰۰۰۱) برابر بود.

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2025-06-06]



شکل ۴. بیان نسبی ژن‌های OCN و OPN توسط سلول‌های تیمارشده با پلیمرزوم حامل DMOG و هدفمندشده با BMP-2 و پلیمرزوم‌های حامل DMOG بعد از ۷ روز از شروع تمایز به سلول‌های استخوانی. بیان ژن‌های *vwf*، *kdr*، *vcam* در پلیمرزوم‌های هدفمند نسبت به انواع غیرهدفمند، به‌ترتیب ۷/ ۱۱ (P-value=۰/۰۰۰۱)، ۱۲/۸ (P-value=۰/۰۰۰۱) و ۱۷/ ۲ (P-value=۰/۰۰۰۳) برابر بود.

بحث

ترمیم استخوان فرایندی پیچیده و طولانی است و داربست‌های مهندسی بافت استخوانی با فراهم کردن شرایط استخوان‌زایی و رگ‌زایی مناسب می‌توانند نامزدهای بالقوه‌ای برای ترمیم و بازسازی استخوان باشند [۳۴]. در مطالعات زیادی از داربست‌های متشکل از کلاژن و نانوهیدروکسی آپاتایت در مهندسی بافت استخوان استفاده شده است [۳۵-۳۷]. از مشخصه‌های مهم داربست آن است که زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر باشد و محیطی مشابه ماتریکس خارج‌سلولی استخوان برای رشد و تمایز سلول‌های بنیادی از سلول‌های استخوانی فراهم کند. ماتریکس خارج‌سلولی استخوان (ECM) ریزمحیط سه‌بعدی منحصربه‌فردی است که تکثیر سلولی، تمایز و رسوب مواد معدنی در ماتریکس را تنظیم می‌کند [۳۸]. در واقع، استخوان نانوکامپوزیتی آلی و معدنی است که از کلاژن نوع ۱، گلیکوپروتئین‌ها، پروتئوگلیکان‌ها و مواد معدنی مانند نانوکریستالیت‌های هیدروکسی آپاتایت ساخته شده است [۳۹]. کلاژن نوع ۱ ماده اصلی تشکیل‌دهنده ماتریکس خارج‌سلولی استخوان است و ۹۰ درصد کل پروتئین‌های ماتریکس خارج‌سلولی را تشکیل می‌دهد و به‌عنوان الگویی عمل می‌کند که مواد معدنی برای تشکیل ماتریکس استخوان بر آن رسوب می‌کنند [۳۳]. ازاین‌رو، در این مطالعه، داربستی سه‌بعدی از کلاژن و هیدروکسی آپاتایت تهیه شد و چنان‌که در شکل ۲ نشان داده شده است، نانوذرات هیدروکسی آپاتایت به‌صورت منظم درون ساختار داربست پخش شده‌اند.

یکی از رویکردهای عملی برای بازسازی بافت استخوانی آسیب‌دیده، ارائه پلت‌فرمی سه‌بعدی همراه با الگوی آزادسازی کنترل‌شده‌ای از عوامل زیست‌فعال ضروری و فاکتورهای رشد لازم برای تنظیم تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت استخوانی است [۴۰].

نشان داده‌اند که پروتئین مورفوژنتیک استخوان ۲ (BMP-2) یکی از پروتئین‌های قوی در بازسازی استخوان است که از نظر بالینی، برای هم‌جوشی ستون فقرات تأیید شده است [۴۱]. بااین‌حال، انتشار کنترل‌نشده و خارج از محل این پروتئین به عوارض متعددی مانند استخوان‌سازی هتروتوپیک، تومورزایی و پاسخ ایمنی منجر شد [۴۲]. ازآنجایی‌که BMPها نیمه‌عمر کوتاهی دارند و به‌سرعت، از بافت محلی پاک می‌شوند، معمولاً دوزهای بالاتری از پروتئین به ایمپلنت بارگذاری می‌شود که هزینه‌های بالا و عوارض جانبی زیادی هم تحمیل می‌کند. ازاین‌رو، معمولاً از حامل‌ها برای دارورسانی این مواد استفاده می‌شود [۴۳].

به‌علاوه، مطالعات نشان داده‌اند که یکی دیگر از مسائل مهم در ساخت داربست، تحریک ساخت عروق در بافت مهندسی‌شده برای افزایش

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2025-06-06]

اتصال بافت ساخته‌شده به استخوان است. برای این منظور، فاکتورهای رشد و/یا سلول‌ها نیز در داربست گنجانده می‌شوند. فاکتورهای رشد رگ‌زایی مانند VEGF، FGF-2، PDGF، IGF، SHH (Sonic Hedgehog) و Ang (Angiopoietin) در آزمایش‌های مختلف پیش‌بالینی و بالینی استفاده شده‌اند [۴۴, ۱۹].

در این میان، دی‌متیل‌اگزالیل‌گلایسین (DMOG) که داروی مولکولی نسبتاً کوچکی است، کاندیدی ایدئال در نظر گرفته می‌شود. DMOG یک مهارکننده رقابتی فاکتور پرولیل‌هیدروکسیلاز (HIF-PH) قابل نفوذ سلولی (وزن مولکولی برابر با ۱۷۵/۱ گرم بر مول) است و می‌تواند بیان HIF-1a را در شرایط نرموکسیک، تثبیت کند. بنابراین، انتظار می‌رود که DMOG یک ریزمحیط هیپوکسیک ایجاد کند و به‌عنوان ترکیبی پیش‌رگ‌زا عمل کند [۵].

بنابراین، به‌منظور فراهم کردن داربست‌هایی با ساختار شبیه ماتریکس خارج‌سلولی، داربست‌های کلاژن نانوهیدروکسی آپاتایت تهیه شد. سپس، برای آزادسازی آهسته، فاکتور رگ‌زایی (DMOG) درون نانوذرات پلیمرزومی بارگذاری شد. در ضمن، برای افزایش ورود نانوذرات به داخل سلول‌های بنیادی مزانشیمی و افزایش اثربخشی، سطح نانوذرات با پپتید BMP-2 پوشش داده شد. چنان‌که در شکل ۱ نشان داده شده است، میزان برداشت سلولی نانوذرات در سلول‌هایی که در مدت‌زمان مشابه با نانوذرات پلیمرزومی هدفمندشده با پپتید BMP-2 انکوبه شده بودند، نسبت به نانوذرات غیرهدفمند، به‌صورت قابل ملاحظه‌ای افزایش داشته است. نتیجه مطالعه Zhou و همکاران، که از نانوذرات مزوپوروس سیلیکای بارگذاری‌شده با دگزامتازون و پوشش‌داده‌شده با BMP-2 استفاده کرده بودند، نشان داد که حضور پپتید BMP-2 به‌صورت معناداری به افزایش ورود نانوذرات به سلول منجر شده است [۱۸]. نتایج مطالعات رهش نانوذرات در بافر فسفات‌سالین با pH فیزیولوژیک و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نشان داد که حدود ۳۵ درصد از DMOG بارگذاری‌شده داخل نانوذرات طی ۳۰ روز، به‌صورت آهسته، آزاد شده است (شکل ۳).

در مرحله بعد، نانوذرات درون داربست‌ها بارگیری شدند، سلول‌های بنیادی مزانشیمی روی داربست‌ها کاشته شدند و میزان بیان فاکتورهای استئوژنیک و آنژیوژنیک بررسی شد. نتایج بررسی ژن‌های *OCN* و *OPN*نشان داد که میزان بیان این دو ژن در سلول‌هایی که در معرض پلیمرزوم‌های هدفمندشده با پپتید BMP-2 بودند، در مقایسه با پلیمرزوم‌های غیرهدفمند، به‌ترتیب، ۲۷ و ۲ برابر بود که نشان می‌دهد که حضور پپتید BMP-2 می‌تواند به افزایش ورود نانوذره به داخل سلول و تحریک تمایز به استخوان منجر شود. در ضمن، نتایج بررسی میزان بیان ژن‌های آنژیوژنیک نیز نشان داد که میزان بیان ژن‌های *vwf ،kdr ،vcam* در پلیمرزوم‌های هدفمند نسبت به انواع غیرهدفمند، به‌ترتیب، ۱۱/۷، ۱۲/۸ و ۲/۱۷ برابر بود. این‌چنین به نظر می‌رسد که حضور پپتید BMP-2 در سطح نانوذرات نه‌تنها به نانوذرات زیست‌سازگاری خوبی می‌بخشد، بلکه جذب سلولی و اندوسیتوز را به‌دلیل تمایل بالای پپتید BMP-2 و گیرنده‌های خاص BMP و بارهای سطحی الکترواستاتیکی افزایش می‌دهد. علاوه بر این، پپتید BMP-2 با گیرنده‌های BMP روی سطح سلول تعامل می‌کند که به تشکیل کمپلکس‌های گیرنده پپتید BMP-2 و فعال شدن مسیرهای Smad پایین‌دست منجر می‌شود [۱۸, ۴۵]. در ضمن، پس از ورود نانوذره به سلول، DMOG درون سلول آزاد و به افزایش اثربخشی آن منجر می‌شود.

نتیجه‌گیری

به‌طور خلاصه، نانوذرات پلیمرزومی حامل DMOG و هدفمندشده با پپتید BMP-2 سنتز شدند. نتایج نشان داد که نانوذرات هدفمند میزان ورود به سلول بیشتری نسبت به انواع غیرهدفمند داشتند. در ضمن، این نانوذرات قادر بودند حدود ۳۵ درصد از DMOG بارگیری‌شده را طی ۳۰ روز، به‌صورت آهسته، آزاد کنند. نتایج حاصل از کاشتن سلول‌های بنیادی مزانشیمی روی داربست‌های متشکل از کلاژن و نانوهیدروکسی آپاتایت بارگیری‌شده با نانوذرات پلیمرزومی هدفمند و حامل DMOG نشان داد که میزان بیان ژن‌های آنژیوژنیک و استئوژنیک در مقایسه با داربست بارگیری‌شده با نانوذرات غیرهدفمند، افزایش معناداری داشته است. چنین به نظر می‌رسد که فراهم کردن محیط شبیه ماتریکس خارج‌سلولی استخوانی با کنار هم قراردادن داربست استئومیمتیک کلاژن نانوهیدروکسی آپاتایت، فاکتور آنژیوژنیک DMOG و فاکتور استئوژنیک BMP-2 می‌تواند قدم مهمی در جهت تسریع و افزایش تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی از سلول‌های استخوانی باشد.

سپاسگزاری

این مطالعه در دانشگاه علوم پزشکی مشهد و با حمایت مالی این دانشگاه (شماره گرنت: ۹۵۰۰۸۹) به انجام رسیده است. در ضمن، این طرح پژوهشی با کد اخلاق IR.MUMS.REC.1395.272 در جلسه کارگروه منطقه‌ای اخلاق در پژوهش‌های زیست‌پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد تأیید شده است.

تعارض منافع

تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Shadjou N, Hasanzadeh M. Silica-based mesoporous nanobiomaterials as promoter of bone regeneration process. J Biomed Mater Res A. 2015;103(11):3703-3716. DOI: 10.1002/jbm.a.35504 PMID: 26011776
2. Woo KM, Jung HM, Oh JH, ur Rahman S, Kim SM, Baek JH, et al. Synergistic effects of dimethyloxalylglycine and butyrate incorporated into α-calcium sulfate on bone regeneration. Biomaterials. 2015;39:1-14. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.10.054 PMID: 25477166
3. Oroojalian F, Ramezani M, Alibolandi M. The synergism of resveratrol-poly(lactic-co-glycolic acid) (plga) and curcuminplga

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2025-06-06]

nanoparticles in directing adipose-derived mesenchymal stem cells towards osteoblastic differentiation. J Isfahan Med Sch. 2022;39(654):964-972.
4. Ding H, Gao YS, Wang Y, Hu C, Sun Y, Zhang C. Dimethyloxaloylglycine increases the bone healing capacity of adipose-derived stem cells by promoting osteogenic differentiation and angiogenic potential. Stem Cells Dev. 2014;23(9):990-1000. DOI: 10.1089/scd.2013.0486 PMID: 24328551
5. Wu C, Zhou Y, Chang J, Xiao Y. Delivery of dimethyloxallyl glycine in mesoporous bioactive glass scaffolds to improve angiogenesis and osteogenesis of human bone marrow stromal cells. Acta Biomater. 2013;9(11):9159-9168. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.06.026 PMID: 23811216
6. Min Z, Shichang Z, Chen X, Yufang Z, Changqing Z. 3D-printed dimethyloxallyl glycine delivery scaffolds to improve angiogenesis and osteogenesis. Biomater Sci. 2015;3(8):1236-1244. DOI: 10.1039/c5bm00132c PMID: 26222039
7. Fan L, Li J, Yu Z, Dang X, Wang K. The hypoxia-inducible factor pathway, prolyl hydroxylase domain protein inhibitors, and their roles in bone repair and regeneration. Biomed Res Int. 2014;2014. DOI: 10.1155/2014/239356 PMID: 24895555
8. Riddle RC, Khatri R, Schipani E, Clemens TL. Role of hypoxia-inducible factor-1α in angiogenic–osteogenic coupling. J Mol Med. 2009;87(6):583-590. DOI: 10.1007/s00109-009-0477-9 PMID: 19415227
9. Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. Science. 2001;294(5545):1337-1340. DOI: 10.1126/science.1066373 PMID: 11598268
10. Peng J, Lai ZG, Fang ZL, Xing S, Hui K, Hao C, et al. Dimethyloxalylglycine prevents bone loss in ovariectomized C57BL/6J mice through enhanced angiogenesis and osteogenesis. PloS One. 2014;9(11):e112744. DOI: 10.1371/journal.pone.0112744 PMID: 25394221
11. Wang Y, Wan C, Deng L, Liu X, Cao X, Gilbert SR, et al. The hypoxia-inducible factor α pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. J Clin Invest. 2007;117(6):1616-26. DOI: 10.1172/JCI31581 PMID: 17549257
12. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. Cell. 2012;148(3):399-408. DOI: 10.1016/j.cell.2012.01.021 PMID: 22304911
13. Segar CE, Ogle ME, Botchwey EA. Regulation of angiogenesis and bone regeneration with natural and synthetic small molecules. Curr Pharm Des. 2013; 19(19):3403-3419. DOI: 10.2174/1381612811319190007 PMID: 23432670
14. Lo KWH, Jiang T, Gagnon KA, Nelson C, Laurencin CT. Small-molecule based musculoskeletal regenerative engineering. Trends Biotechnol. 2014;32(2):74-81. DOI: 10.1016/j.tibtech.2013.12.002 PMID: 24405851
15. Safari B, Aghazadeh M, Aghanejad A. Osteogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells in a bisphosphonate-functionalized polycaprolactone/gelatin scaffold. Int J Biol Macromol. 2023;241:124573. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.124573 PMID: 37100325
16. Zhang X, Gu J, Zhang Y, Tan Y, Zhou J, Zhou D. Immobilization of RGD peptide onto the surface of apatite-wollastonite ceramic for enhanced osteoblast adhesion and bone regeneration. J. Wuhan Univ. Technol. Mater. Sci. Ed. 2014;29(3):626-634. DOI: 0.1007/s11595-014-0969-5
17. Luginbuehl V, Meinel L, Merkle HP, Gander B. Localized delivery of growth factors for bone repair. Eur J Pharm Biopharm. 2004;58(2):197-208. DOI: 10.1016/j.ejpb.2004.03.004 PMID: 15296949
18. Zhou X, Feng W, Qiu K, Chen L, Wang W, Nie W, et al. BMP-2 derived peptide and dexamethasone incorporated mesoporous silica nanoparticles for enhanced osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells. ACS Appl Mater Interfaces. 2015;7(29):15777-15789. DOI: 10.1021/acsami.5b02636 PMID: 26133753
19. Mohammadi M, Shaegh SAM, Alibolandi M, Ebrahimzadeh MH, Tamayol A, Jaafari MR, et al. Micro and nanotechnologies for bone regeneration: recent advances and emerging designs. J Control Release. 2018;274:35-55. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.01.032 PMID: 29410062
20. Lee JS, Lee JS, Murphy WL. Modular peptides promote human mesenchymal stem cell differentiation on biomaterial surfaces. Acta Biomater. 2010;6(1):21-28. DOI: 10.1016/j.actbio.2009.08.003 PMID: 19665062
21. Lavery K, Swain P, Falb D, Alaoui-Ismaili MH. BMP-2/4 and BMP-6/7 differentially utilize cell surface receptors to induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. J Biol Chem. 2008;283(30):20948-20958. DOI: 10.1074/jbc.M800850200 PMID: 18436533
22. Quinlan E, López-Noriega A, Thompson E, Kelly HM, Cryan SA, O'Brien F. Development of collagen–hydroxyapatite scaffolds incorporating PLGA and alginate microparticles for the controlled delivery of rhBMP-2 for bone tissue engineering. J Control Release. 2015;198:71-79. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.11.021 PMID: 25481441
23. Barati D, Shariati SRP, Moeinzadeh S, Melero-Martin JM, Khademhosseini A, Jabbari E. Spatiotemporal release of BMP-2 and VEGF enhances osteogenic and vasculogenic differentiation of human mesenchymal stem cells and endothelial colony-forming cells co-encapsulated in a patterned hydrogel. J Control Release. 2016;223:126-136. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.12.031 PMID: 26721447
24. Kuperkar K, Patel D, Atanase LI, Bahadur P. Amphiphilic block copolymers: their structures, and self-assembly to polymeric micelles and polymersomes as drug delivery vehicles. Polymers. 2022;14(21):4702. DOI: 10.3390/polym14214702 PMID: 36365696
25. Kansız S, Elçin YM. Advanced liposome and polymersome-based drug delivery systems: Considerations for physicochemical properties, targeting strategies and stimuli-sensitive approaches. Adv Colloid Interface Sci. 2023:102930. DOI: 10.1016/j.cis.2023.102930 PMID: 37290380
26. Sarker B, Hum J, Nazhat SN, Boccaccini AR. Combining collagen and bioactive glasses for bone tissue engineering: a review. Adv Healthc Mater. 2015;4(2):176-194. DOI: 10.1002/adhm.201400302 PMID: 25116596
27. Liu H, Wang C, Sun X, Zhan C, Li Z, Qiu L, et al. Silk fibroin/collagen/hydroxyapatite scaffolds obtained by 3D printing technology and loaded with recombinant human erythropoietin in the reconstruction of alveolar bone defects. ACS Biomater Sci Eng. 2022;8(12):5245-5256. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.2c00690 PMID: 36336837
28. Sarikaya B, Aydin HM. Collagen/beta-tricalcium phosphate based synthetic bone grafts via dehydrothermal processing. Biomed Res Int. 2015;2015:576532. DOI: 10.1155/2015/576532 PMID: 26504812
29. Desimone MF, Hélary C, Rietveld IB, Bataille I, Mosser G, Giraud-Guille MM, et al. Silica–collagen bionanocomposites as three-dimensional scaffolds for fibroblast immobilization. Acta Biomater. 2010;6(10):3998-4004. DOI: 10.1016/j.actbio.2010.05.014 PMID: 20493975
30. Alvarez Echazú M, Renou S, Alvarez G, Desimone M, Olmedo D. A collagen-silica-based biocomposite for potential application in bone tissue engineering. J Biomed Mater Res A. 2022;110(2):331-340. DOI: 10.1002/jbm.a.37291 PMID: 34374221
31. Adamopoulos O, Papadopoulos T. Nanostructured bioceramics for maxillofacial applications. J Mater Sci Mater Med. 2007;18(8):1587-1597. DOI: 10.1007/s10856-007-3041-6 PMID: 17483893
32. Zavvar T, Babaei M, Abnous K, Taghdisi SM, Nekooei S, Ramezani M, et al. Synthesis of multimodal polymersomes for targeted drug delivery and MR/fluorescence imaging in metastatic breast cancer model. Int J Pharm.

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2025-06-06]

2020;30;578:119091. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119091 PMID: 32007591

33. 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. 2018;14(7):1987-1997. DOI: 10.1016/j.nano.2018.06.001 PMID: 29933024
34. Liu X, Zhao N, Liang H, Tan B, Huang F, Hu H, et al. Bone tissue engineering scaffolds with HUVECs/hBMSCs cocultured on 3D-printed composite bioactive ceramic scaffolds promoted osteogenesis/angiogenesis. J Orthop Translat. 2022;37:152-162. DOI: 10.1016/j.jot.2022.10.008 PMID: 36380884
35. Yu L, Rowe DW, Perera IP, Zhang J, Suib SL, Xin X, et al. Intrafibrillar mineralized collagen–hydroxyapatite-based scaffolds for bone regeneration. ACS Appl Mater Interfaces. 2020; 12(16):18235-18249. DOI: 10.1021/acsami.0c00275 PMID: 32212615
36. Quinlan E, Thompson EM, Matsiko A, O'Brien FJ, López-Noriega A. Functionalization of a collagen–hydroxyapatite scaffold with osteostatin to facilitate enhanced bone regeneration. Adv Healthc Mater. 2015;(17)4:2649-2656. DOI: 10.1002/adhm.201500439 PMID: 26414944
37. López-Noriega A, Ruiz-Hernández E, Quinlan E, Storm G, Hennink WE, O'Brien F. Thermally triggered release of a pro-osteogenic peptide from a functionalized collagen-based scaffold using thermosensitive liposomes. J Control Release. 2014; 187:158-166. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.05.043 PMID: 24878185
38. Rather HA, Jhala D, Vasita R. Dual functional approaches for osteogenesis coupled angiogenesis in bone tissue engineering. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2019;103:109761. DOI: 10.1016/j.msec.2019.109761 PMID: 31349418
39. Lin X, Patil S, Gao YG, Qian A. The bone extracellular matrix in bone formation and regeneration. Front Pharmacol. 2020;11:757. DOI: 10.3389/fphar.2020.00757 PMID: 32528290
40. Oliveira ÉR, Nie L, Podstawczyk D, Allahbakhsh A, Ratnayake J, Brasil DL, et al. Advances in growth factor delivery for bone tissue engineering. Int J Mol Sci. 2021;22(2):903. DOI: 10.3390/ijms22020903 PMID: 33477502
41. Halloran D, Durbano HW, Nohe A. Bone morphogenetic protein-2 in development and bone homeostasis. J Dev Biol. 2020;8(3):19. DOI: 10.3390/jdb8030019 PMID: 32933207
42. Vantucci CE, Krishan L, Cheng A, Prather A, Roy K, Guldberg RE. BMP-2 delivery strategy modulates local bone regeneration and systemic immune responses to complex extremity trauma. Biomater Sci. 2021;9(5):1668-1682. DOI: 10.1039/d0bm01728k PMID: 33409509
43. 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):225-230. DOI: 10.22038/NMJ.2020.07.0006
44. Almubarak S, Nethercott H, Freeberg M, Beaudon C, Jha A, Jackson W, et al. Tissue engineering strategies for promoting vascularized bone regeneration. Bone. 2016;83:197-209. DOI: 10.1016/j.bone.2015.11.011 PMID: 26608518
45. Gan Q, Zhu J, Yuan Y, Liu H, Qian J, Li Y, et al. A dual-delivery system of pH-responsive chitosan-functionalized mesoporous silica nanoparticles bearing BMP-2 and dexamethasone for enhanced bone regeneration. J Mater Chem B. 2015;3(10):2056-2066. DOI: 10.1039/c4tb01897d PMID: 32262373

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2025-06-06]